



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SELECTIVIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA:  
INIBIDORES DAS METALOPROTEINASES**

Trabalho submetido por

**Ricardo Sobral**

**Para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Fevereiro de 2018**





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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SELECTIVIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA:  
INIBIDORES DAS METALOPROTEINASES**

Trabalho submetido por

**Ricardo Sobral**

**Para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Trabalho orientado por

**Professor Jorge Caldeira**

**Fevereiro de 2018**



## **Resumo**

As metaloproteinases da matriz são um grupo de endopeptídases zinco-dependente responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, como o colagénio. Em condições fisiológicas normais atuam em processos de morfogénese e remodelação de tecidos e a sua actividade é regulada a vários níveis, no entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre as metaloproteinases e os inibidores podem ser desencadeados inúmeros processos patológicos como, artrite, periodontite, entre outros. A sua acção de degradação do colagénio levou a falhas nas restaurações dentárias uma vez que este é responsável pela ligação resina-dentina. Assim, surgiu a necessidade de incorporar inibidores exógenos das metaloproteinases nas resinas dentárias.

Para o desenvolvimento de novos inibidores das metaloproteinases, é necessário analisar pormenorizadamente a sua afinidade com o local de acção e outras propriedades. Estudos efectuados revelaram que determinados monómeros utilizados em resinas são tóxicos, assim, é importante testar a capacidade que um composto tem de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer actividade nas células do sistema nervoso central.

Palavras-Chave: Inibidores das Metaloproteinases da Matriz, Barreira Hematoencefálica



## **Abstract**

Matrix metalloproteinases are a group of zinc-dependent endopeptidases responsible for the degradation of extracellular matrix components, such as collagen. In normal conditions they participate in physiological processes such as morphogenesis and tissue remodeling, and its activity is regulated at several levels, nevertheless when an imbalance occurs between the metalloproteinases and the inhibitors, pathological processes can occur, such as, arthritis, periodontitis, amongst others. Its collagen degradation action can lead to failures in dental restorations, since it is responsible for binding resin-dentin. Thus, the need to incorporate exogenous inhibitors of the metalloproteinases in dental resins.

For the development of new inhibitors of the metalloproteinases, it is necessary to analyze in detail its affinity to the site of action and other properties. Studies have revealed that certain monomers used in dental resins are toxic so it's important to test the ability of the compound to cross the blood brain barrier and its possible activity in the central nervous system cells.

Key-words: Matrix Metalloproteinases Inhibitors; Blood Brain Barrier



## Índice

|   |    |
|---|----|
| Introdução -----  | 11 |
| Barreira Hematoencefálica -----                                   | 11 |
| Transporte de fármacos -----                                      | 13 |
| Parâmetros usados na quantificação da permeabilidade da BHE ----- | 15 |
| Métodos de estudo da permeabilidade da BHE -----                  | 17 |
| Métodos <i>in silico</i> -----                                    | 18 |
| Métodos <i>in vitro</i> -----                                     | 19 |
| Métodos <i>in vivo</i> -----                                      | 20 |
| Alterações disruptivas e não disruptivas da BHE -----             | 22 |
| <br>  |    |
| Metaloproteinases da Matriz -----                                 | 28 |
| <br>  |    |
| MMPs na Barreira Hematoencefálica -----                           | 33 |
| <br>  |    |
| Metaloproteinases da Matriz e Restauração Dentária -----          | 43 |
| <br>  |    |
| Bibliografia -----  | 45 |



## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Representação da estrutura da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016)- .....  | 12 |
| Figura 2 – Representação dos mecanismos de penetração da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016) .....   | 13 |
| Figura 3 – Ilustração esquemática das alterações disruptivas e não disruptivas da BEE durante uma inflamação sistémica (Varatharaj & Galea, 2017) .....   | 24 |
| Figura 4 – Vias de depuração da $\beta$ -amilóide no cérebro .....  | 28 |
| Figura 5 – A actividade das MMPs é regulada a quatro níveis: expressão génica maioritariamente por regularização da transcrição e da estabilidade do mRNA, compartimentação (regulação através do recrutamento pela superfície celular, disponibilidade de substrato e interações proteicas ), activação pró-enzimática e inibição da proteólise (Loffek, Schilling, & Franzke, 2011) ..... | 29 |
| Figura 6 – Domínios estruturais dos diferentes grupos das MMP (Loffek et al., 2011) .....   | 32 |
| Figura 7 – Mecanismos de activação de MMP que levam à degradação da matriz extracelular e disfunção da BHE/ hemorragia (Lakhan, Kirchgessner, Tepper, & Leonard, 2013) .....  | 33 |
| Figura 8 – MMPs na neuroinflamação (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016) ----  | 35 |
| Figura 9 – MMPs na Esclerose Múltipla (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)-----<br>.....  | 37 |
| Figura 10 – MMP-9 no Acidente Vascular Cerebral (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016) .....  | 39 |
| Figura 11 – MMP-9 nas metástases tumorais (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)-----   | 42 |



## **Índice de Tabelas**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Exemplos de métodos in vivo e parâmetros possíveis de calcular -----  | 20 |
| Tabela 2 – Softwares comercializados que permitem o estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016) ----- | 21 |
| Tabela 3 – Tecidos e células responsáveis pela expressão de MMPs específicas (Loffek et al., 2011) -----                           | 49 |
| Tabela 4 – Fenótipos dos ratinhos aos quais foram removidas as metaloproteinases (Loffek et al., 2011) -----                       | 50 |
| Tabela 5 – MMPs em doenças no Sistema Nervoso Central (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016) -----                                   | 51 |



## **Lista de Abreviaturas**

AIT – Acidente Isquémico Transitório

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BHE – Barreira Hematoencefálica

BUI – *Brain Uptake Index*

ECM – Matriz Extracelular

IAM – *Immobilized Artificial Membrane*

MMP – Metaloproteinases da Matriz

MT-MMPs – Metaloproteinases de Membrana

PAMPA – *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*

SNC – Sistema Nervoso Central

TIMPs – Tissue inhibitors of the metalloproteinases



# **Introdução**

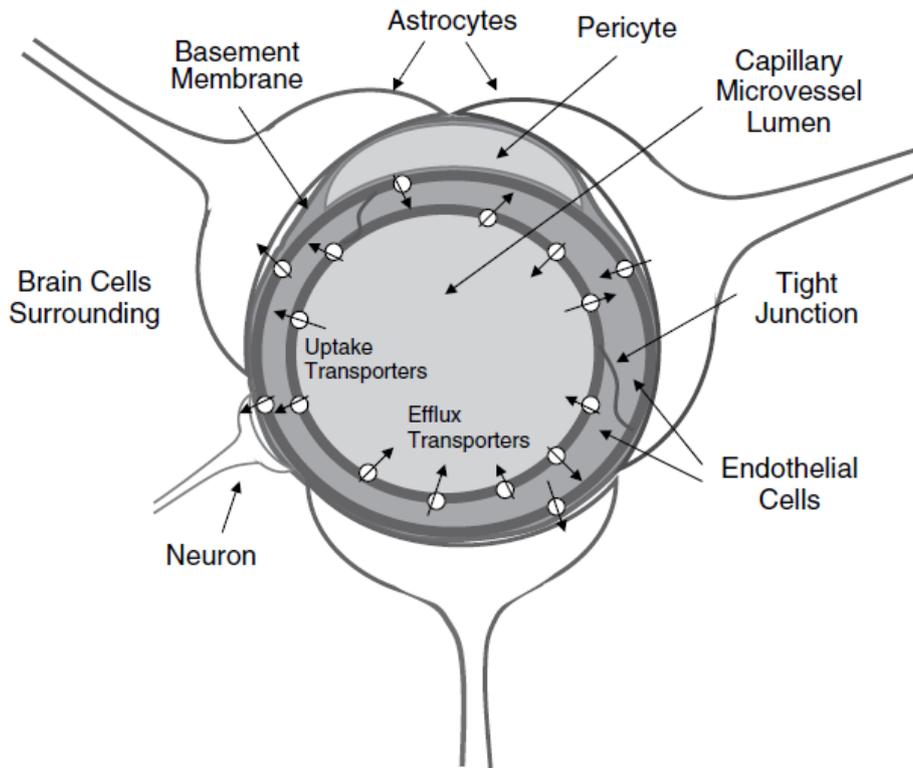
## **Barreira hematoencefálica**

O primordial conceito de barreira hematoencefálica (BHE) surgiu a partir de estudos utilizando injeções de corantes na circulação sanguínea. Paul Ehrlich, em 1885, verificou que após uma administração parentérica de corantes, praticamente, todos os órgãos do animal ficavam corados com exceção do cérebro e da medula espinhal. A partir deste facto Paul Ehrlich concluiu precocemente que o acontecimento se devia à falta de afinidade entre os corantes e o sistema nervoso central (SNC). No entanto num estudo realizado por Goldmann, em 1913, ao serem injectados corantes directamente no liquido cefalorraquidiano verificou-se que todo o tecido cerebral corava mas o resto dos tecidos permaneciam intactos, demonstrando assim que não se tratava de um falta de afinidade entre os corantes e os tecidos cerebrais mas sim da existência de uma barreira (Ribatti, Nico, Crivellato, & Artico, 2006). Em 1934, Stern descreve a importância da barreira não só numa componente de protecção mas também como mediadora de um ambiente físico-químico apropriado para um normal funcionamento do cérebro (Saunders et al., 2014).

Sendo a barreira hematoencefálica uma interface dinâmica entre a circulação periférica e o SNC uma vez que é através desta que existe o controlo entre o efluxo e o influxo de substâncias biológicas, as quais são necessárias para os processos metabólicos do cérebro e para a função neuronal, a integridade funcional e estrutural é vital para a manutenção da homeostase cerebral (Lakhan et al., 2013). De um modo geral a barreira hematoencefálica é uma barreira selectiva que tem na sua constituição astrócitos, pericitos, neurónios, matriz extracelular e células endoteliais especializadas, estas por sua vez encontram-se unidas por “tight junctions” como está demonstrado na Figura 1 (Ilbay, Dalcik, & Yardimoglu, 2011).

As funções da barreira hematoencefálica podem ser classificadas através de três mecanismos: físico, metabólico e de transporte. A componente física da barreira

corresponde ao complexo formado entre as várias células através das “tight junctions”, impedindo assim a difusão paracelular de alguns compostos. A componente metabólica é constituída por enzimas amplamente expressas nas células endoteliais do cérebro, como por exemplo a CYP P450, a monoamina oxidase e a dopa descarboxilase, que impedem a entrada de moléculas através da sua metabolização. A componente de transporte é constituída por proteínas de transporte, receptores para a endocitose e *ATP-binding proteins* que promovem o influxo de nutrientes e iões essenciais à manutenção da homeostase do SNC e o efluxo de toxinas (Afawi, 2011).



**Figura 1 – Representação da estrutura da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016)**

## Transporte de fármacos

Sendo os distúrbios do SNC a segunda maior área de terapia após a doença cardiovascular e existindo muitas enfermidades para as quais não há tratamentos satisfatórios torna-se de grande relevância um investimento na área por parte da indústria farmacêutica (Kerns & Di, 2016).

A barreira hematoencefálica é das barreiras mais limitantes à penetração de compostos comparativamente à maioria das barreiras de membrana constituintes do nosso organismo (Kerns & Di, 2016), assim os mecanismos de protecção exercidos constituem o principal obstáculo ao desenvolvimento de novas terapêuticas (Misra, Ganesh, & Shahiwala, 2003). Em doenças como, por exemplo, epilepsia ou esquizofrenia a permeabilidade da barreira hematoencefálica aos fármacos que actuam no SNC torna-se fundamental (Singh, 2013), estima-se que 100% das moléculas de grande dimensão e 98% das moléculas de pequena dimensão desenvolvidas não conseguem ultrapassar a barreira (Pardridge, 2015). Contudo, as moléculas que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica fazem-no por transporte passivo, bombas de efluxo, proteínas transportadoras ou por perda da integridade da barreira (Mikitsh & Chacko, 2014). Na Figura 2 encontram-se representados esses mesmos mecanismos.

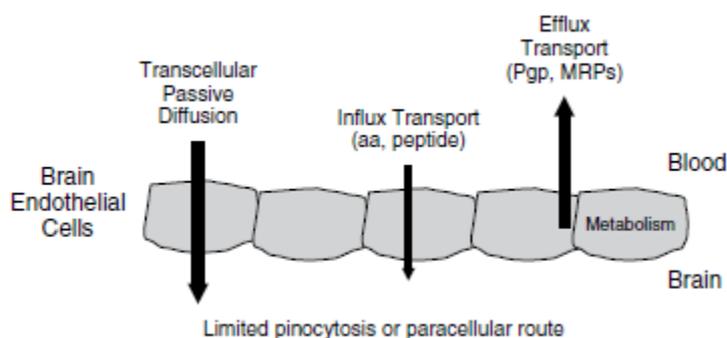


Figura 2 – Representação dos mecanismos de penetração da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016)

O transporte passivo ocorre por variações no gradiente de concentração, não requerendo gasto de energia. Pode ser feito por via paracelular em que a molécula hidrossolúvel de pequena dimensão passa entre as células através das “tight junctions”, ou por via transcelular em que a molécula lipossolúvel atravessa directamente as células epiteliais. Estudos experimentais e computacionais permitiram associar determinados parâmetros físico-químicos à permeabilidade da barreira hematoencefálica. A regra de Lipinski ou “Rule of five” foi um conjunto de condições desenvolvido estatisticamente que permitiam prever a absorção oral de um composto, no entanto, estudos posteriores permitiram relacionar a regra de Lipinski com a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2001). A regra de Lipinski baseia-se no:

- Peso molecular;
- Coeficiente de partição octanol/água – log P;
- Grupos doadores e receptores de protões.

O composto detém baixa permeabilidade e conseqüentemente baixa absorção e actividade a nível do SNC se mais do que um parâmetro não estiver conforme. Deste modo, para um composto atravessar a barreira hematoencefálica deve idealmente ser não ionizado, ter um peso molecular inferior ou igual a 400 Da, um log P inferior ou igual a 5, grupos doadores de protões menor ou igual a 3 e grupos de receptores de protões menor ou igual a 7 (Pajouhesh & Lenz, 2005). No entanto também se deve ter em conta outros factores como concentração, afinidade com as proteínas transportadoras, conformação, metabolismo e clearance do fármaco/polímero (Pathan et al., 2009)

Na fase do design do composto existem regras simples que aumentam a probabilidade da passagem através da barreira hematoencefálica, assim, se a soma dos átomos de azoto e oxigénio for inferior ou igual a cinco o composto tem maior probabilidade de entrar no SNC (Nicolazzo, Charman, & Charman, 2006).

Apesar do transporte passivo ser o método mais comum e estudado que os compostos utilizam para atravessar a barreira hematoencefálica, o interesse pelo transporte mediado por proteínas transportadoras tem vindo a aumentar. Este meio é muito utilizado para o transporte de aminoácidos, glicose e outras moléculas essenciais à sobrevivência das células, sendo por isso, um método com grande relevância para o desenvolvimento de novos fármacos (Girardin, 2006).

A perda de integridade da barreira hematoencefálica também permite aumentar a sua permeabilidade, sendo eventualmente uma das causas da progressão de determinadas doenças do SNC (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010). Um estudo realizado em ratos no qual se promovia a alteração propositada da integridade da barreira hematoencefálica para o tratamento de tumores cerebrais já foi concretizado, no entanto, este tipo de estratégia terapêutica apresenta muitas limitações quer éticas quer fisiológicas (Blanchette & Fortin, 2011).

### **Parâmetros usados na quantificação da permeabilidade da barreira hematoencefálica**

Devido a realização de inúmeros ensaios experimentais existem vários algoritmos definidos para a caracterização quantitativa da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Das fórmulas mais relevantes para o estudo da permeabilidade da barreira é de destacar:

O BUI (*brain uptake index*) que consiste na utilização de compostos marcados radioativamente, em que um deles ( $^{14}\text{C}$ ) serve de referência e atravessa livremente a barreira hematoencefálica enquanto o outro composto ( $^3\text{H}$ ) encontra-se ligado ao composto a testar. A equação permite, portanto, calcular a absorção do composto testado (Rooy et al., 2011)

$$\text{BUI} = \frac{{}^3\text{H brain}/{}^{14}\text{C brain}}{{}^3\text{H injected}/{}^{14}\text{C injected}}$$

(Rooy et al., 2011)

A equação  $K_{in}$  representa a taxa de transporte do fármaco (sangue – cérebro) através da barreira hematoencefálica (Hakkarainen, 2013).

$$K_{in} = C_{total,brain} - C_{plasma} \times \frac{\text{intravascular volume of brain}}{\text{study time} \times C_{plasma}}$$

O parâmetro mais usado na quantificação da passagem de um fármaco pela barreira hematoencefálica e consequentemente a sua actividade no SNC é o ratio entre a concentração de fármaco no cérebro e no sangue (log BB), quando atingido o estado estacionário corresponde à afinidade que um composto apresenta para com o cérebro e o sangue, respectivamente (Kaznessis, 2014).

No entanto estudos indicam que a actividade farmacológica é exercida pela fracção livre de fármaco no cérebro, logo, a equação log BB não é a mais fidedigna para demonstrar a actividade de um composto no SNC, uma vez que corresponde à fracção livre e ligada de fármaco (Mehdipour & Hamidi, 2009).

$$\log BB = \log \frac{C_{brain}}{C_{blood}}$$

A taxa de entrada do composto no cérebro (log PS) é considerado o parâmetro mais real para o cálculo da permeabilidade da barreira hematoencefálica e da fracção livre de fármaco. Tem como variáveis a taxa de fluxo sanguíneo (F) e constante de afluxo para o cérebro ( $K_{in}$ ) (Liu, Tu, Kelly, Chen, & Smith, 2004).

$$\log PS = -F \ln \left( 1 - \frac{K_{in}}{F} \right)$$

Conclui-se que para cada composto não se pode utilizar apenas um algoritmo para prever a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a actividade no SNC.

deve-se correlacionar os vários parâmetros anteriormente referidos (Mehdipour & Hamidi, 2009).

### **Métodos de estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica**

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo moroso e acarreta muitos custos, sendo por isso essencial a utilização de novas tecnologias *in vivo*, *in vitro* e *in silico* que permitam prever as propriedades de um novo composto na primeira fase de desenvolvimento (Paul et al., 2010).

Actualmente, o percurso a ser escolhido no estudo da permeabilidade começa pelos métodos *in silico*, que permitem avaliar milhares de compostos e seleccionar os que têm potencial para passar a fase seguinte. Fase seguinte essa que envolve o estudo *in vitro*, em que é possível determinar qual o mecanismo associado à permeabilidade da barreira hematoencefálica. Por último os métodos *in vivo* são realizados de modo a determinar a actividade de composto num sistema vivo. O custo associado aumenta progressivamente dos métodos *in silico* para os métodos *in vivo* (Kerns & Di, 2016).

## Métodos *in silico*

Estes métodos consistem na determinação das propriedades farmacocinéticas de um composto através de uma simulação computacional, mesmo antes de este ser sintetizado. Estudos indicam que 50% dos compostos desenhados acabam por ser excluídos devido às propriedades farmacocinéticas. Este método é cada vez mais comum uma vez que o seu baixo custo e maior rapidez permite uma redução da componente experimental numa primeira fase de estudo (Kaznessis, 2014).

Embora não sejam os métodos de eleição para a determinação final da permeabilidade, a sua importância deve-se ao facto de actuarem com um filtro na selecção dos compostos desenhados. Deste modo o software ao ser desenvolvido deve seguir diferentes etapas de modo a aumentar a sua fiabilidade e a sua precisão (Naik & Cucullo, 2012; Vilar, Chakrabarti, & Costanzi, 2010):

- Selecção de dados – os métodos *in silico* têm por base os dados obtidos experimentalmente em testes *in vitro* e *in vivo*. A qualidade dos dados depende do método experimental utilizado e a quantidade deve ser suficiente para uma análise estatística coerente. Os dados experimentais com maior interesse são obtidos pelo método de perfusão *in situ*;

- Regra de Lipinski – o software deve ser programado de modo a avaliar a permeabilidade dos compostos segundo a regra de Lipinski;
- Interpretação de resultados – a interpretação pode ser simples, BHE (+/-), SNC (+/-), consoante a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a actividade no sistema nervoso central, respectivamente; ou pode ser detalhada na qual são apresentados os valores de log BB e log PS.
- Validação – a sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade, capacidade de previsão e margem de erro do software deve ser validada pela comparação com dados descritos na literatura.

### Métodos *in vitro*

Os métodos *in vitro* podem ser utilizados de modo a aprofundar o estudo dos mecanismos de transporte e permeabilidade da barreira hematoencefálica, uma vez que são muito fiáveis e apresentam um bom rendimento. Estes modelos devem mimetizar as condições *in vivo*, ser simples e reprodutíveis. Existem duas categorias principais, os que utilizam membranas artificiais e os que utilizam crescimento em cultura de células epiteliais (Jouyban & Soltani, 2010).

O PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) e IAM (*immobilized artificial membrane*) são exemplos de métodos que utilizam membranas artificiais. O IAM é uma técnica cromatográfica e baseia-se na simulação de uma membrana lipídica (Naik & Cucullo, 2012). O PAMPA é composto por dois compartimentos, um dador e um receptor, que se encontram separados por uma membrana. O ensaio é realizado através da recolha de alíquotas da fase receptora a tempos previamente definidos que serão posteriormente quantificadas por um método analítico (Carpenter et al., 2014). São métodos que aparentam ser úteis na avaliação de compostos que ultrapassam a barreira hematoencefálica por difusão passiva, no entanto, se o transporte for efectuado por proteínas transportadoras este método não consegue prever a absorção cerebral (Campbell, Regina, & Kharasch, 2014; Nicolazzo et al., 2006).

O método que utiliza as células epiteliais consiste na promoção do crescimento de células de diferentes animais e as células seleccionadas podem ser derivadas do cérebro ou de outros epitélios. Para a interpretação final dos resultados deve-se ter em conta as variações possíveis, como a diferença na estrutura dos complexos celulares, alterações fenotípicas, entre outros (Jouyban & Soltani, 2010).

### Métodos *in vivo*

Os dados obtidos nos métodos *in vivo* são utilizados como referência uma vez que se trata de uma representação fiel ao processo fisiológico (Bickel, 2005). Os métodos utilizados e os parâmetros que estes permitem calcular encontram-se descritos na Tabela 1 (Bickel, 2005; Hakkarainen, 2013):

| <b>Método</b>             | <b>Parâmetros</b>              |
|---------------------------|--------------------------------|
| Administração intravenosa | $\log BB; K_{in}$              |
| BUI (Brain uptake index)  | $\log PS; K_{in}$              |
| Perfusão <i>in situ</i>   | $\log PS; K_{in}$              |
| Microdiálise              | $\log BB; K_{in}; f_{u,brain}$ |

**Tabela 1 – Exemplos de métodos *in vivo* e parâmetros possíveis de calcular**

Os modelos até à data desenvolvidos permitem prever maioritariamente a passagem dos compostos pela barreira hematoencefálica por transporte passivo (Bickel, 2005) e utilizam como principal parâmetro o log BB (Hakkarainen, 2013). Actualmente existem diversos softwares comercializados, como demonstrado na Tabela 2. Previamente à aquisição do software é recomendada a revisão dos parâmetros que o próprio software permite calcular e a realização de um teste com um composto cujos dados já sejam conhecidos de modo a verificar a sua capacidade de previsão (Kerns & Di, 2016).

| <b>Software</b>               | <b>Empresa</b>      | <b>Parâmetros estudados</b>                                   |
|-------------------------------|---------------------|---|
| Percepta                      | ACD Labs            | $\log PS; \log BB; PS \times f_{u,b}; f_{b,u}; P_{-gp}efflux$ |
| ADMET Predictor <sup>TM</sup> | Simulations Plus    | $MDCK P_{app}; P_{-gp}efflux; \log BB$                        |
| QikProp <sup>TM</sup>         | Schrodinger         | $MDCK P_{app}; Caco - 2P_{app}$                               |
| Discovery Studio              | Accelerys           |   |
| Volsurf <sup>TM</sup>         | Molecular Discovery |   |

**Tabela 2 – Softwares comercializados que permitem o estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Kerns & Di, 2016)**

## **Alterações disruptivas e não disruptivas na BEE**

Numa inflamação sistémica pode ocorrer uma alteração na barreira hematoencefálica, ou seja, existe uma capacidade de resposta por parte da BEE face à inflamação. Este termo de “alteração na barreira” não se refere apenas à permeabilidade, uma vez que, a permeabilidade remete para uma difusibilidade das substâncias através da BEE e o movimento destas não é inteiramente regulado por difusão. Embora o processo de difusão seja de relevante importância, quer o movimento das moléculas bem como das células são sujeitos a outros processos específicos ou regulados. Assim sendo a alteração da barreira hematoencefálica pode ser disruptiva ou não disruptiva dependendo da presença ou ausência de uma interrupção física na barreira (Varatharaj & Galea, 2017).

- Numa alteração disruptiva na barreira hematoencefálica ocorrem modificações geralmente a nível histológico; ocorre uma mudança visível a nível da estrutura histológica, ou seja, existe alteração na anatomia; é detectada usando marcadores inertes, de um modo geral não existe afinidade a qualquer substância; não é um pré requisito para a movimentação celular mas pode ocorrer se essa movimentação for intensa; pode dever-se aos seguintes intervenientes: alterações nas “tight junctions”, desgaste do glicocálix, dano nas células endoteliais, aumento da movimentação vesicular, etc.
- Numa alteração não disruptiva na barreira hematoencefálica a modificação ocorre apenas ao nível molecular; não ocorre nenhuma alteração a nível da estrutura histológica; existe alteração na função; não é detectada usando marcadores inertes; existe afinidade a alguma substância; mecanismo principal subjacente à mudança na movimentação celular; pode dever-se aos seguintes intervenientes: produção de citocinas por células endoteliais; aumento dos receptores e transportadores do endotélio; alteração da função astrocitária; neuroinvasão patogénica aumentada; etc.

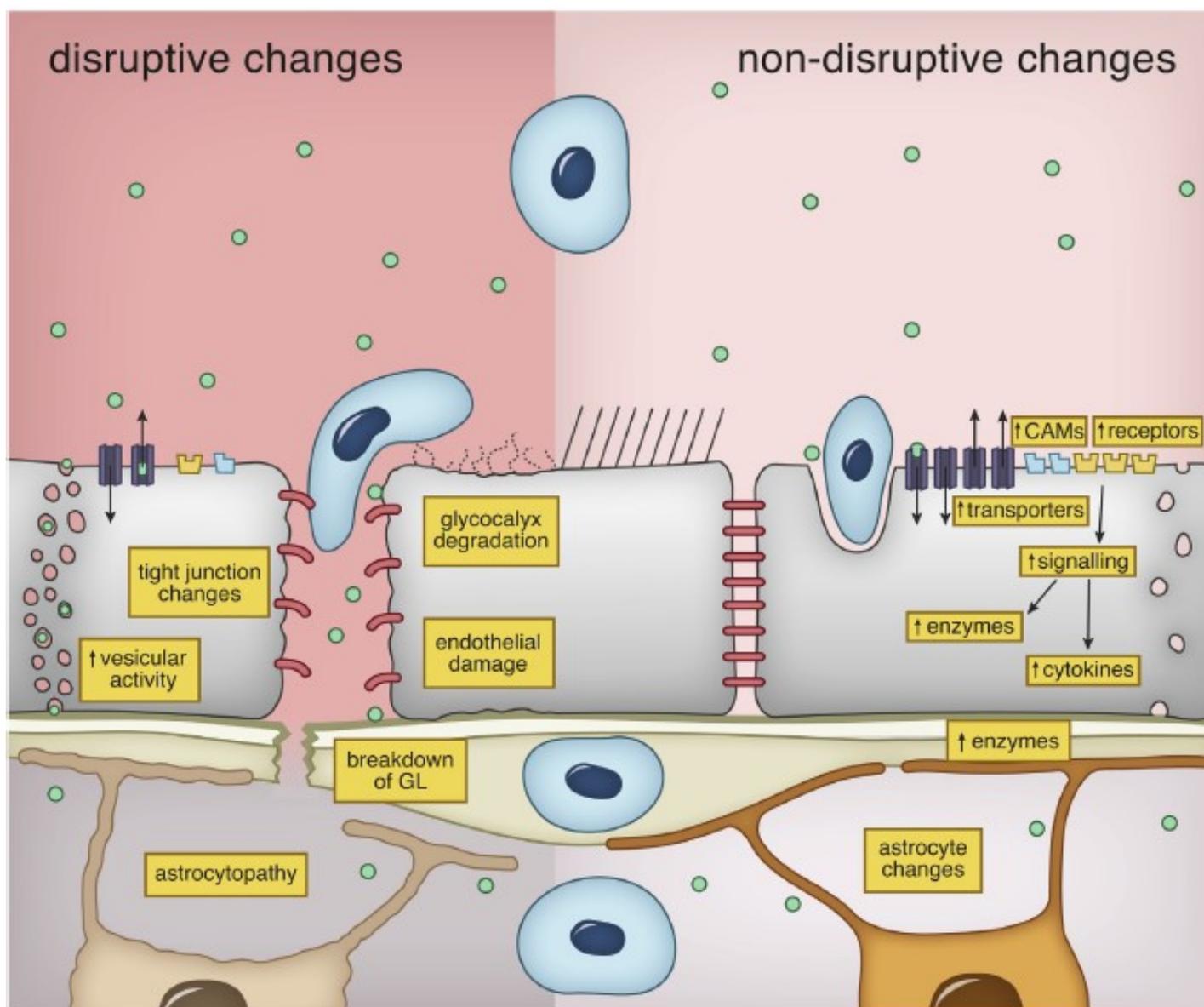


Figura 3 – Ilustração esquemática das alterações disruptivas e não disruptivas da BEE durante uma inflamação sistêmica (Varatharaj & Galea, 2017).

## **Alteração disruptiva da BEE na inflamação sistémica**

A exposição sistémica a um lipopolissacarídeo (LPS), um componente imunogénico das bactérias gram-negativas, é muito utilizada para modelar a inflamação sistémica. Em vários estudos foi demonstrado que a exposição do LPS conduz a uma alteração disruptiva na BEE, embora existam diversas variáveis *in vivo* tais como, a dose do LPS, a espécie do animal em estudo, a sua idade e o seu género, os solutos utilizados, etc. o que torna difícil uma generalização universal (Varatharaj & Galea, 2017).

## **Mecanismos de alteração disruptiva da BEE em modelos LPS**

Diversos mecanismos foram descritos sendo que os principais intervenientes são os prostanóides e o óxido nítrico (NO), ambos sintetizados pelo endotélio cerebrovascular e células circundantes.

### **Alteração das “tight junctions”**

As alterações infligidas nas “tight junctions” podem ser devidas aos prostanóides, óxido nítrico, bem como por outros mediadores tais como metaloproteinases da matriz e espécies reactivas de oxigénio. Através das vias intracelulares temos a sinalização da proteína quinase activada por mitogénio (MAP quinase), fosforilação da cadeia leve da miosina e rearranjo da actina-F.

### *Dano endotelial*

A danificação do endotélio durante uma inflamação sistêmica pode contribuir para a disfunção da barreira. Este dano pode ser causado por apoptose endotelial, anormalidades na membrana de dano mitocondrial. A apoptose anteriormente pode ser induzida pela sinalização da MAP quinase (Varatharaj & Galea, 2017).

### *Degradação do glicocálix*

O glicocálix é uma estrutura complexa formada por proteoglicanos e sialoproteínas que reveste o endotélio apical. A integridade desta estrutura é um contributo importante para o funcionamento da barreira, assim sendo, a sua disfunção pode levar ao aumento para permeabilidade paracelular. A exposição ao LPS conduz a uma degradação do glicocálix.

### *Degradação da glia limitante*

A glia limitante é a camada mais interna da barreira hematoencefálica. As MMPs podem levar a degradação da matriz extracelular e por consequente à degradação da glia limitante.

### *Alterações dos astrócitos*

Os astrócitos induzem e mantêm a barreira hematoencefálica e formam a glia limitante. Assim sendo a sua destruição está associada à interrupção da BEE. A exposição ao LPS pode induzir uma série de alterações estruturais e funcionais nos astrócitos que podem ser relevantes para uma alteração disruptiva na BBE. O LPS induz também grandes mudanças na transcrição de genes de astrócitos (Varatharaj & Galea, 2017).

## **Alteração não disruptiva da BEE na inflamação sistémica**

Se durante uma inflamação sistémica estiver ausente uma alteração disruptiva da BEE não significa que a esta não seja alterada, dado que podem ocorrer alterações não disruptivas. Estudos demonstram que as “tight junctions” podem permanecer intactas durante a inflamação sistémica e as alterações podem surgir por outros mecanismos.

### *Transportadores*

Vários mecanismos de transporte da BEE podem ser alterados pela inflamação sistémica, tais como, a desregulação do transportador de efluxo multifuncional da P-glicoproteína localizado no pé do astrócito, transportadores de aniões orgânicos, transportadores de monocarboxilatos, de aminoácidos, da  $\beta$ -amilóide, da leptina, e da prostaglandina E2. Há também evidencia de um aumento do influxo de transportadores responsáveis pelo TNF- $\alpha$ , insulina, monoaminas, enzimas lisossomais, factor inibidor da leucemia, proteína viral gp120.

### *Citocinas*

As citocinas medeiam directamente algumas alterações não disruptivas da BEE (Varatharaj & Galea, 2017).

### *Prostaglandinas*

O LPS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  promovem a expressão da ciclooxigenase (COX) no endotélio cerebral, o perfil transcricional das células é alterado para favorecer a produção da prostaglandina E2. A resposta é polarizada e a secreção da PGE2 é quatro vezes maior no lado basal comparativamente ao lúmen, ou seja, há comunicação de sinais inflamatórios através de uma BEE intacta. A exposição do LPS também actua nas vias de transporte da BEE de modo a reduzir o efluxo de PEG2 contribuindo para o aumento da concentração cerebral desta.

### *Transmigração celular*

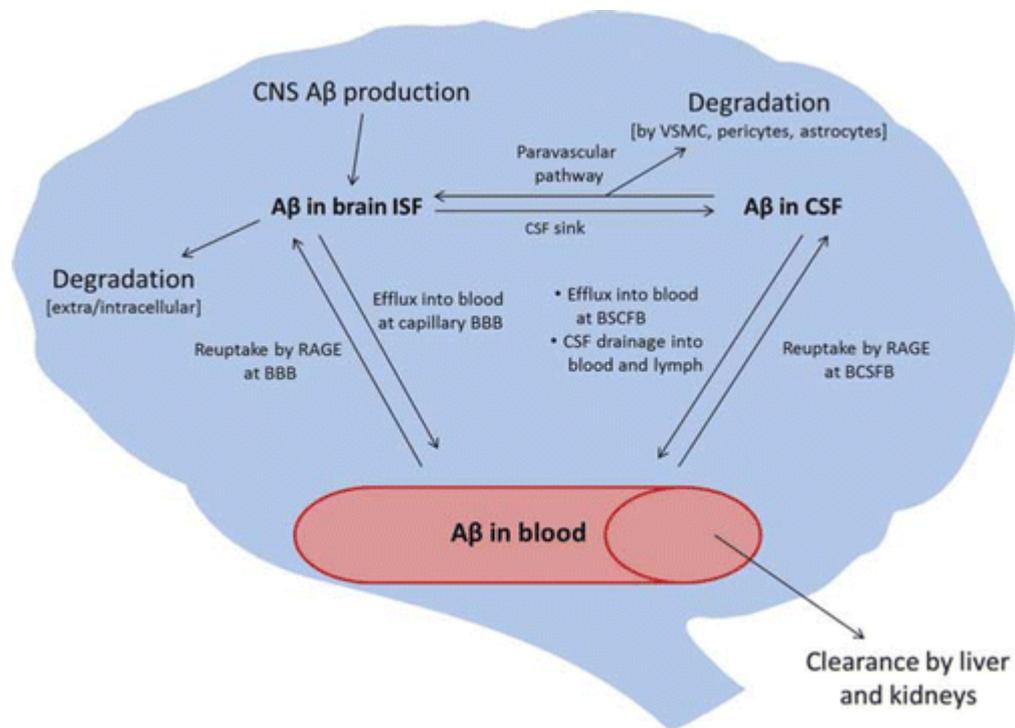
A passagem das células através da BEE ocorre principalmente nas vénulas pós-capilares e por duas vias, paracelular ou transcelular. Ocorre o encapsulamento de uma pequena quantidade de plasma que acompanha a célula através do seu curso através do endotélio. Um exemplo disso é a diapedese. Embora o influxo celular no SNC não seja fisiologicamente não disruptivo pode levar a uma alteração disruptiva se for pronunciado (Varatharaj & Galea, 2017).

## **Aplicações clínicas**

A doença de Alzheimer e esclerose múltipla são exemplos de condições que são principalmente neurodegenerativas ou neuroinflamatórias. Em muitos casos não está claro se as alterações na BEE são a causa ou o efeito da neuropatologia, e é possível que as alterações da BEE e a neuropatologia se complementem e contribuam para a progressão da doença.

### *Doença de Alzheimer*

As alterações da BEE podem ser um passo precoce e importante na patogénese. Algumas alterações resultam na diminuição da depuração do  $\beta$ -amilóide através de alterações nas proteínas de transporte. A acumulação de  $\beta$ -amilóide pode danificar a unidade neurovascular e levar a uma ruptura (Erickson & Banks, 2013)



**Figura 4 – Vias de depuração da β-amilóide no cérebro (Erickson & Banks, 2013).**

### *Esclerose Múltipla*

Um passo chave na patogénese da Esclerose múltipla pensa-se ser devida à infiltração dos linfócitos T CD4+ no SNC (Varatharaj & Galea, 2017).



## **Metaloproteinases da Matriz**

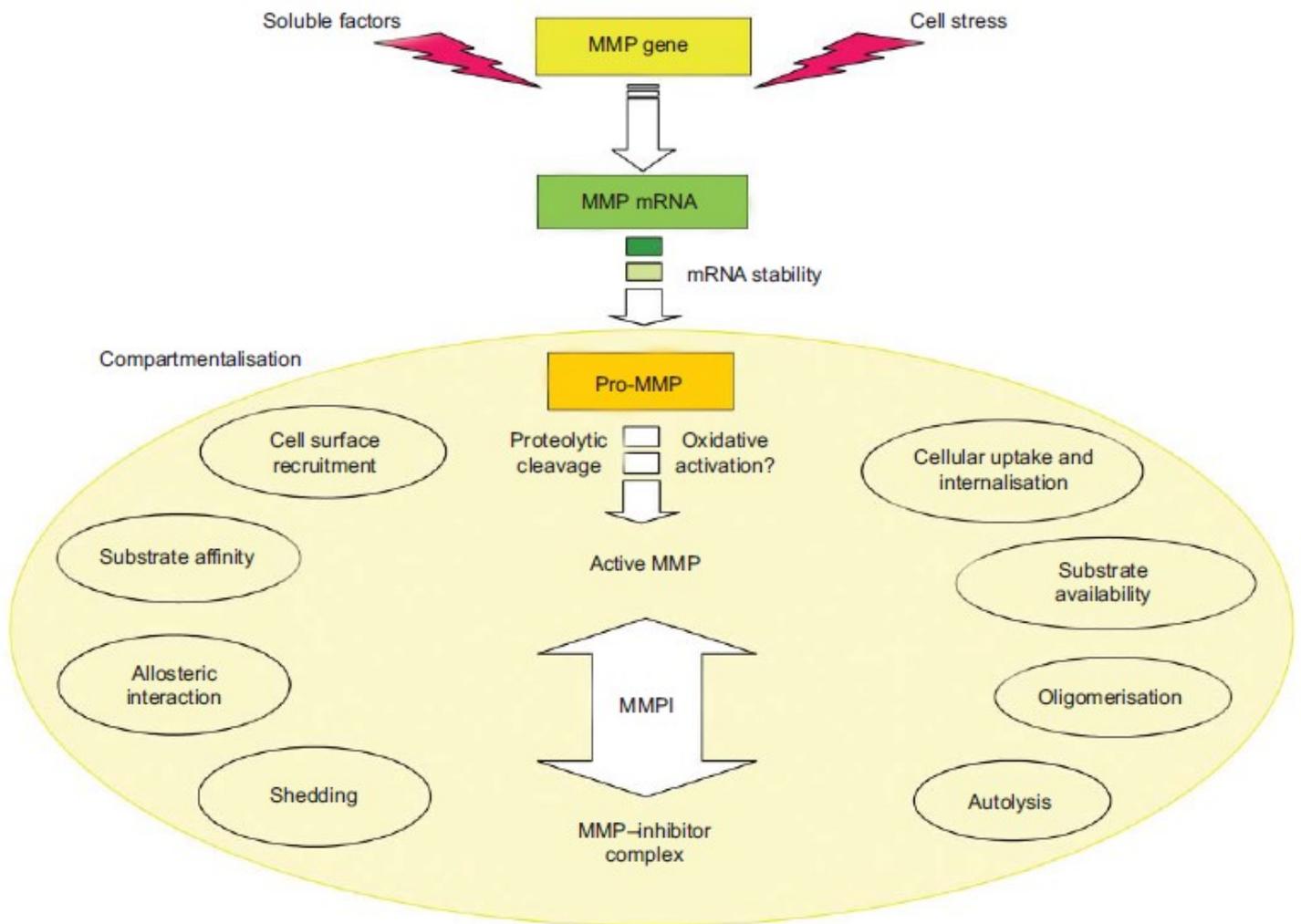
As metaloproteinases da matriz (MMPs) pertencem a uma família de enzimas do grupo das protéases, denominado metzincinas, devido ao íon zinco e resíduo de metionina existentes no centro activo, da qual também fazem parte as seralisinas, astacinas, adamalisinas (Hijova, 2014; Rivera, Khrestchatisky, Kaczmarek, Rosenberg, & Jaworski, 2010; Yamamoto, Murphy, & Troeberg, 2015). Formam um grupo de endopeptidases humanas zinco-dependentes capazes de exercer a sua actividade nos diferentes segmentos da matriz extracelular (ECM), nomeadamente no colagénio, elastina, laminina e na fibronectina, como também em substratos não pertencentes à matriz (Agrawal, Romero-Perez, A. Jacobsen, J. Villarreal, & M. Cohen, 2010; Singh, 2013; Visse & Nagase, 2003).

As MMP são sintetizadas como zimógenos inactivos os quais têm na sua constituição um domínio pró-peptídico (pro-MMPs) que deve ser removido para que a MMP se torne activa. O pró-peptido faz parte do “cysteine switch” que é um complexo intramolecular entre uma cisteína no domínio pró-peptido e o zinco no local activo. Com a clivagem do pró-peptido a cisteína dissocia-se do complexo permitindo assim a activação da MMP e a ligação e clivagem de substratos (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

Dado que estas enzimas possuem um largo espectro de acção, sendo por isso importantes reguladoras da homeostase tecidual, a actividade catalítica destas enzimas é fortemente controlada a quatro níveis (Loffek et al., 2011):

- Expressão génica com regulação transcriptacional e pós-transcriptacional;
- Localização extracelular e tipo de tecido ou célula da MMP libertada, designada de compartimentação;
- Activação pró-enzimática por remoção do pró-domínio;
- Inibição por inibidores específicos (ex. inibidores – Tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPs) e por inibidores não específicos (ex.  $\alpha_2$ -macroglobulina).

Na Figura 4 encontram-se esquematizados os quatro mecanismos de regulação referidos a cima.



**Figura 5 – A actividade das MMPs é regulada a quatro níveis: expressão génica maioritariamente por regularização da transcrição e da estabilidade do mRNA, compartimentação (regulação através do recrutamento pela superfície celular, disponibilidade de substrato e interacções proteicas ), activação pró-enzimática e inibição da proteólise (Loffek et al., 2011).**

Num enquadramento histórico a primeira MMP humana foi descoberta em 1968 no tecido da pele sendo que a primeira MMP (MMP-1) foi descoberta por Jerome Gross e Charles Lapiere em 1962 num girino. Desde esse momento diversas MMP foram descritas em inúmeras espécies e em 1971 tomou-se conhecimento de que estas eram sintetizadas como precursores inactivos, denominados de zimógenos, que posteriormente necessitariam de ser activados. Em relação aos inibidores das MMPs, o primeiro inibidor tecidual de metaloproteína-1 (TIMP-1) foi identificado em 1975 e até aos dias de hoje foram descritos 4 TIMPs (TIMP-1-4). Em 1990 foi descoberto o mecanismo de activação “cysteine switch” e desde esse momento o conhecimento das MMP aumentou consideravelmente. Com a exposição do centro catalítico sabe-se agora que há uma interacção quer com proteína da matriz extracelular quer com proteínas fora desta, interferindo assim em vários processos celulares. Até a data várias MMPs novas foram descobertas, tais como a MMP-20, MMP-26 e MMP-28 (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

As MMPs pertencem a uma família muito variada mas que partilham em comum várias propriedades e domínios estruturais. Estas enzimas podem, no entanto, ser agrupadas com base no domínio estrutural e na ligação ao substrato (Visse & Nagase, 2003):

- Colagenases que incluem MMP-1, -8 e -13;
- Estromelinas que incluem MMP-3 e -10;
- Gelatinases que incluem MMP-2 e -9;
- Matrilisinas que incluem MMP-7 e -26;
- MMPs de membrana (MT-MMPs);
- Outras.

Dos domínios estruturais que estão presentes em todas as MMP podemos destacar o peptídeo sinal, pro-domínio e o domínio catalítico. Na Figura 4 pode ser observado que as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são as únicas que contêm três repetições de fibronectina no seu domínio catalítico. Algumas MMP têm o local de reconhecimento da furina antes do domínio catalítico o que permite uma activação

intracelular pela furina. Todas as MMP têm uma região articular flexível e um domínio da hemopexina à exceção da MMP-7 e da MMP-26. As MMPs-14; -15, -16 e -24 têm como complemento os domínios transmembranar e citosólico enquanto que as MMPs-17 e -25 são integradas na membrana plasmática através da âncora GPI (Loffek et al., 2011).

Tal como referido anteriormente, as metaloproteinases apresentam um largo espectro de acção e são expressas por diferentes tecidos e órgãos (Tabela 3 que se encontra em anexo) por isso torna-se essencial a manutenção de um equilíbrio na expressão destas enzimas. Em condições fisiológicas normais, a degradação da ECM é um fenómeno fulcral na morfogénese, reparação e remodelação de tecidos, no entanto, quando ocorre uma desregulação fisiológica (perda de equilíbrio MMP/TIMP), pode verificar-se um excesso de degradação da matriz extracelular que pode estar envolvida em mecanismos patológicos tais como doenças inflamatórias e vasculares, crescimento tumoral, doenças neurodegenerativas (Agrawal et al., 2010). Estudos demonstram a existência de uma sobre-expressão de MMPs em múltiplas doenças como Doença de Parkinson, Alzheimer, Encefalite Japonesa e Glaucoma, porém a função das enzimas nestas doenças ainda não está a ser investigada (Singh, 2013; Visse & Nagase, 2003). O envolvimento das MMPs nas patologias referidas tem gerado um grande interesse na descoberta de inibidores das metaloproteinases da matriz (iMMP) por parte da comunidade científica. Por outro lado, a falta de expressão das metaloproteinases também tem os seus efeitos nocivos (Tabela 4 que se encontra em anexo) (Loffek et al., 2011).

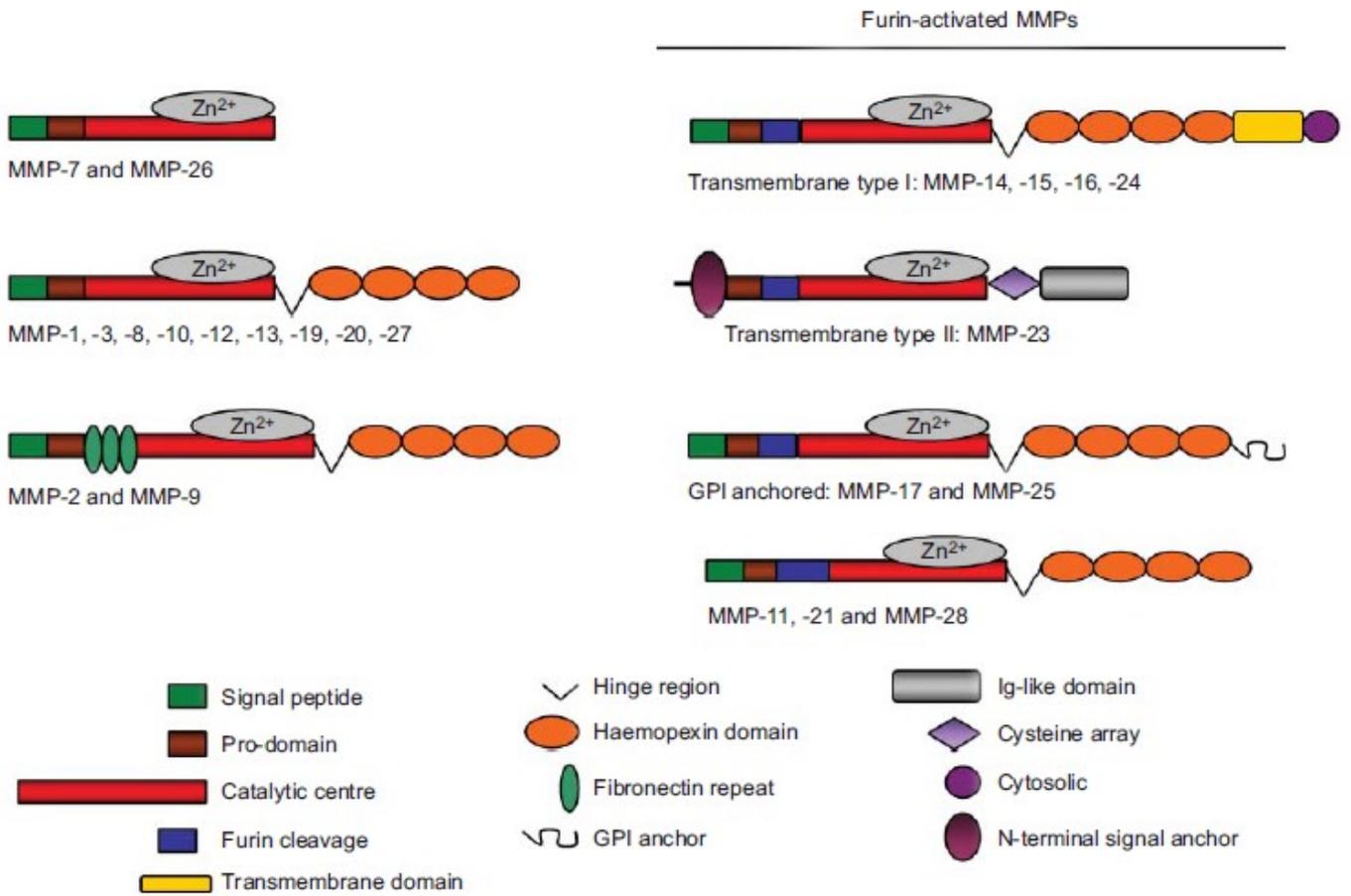
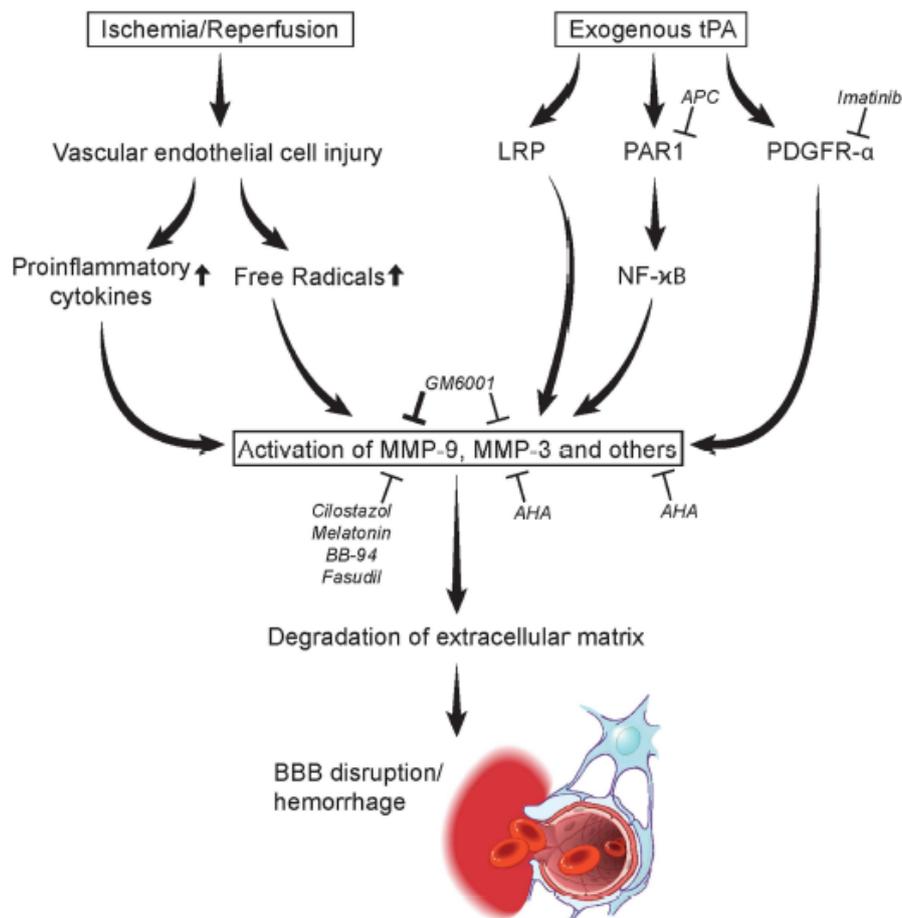


Figura 6 – Domínios estruturais dos diferentes grupos das MMP (Loffek et al., 2011)

## **Metaloproteinases da Matriz na Barreira Hematoencefálica**

Como referido anteriormente, estudos demonstram que em determinadas doenças há uma sobre-expressão de MMPs na barreira hematoencefálica, no entanto este tema ainda não foi amplamente estudado e ainda existem várias questões por responder.

Os poucos estudos realizados, indicam que a sobre-expressão de MMPs pode ser vantajosa uma vez que as MMPs estão implicadas na regeneração de tecidos, essencial na recuperação de um AIT (acidente isquémico transitório) ou mesmo AVC (acidente vascular cerebral), no entanto, também apresenta desvantagens uma vez que a sobre expressão das MMPs pode desencadear a degradação excessiva das proteínas existentes nas “tight junctions” das células epiteliais e consequentemente aumentar permeabilidade da barreira hematoencefálica e provocar uma hemorragia cerebral (Batra et al., 2010; Lakhan et al., 2013; Yang & Rosenberg, 2016).



**Figura 7 – Mecanismos de activação de MMP que levam à degradação da matriz extracelular e disfunção da BHE/ hemorragia (Lakhan et al., 2013)**

A nível do Sistema Nervoso Central as diferentes MMPs estão envolvidas na neuroinflamação, esclerose múltipla, aneurismas cerebrais, AVC, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e tumor cerebral (Tabela 5), uma vez que estas participam em processos fisiológicos e patológicos no cérebro e na própria barreira hematoencefálica. Como processos fisiológicos as MMPs contribuem para o desenvolvimento e manutenção do Sistema Nervoso Central, angiogénese, neurogénese, determinação da migração celular, proliferação e migração de percursoros celulares, crescimento e regeneração axonal, mielinogénese e remielinização e cessar a neuroinflamação. Dentro dos processos patológicos estão envolvidas em lesões e doenças do Sistema Nervoso Central, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, neuroinflamação, neurotoxicidade, desmielinização, angiogénese tumoral e metástases tumorais (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

### *Neuroinflamação*

As MMPs estão envolvidas na neuroinflamação através de quatro mecanismos. Em primeiro conseguem a activação das vias neuroinflamatórias quer de forma indirecta, activando enzimas que actua sobre moléculas de sinalização, tais como citocinas, receptores na superfície da célula, moléculas de adesão célula-célula ou como factores de coagulação; quer de forma directa activando directamente os processos neuroinflamatórios como é o caso da MT4-MMP (MMP-17) que activa o TNF- $\alpha$ . Em segundo as próprias MMPs actuam como moléculas sinalizadoras, neste caso enquadra-se a MMP-3 que é libertada na sua forma activa e desencadeia a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Em terceiro, as MMPs contribuem para a neurotoxicidade mediada por neuroinflamação e por último podem comprometer a integridade vascular uma vez que lisam a membrana basal cerebrovascular e as proteínas das “tight junctions”, comprometendo a integridade vascular e consecutivamente a barreira hematoencefálica (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

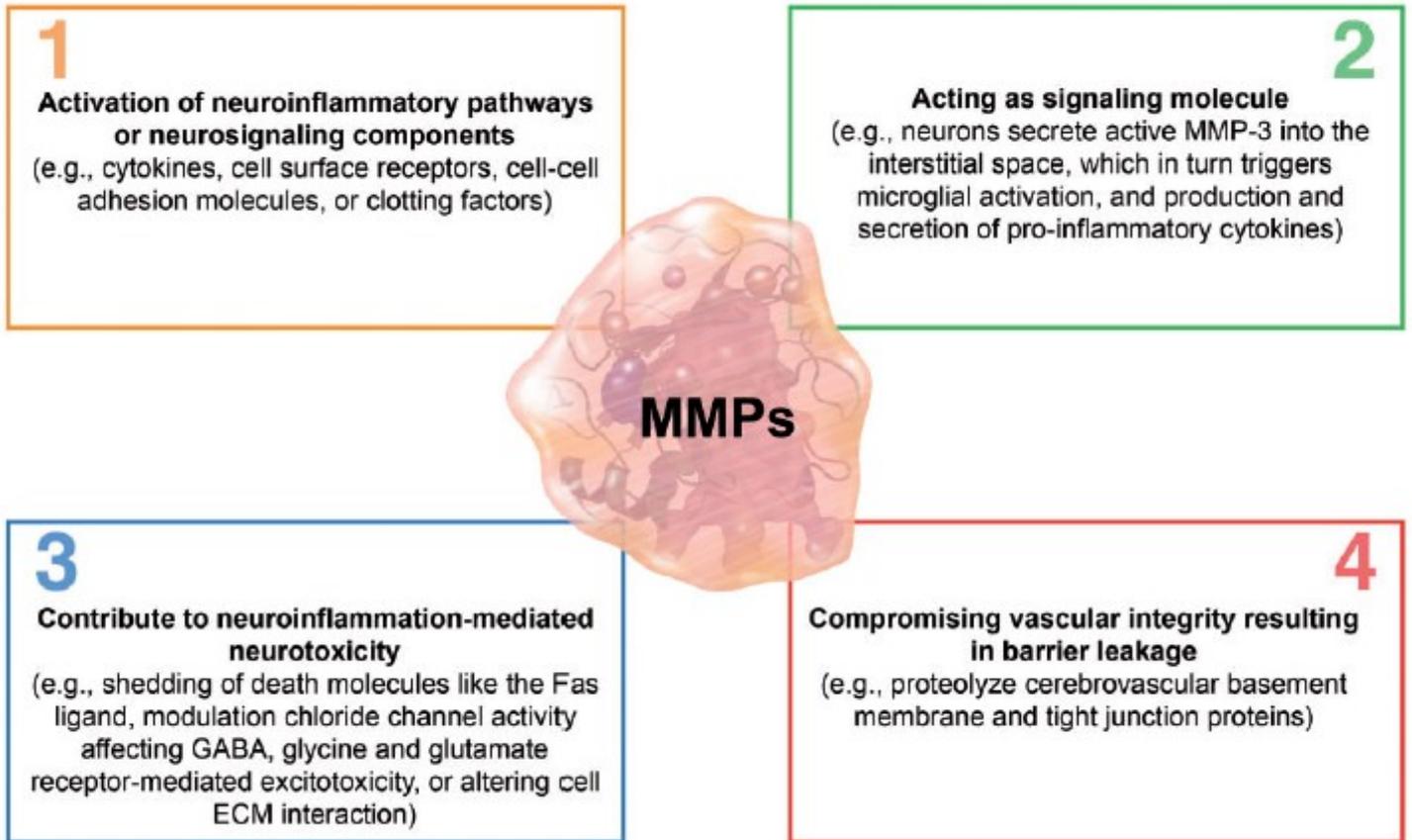
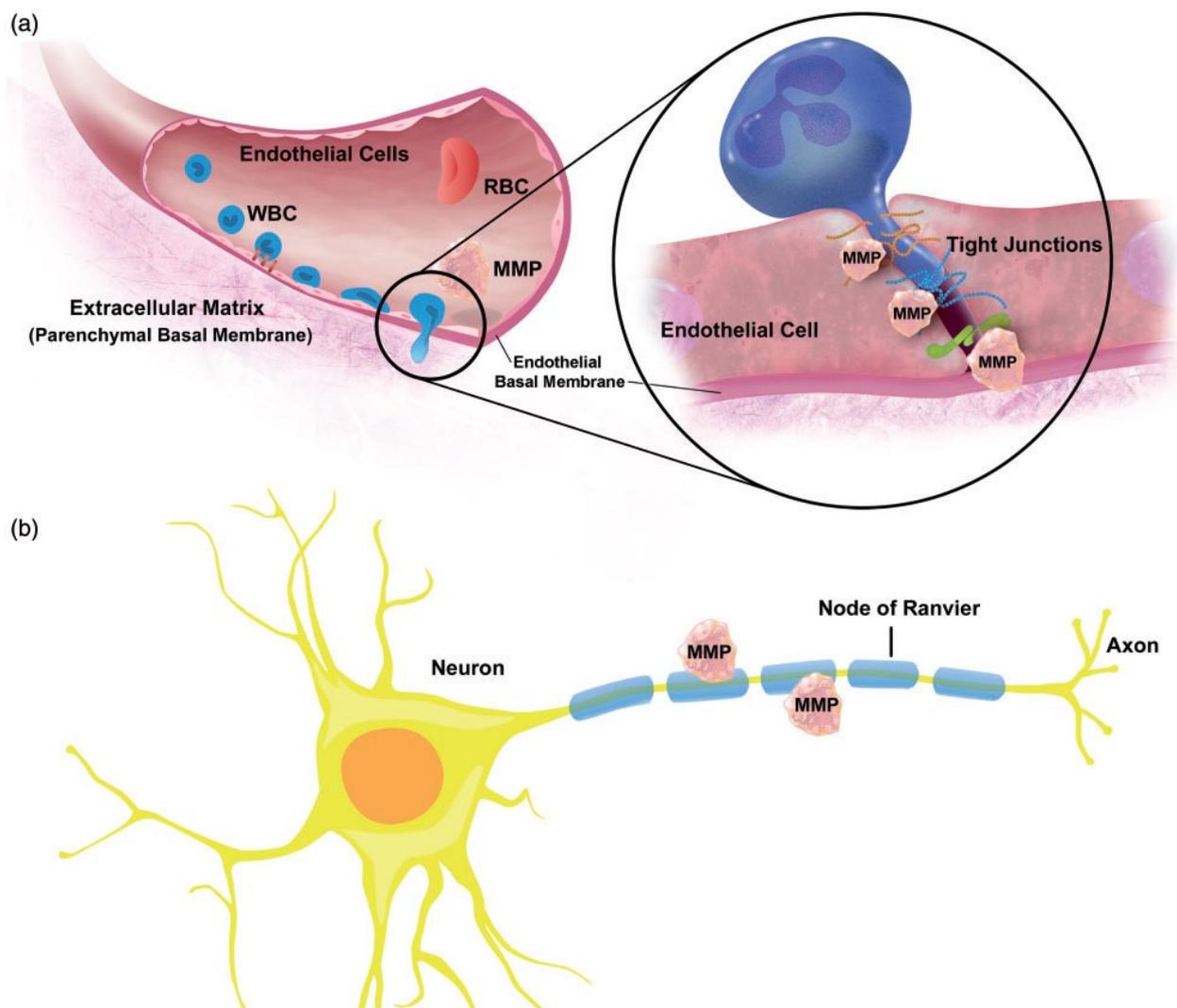


Figura 8 – MMPs na neuroinflamação (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)

### *Esclerose múltipla*

A esclerose múltipla é uma doença auto-imune neuroinflamatória em que as bainhas de mielina que cobrem os axónios e fibras nervosas no cérebro e na medula espinal encontram-se danificadas o que leva a uma interrupção da comunicação causando diversos sintomas da doença.

Na esclerose múltipla pensa-se que as MMPs actuam por dois mecanismos, as células endoteliais do cérebro e os leucócitos libertam as MMPs que por sua vez degradam as tight junctions e as proteínas da matriz extracelular, levando ao extravasamento de células imunes e através da desmielinização dos axónios neuronais. As MMPs encontradas em concentrações mais elevadas neste processo patológico foram as MMPs-2, -3, -7, -9, -12, -13 e -14 (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).



**Figura 9 – MMPs na Esclerose Múltipla (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)**

## *Aneurismas Cerebrais*

Um aneurisma é uma dilatação da parede de um vaso sanguíneo devido a uma fragilização dessa mesma área. As suas causas podem ser diversas e incluem envelhecimento, aterosclerose, hipertensão ou ferimentos graves, todos eles acompanhados por neuroinflamação. O seu extravasamento é uma enorme ameaça a vida por isso torna-se fundamental evitar essa ruptura. Uma vez que a sua detecção atempada é reduzida, a melhor abordagem será a prevenção evitando a formação do aneurisma. Para que tal seja possível é necessária uma compreensão da patologia em causa, uma teoria afirma que as MMPs degradam a matriz extracelular vascular contribuindo assim para a fragilização e conseqüente dilatação, por exemplo, em amostras recolhidas de cérebro humano os níveis de expressão proteica de plasmina, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 foram aumentados na parede lesada em comparação com artérias cerebrais saudáveis e a actividade proteolítica MMP-2/MMP-9 em geral foi também maior no tecido lesado.

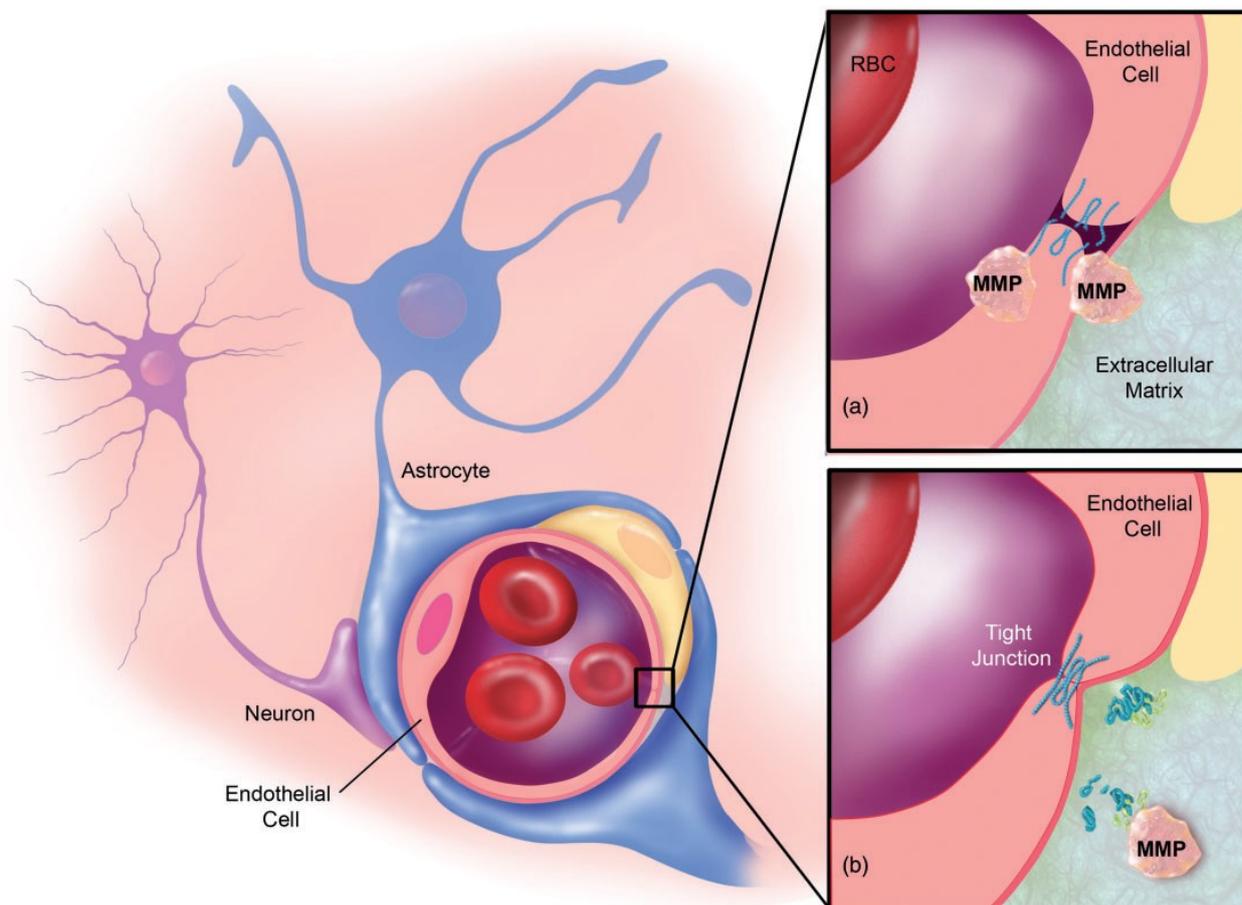
Estudos recentes indicam também que as MMPs estão envolvidas na calcificação vascular o que é mais um factor negativo e que poderá contribuir para a formação do aneurisma.

Em suma, a inibição das MMPs poderá ser uma possibilidade de limitar a progressão e o crescimento do aneurisma, reduzindo assim a necessidade de uma tratamento invasivo. (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

## *AVC*

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) ocorre quando existem problemas na irrigação sanguínea cerebral levando a uma perda da função cerebral, pode ser causado por um bloqueio num vaso sanguíneo ou devido a um sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo.

No AVC as principais MMPs envolvidas são as MMP-2, -3 e -9. Estas MMPs desempenham funções muito diferentes dependendo da fase do AVC, isto é, na fase aguda são libertadas pelas as células endoteliais e leucócitos que resulta na degradação da barreira hematoencefálica, da membrana basal neurovascular e da matriz extracelular. Enquanto que na fase de recuperação são secretadas pelos astrócitos e neurónios para a remodelação da matriz extracelular na unidade neurovascular (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).



**Figura 10 – MMP-9 no Acidente Vascular Cerebral (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)**

## *Epilepsia*

A epilepsia é uma glomeração de transtornos neurológicos em que os pacientes são diagnosticados após convulsões recorrentes e não auto conscientes.

O papel das MMPs na epilepsia ainda não é claro mas estudos sugerem que as MMPs contribuem para a epileptogénese, a progressão da epilepsia e a remodelação cerebral após convulsões. Um exemplo disso é que em ratos no qual foi extraída a MMP-9 estes são menos sensíveis às convulsões induzidas quimicamente em comparação a um controlo e que o inverso, ratos nos quais existe uma sobrepressão da MMP-9 são mais sensíveis à indução de convulsões químicas sugerindo assim que a MMP-9 afecta a epileptogénese e/ou a génese de convulsões.

Outra MMP envolvida no cérebro epiléptico é a MMP-2 embora seja menos compreendida do que a MMP-9. Estudos demonstram que a MMP-2 não está envolvida na morte das células neuronais mas poderá contribuir para a remodelação estrutural na epileptogénese dado que aparece aumentada após as convulsões (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

## *Doença de Alzheimer*

A doença de Alzheimer é caracterizada por uma acumulação cerebral de amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ), desenvolvimento de placas  $A\beta$ , formação de emaranhados neurofibrilares e neuroinflamação que em conjunto conduzem a uma neurodegeneração.

Diferentes estudos sugerem o aumento das MMPs -2, -3, -9, -10 mas ainda pouco se sabe sobre o efeito destas e a relação entre as MMPs e a  $A\beta$ , não existindo estudos que provem se as mudanças nos seus níveis contribuem para a progressão da doença ou se podem desempenhar um papel benéfico (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

## *Doença de Parkinson*

A doença de Parkinson é um distúrbio degenerativo e é caracterizado por uma acumulação de  $\alpha$ -sinucleína em neurónios dopaminérgicos resultando na formação de corpos de Lewy, em dano celular e morte neuronal de neurónios dopaminérgicos. Esta doença pode também ser acompanhada por uma neuroinflamação.

Estudos demonstram a actividade de MMPs -1, -2, -9 no tecido cerebral mas recentemente o foco é maioritariamente na MMP-3. Observou-se que a MMP-3 é

libertada de neurónios dopaminérgicos apoptóticos e que os seus níveis estão mais elevados do que em neurónios dopaminérgicos saudáveis. Por outro lado a MMP- parece estar envolvida na clivagem da  $\alpha$ -sinucleína. Em suma a MMP-3 parece estar envolvida na neurodegeneração dopaminérgica e neuroinflamação na doença de Parkinson (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

### *Metástases tumorais*

As MMPs são potenciais alvos para o tratamento do cancro pois estão presentes na biologia do próprio tumor. As MMPs participam na maioria das etapas do processo das metástases tumorais. Estão presentes na formação de células metastáticas no tumor primário, na migração das células metastáticas para a circulação sanguínea, extravasamento de células metastáticas através da barreira hematoencefálica, migração de células tumorais no cérebro e contribuem também para o microambiente e angiogénese tumoral (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016).

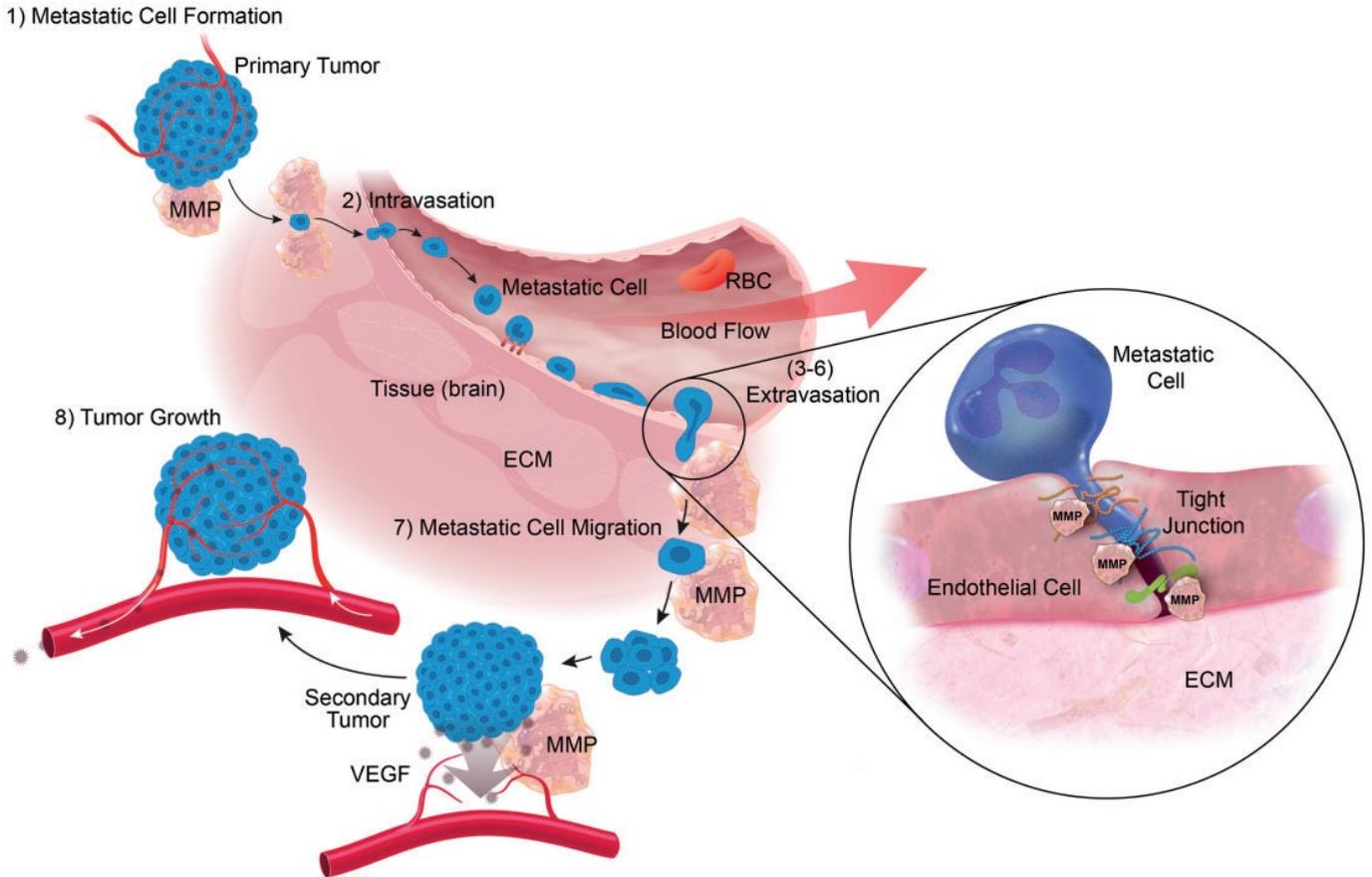


Figura 11 – MMP-9 nas metástases tumorais (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)

## **Metaloproteinases da Matriz e Restauração Dentária**

A dentina é constituída por minerais (50%), proteínas (30%) e água (20%) (Pashley et al., 2013) sendo que a ECM da dentina é composta maioritariamente por colagénio tipo I (90%) (Goldberg, Kulkarni, Young, & Boskey, 2012) Para a realização de um restauro dentário é necessário remover a componente mineral, de modo a expor o colagénio presente na matriz da dentina que vai actuar como elo de ligação entre a resina e a dentina mineralizada, formando a camada híbrida. Uma das causas da perda precoce da resina utilizada na restauração dentária é a presença de MMPs na dentina, pré-dentina e saliva (Chaussain et al., 2013)

No caso das restaurações dentárias é preferível a administração tópica de iMMPs, podendo estes ser aplicados após a remoção mecânica da componente mineral e antes da colocação da resina ou podem ser incorporados em colutórios. EDTA e clorhexidina são exemplos de iMMPs utilizados na prática dentária (Chaussain et al., 2013). A clorhexidina é o mais potente e mais utilizado, inibindo as MMPs da dentina e prolongado a durabilidade das ligações dentina-resina (Moon, Weaver, & Brooks, 2010).



## Bibliografia

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Neurobiology of Disease Structure and function of the blood – brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Afawi, Z. (2011). *Clinical And Genetic Aspects Of Epilepsy*.
- Agrawal, A., Romero-Perez, D., A. Jacobsen, J., J. Villarreal, F., & M. Cohen, S. (2010). Zinc-Binding Groups Modulate Selective Inhibition of MMPs, 3(5), 812–820. <http://doi.org/10.1002/cmdc.200700290.Zinc-Binding>
- Batra, A., Latour, L. L., Ruetzler, C. A., Hallenbeck, J. M., Spatz, M., Warach, S., & Henning, E. C. (2010). Increased plasma and tissue MMP levels are associated with BCSFB and BBB disruption evident on post-contrast FLAIR after experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(6), 1188–1199. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.1>
- Bickel, U. (2005). How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier, 2(January), 15–26.
- Campbell, S. D., Regina, K. J., & Kharasch, E. D. (2014). Significance of Lipid Composition in a Blood- Brain Barrier – Mimetic PAMPA Assay, (X). <http://doi.org/10.1177/1087057113497981>
- Carpenter, T. S., Kirshner, D. A., Lau, E. Y., Wong, S. E., Nilmeier, J. P., & Lightstone, F. C. (2014). A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophysj*, 107(3), 630–641. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.024>
- Chaussain, C., George, A., Menashi, S., Boukpepsi, T., Khaddam, M., Tjaderhane, L., ... Menashi, S. (2013). Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration, 4(November), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00308>
- Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2013). Blood – brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer ’ s disease, (July), 1500–1513. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.135>
- Girardin, F. (2006). Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development, 311–321.
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2012). NIH Public Access, 711–735.
- Hakkarainen, J. J. (2013). *In Vitro Cell Models in Predicting Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs In Vitro Cell Models in Predicting Blood- Brain Barrier Permeability of Drugs*.
- Hijova, E. (2014). Matrix metalloproteinases : their biological functions and clinical

implications implications, (February 2005).

Ilbay, G., Dalcik, C., & Yardimoglu, M. (2011). The Blood-Brain Barrier and Epilepsy.

Jouyban, A., & Soltani, S. (2010). Blood Brain Barrier Permeation.

Kaznessis, Y. (2014). A Review of Methods for Computational Prediction of Blood-Brain Partitioning A Review of Methods for Computational Prediction of Blood-Brain Parti- tioning, (September 2005). <http://doi.org/10.2174/1568015054863864>

Kerns, E. H., & Di, L. (2016). Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization.

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D., & Leonard, A. (2013). Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke, *4*(April), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fneur.2013.00032>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *46*, 3–26.

Liu, X., Tu, M., Kelly, R. S., Chen, C., & Smith, B. J. (2004). DEVELOPMENT OF A COMPUTATIONAL APPROACH TO PREDICT BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY ABSTRACT :, *32*(1), 132–139.

Loffek, S., Schilling, O., & Franzke, C.-W. (2011). Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance ", *38*(1), 191–208. <http://doi.org/10.1183/09031936.00146510>

Mehdipour, A. R., & Hamidi, M. (2009). Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood – brain barrier, *14*(November). <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.009>

Mikitsh, J. L., & Chacko, A. (2014). Perspectives in Medicinal Chemistry, 11–24. <http://doi.org/10.4137/PMC.S13384>.Received

Misra, A., Ganesh, S., & Shahiwala, A. (2003). Drug delivery to the central nervous system : a review ., *6*(2), 252–273.

Moon, P. C., Weaver, J., & Brooks, C. N. (2010). Review of Matrix Metalloproteinases ' Effect on the Hybrid Dentin Bond Layer Stability and Chlorhexidine Clinical Use to Prevent Bond Failure.

Naik, P., & Cucullo, L. (2012). In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Current and Perspective Technologies, *101*(4), 1337–1354. <http://doi.org/10.1002/jps.23022>.In

Nicolazzo, J. A., Charman, S. A., & Charman, W. N. (2006). Methods to assess drug permeability across the blood – brain barrier, (Illum 2004), 281–293. <http://doi.org/10.1211/jpp.58.3.0001>

Pajouhesh, H., & Lenz, G. R. (2005). Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs, *2*(October), 541–553.

- Pardridge, W. M. (2015). Blood – brain barrier delivery, (April). <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.013>
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., & Carrilho, M. (2013). NIH Public Access, 27(1), 1–34. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016.State>
- Pathan, S. A., Iqbal, Z., Zaidi, S. M. A., Talegaonkar, S., Vohra, D., Jain, K., ... Ahmad, F. J. (2009). CNS Drug Delivery Systems : Novel Approaches, 71–89.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, 9(MARch). <http://doi.org/10.1038/nrd3078>
- Rempe, Ralf G; Hartz, A. M., & Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood – brain barrier: Versatile breakers and makers. <http://doi.org/10.1177/0271678X16655551>
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., & Artico, M. (2006). Development of the Blood-Brain Barrier : A Historical Point of View, 3–8. <http://doi.org/10.1002/ar.b.20087>
- Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. A., & Jaworski, D. M. (2010). Metzincin Proteases and Their Inhibitors : Foes or Friends in Nervous System Physiology ?, 30(46), 15337–15357. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010>
- Rooy, I. Van, Cakir-tascioglu, S., Hennink, W. E., Storm, G., Schiffelers, R. M., & Mastrobattista, E. (2011). In Vivo Methods to Study Uptake of Nanoparticles into the Brain, 456–471. <http://doi.org/10.1007/s11095-010-0291-7>
- Saunders, N. R., Dreifuss, J., Dziegielewska, K. M., Johansson, P. A., Habgood, M. D., Møllgård, K., & Bauer, H. (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies : a walk through 100 years of history, 8(December), 1–26. <http://doi.org/10.3389/fnins.2014.00404>
- Singh, S. B. (2013). Novel Approaches for Brain Drug Delivery System-Review, 2(June), 36–44.
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The Blood-Brain Barrier in Systemic Inflammation. *Brain Behavior and Immunity*, 60, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Vilar, S., Chakrabarti, M., & Costanzi, S. (2010). Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors, 28(8), 899–903. <http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2010.03.010.Prediction>
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Yamamoto, K., Murphy, G., & Troeberg, L. (2015). Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biology*, 44–46, 255–263.

<http://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.007>

Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2016). MMP-Mediated Disruption of Claudin-5 in the Blood–Brain Barrier of Rat Brain After Cerebral Ischemia, (2), 333–345.  
<http://doi.org/10.1007/978-1-61779-185-7>



## Anexos

| MMP                                 | Cell types and organs   | Reference  |
|-------------------------------------|---|------------|
| <b>MMP-1 (collagenase 1)</b>        | Skin (Fb and KC), EC, chondrocytes, osteoblasts, macrophages, hepatocytes   | [44]       |
| <b>MMP-2 (gelatinase A)</b>         | Skin (Fb and KC), EC, chondrocytes, osteoblasts, osteocytes, monocytes, alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, mammary gland   | [69, 105]  |
| <b>MMP-3 (stromelysin 1)</b>        | Skin (Fb and basal KC), epithelial cells, mammary gland   | [44, 69]   |
| <b>MMP-7 (matrilysin-1)</b>         | Glandular epithelial cells in skin, parotid, liver, endometrium, mammary gland, prostate, pancreas, small intestinal crypts, peribronchial glands and conducting airways in the lung                | [107]      |
| <b>MMP-8 (collagenase 2)</b>        | Primarily by neutrophils  | [108]      |
| <b>MMP-9 (gelatinase B)</b>         | Skin (Fb and KC), EC, chondrocytes, osteoblasts, osteoclasts, monocytes, alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, invading trophoblasts  | [105, 106] |
| <b>MMP-10 (stromelysin 2)</b>       | Skin (Fb and KC), epithelial cells  | [44]       |
| <b>MMP-11 (stromelysin 3)</b>       | Uterus, placenta and involuting mammary gland   | [44]       |
| <b>MMP-12 (macrophage elastase)</b> | Macrophages, placenta   | [83, 109]  |
| <b>MMP-13 (collagenase 3)</b>       | Skin (Fb and KC), osteoblasts, osteocytes   | [110]      |
| <b>MMP-14 (MT1-MMP)</b>             | Skin (Fb and KC), osteoclasts, osteoblasts, articular cartilage   | [111]      |
| <b>MMP-15 (MT2-MMP)</b>             | Placenta, brain, heart  | [111]      |
| <b>MMP-16 (MT3-MMP)</b>             | Lung, kidney, spleen, heart, skeletal muscle, chondrocytes, reproductive tissue (ovary and prostate), placenta, intestine   | [111]      |
| <b>MMP-17 (MT4-MMP)</b>             | Brain, reproductive tissue (ovary and testis), colon, leukocytes  | [112]      |
| <b>MMP-19 (RASI)</b>                | Skin (KC), skeletal muscle, liver, lung, kidney, thymus, spleen, brain, heart, reproductive tissue (ovary, testis, prostate), mammary gland, placenta, colon, small intestine, pancreas, leukocytes | [113]      |
| <b>MMP-20 (enamelysin)</b>          | Dental tissue   | [86]       |
| <b>MMP-21</b>                       | Fetal: brain, kidney, liver   | [114]      |
| <b>MMP-23</b>                       | Adult: ovary, kidney, liver, lung, placenta, brain, peripheral blood leukocytes   |            |
| <b>MMP-24 (MT5-MMP)</b>             | Reproductive tissues (ovary, testis, prostate)  | [115]      |
| <b>MMP-25 (MT6-MMP)</b>             | Brain, kidney, lung, pancreas   | [109, 111] |
| <b>MMP-26 (matrilysin-2)</b>        | Skeletal muscle, lung, spleen, testis, kidney   |            |
| <b>MMP-27</b>                       | Kidney, uterus, placenta  | [116]      |
| <b>MMP-28 (epilysin)</b>            | Bone, kidney, heart   | [117]      |
|                                     | Skin (KC), brain, lung heart, kidney, testis, placenta, colon, intestine, pancreas  | [118]      |

Fb: fibroblasts; KC: keratinocytes; EC: endothelial cells.

Tabela 3 – Tecidos e células responsáveis pela expressão de MMPs específicas (Loffek et al., 2011)

| MMP                     | Phenotype  | Ref.                                 |
|-------------------------|--|--------------------------------------|
| <b>MMP-2</b>            | No overt phenotype, reduced body size<br>Reduced neovasculation and tumour progression<br>Decreased primary ductal invasion in the mammary gland<br>Decreased bone mineralisation, joint erosion, defects in osteoblast and osteoclast growth  | [68]<br>[69]<br>[70]                 |
| <b>MMP-3</b>            | No overt phenotype<br>Impaired contact dermatitis, impaired onset of T-cell proliferation<br>Defect in wound contraction<br>Altered secondary branching morphogenesis in the mammary gland   | [71]<br>[72]<br>[73]<br>[69]         |
| <b>MMP-7</b>            | No overt phenotype<br>Impaired tracheal wound repair<br>Innate immunity defects<br>Defective prostate involution   | [74]<br>[75]<br>[54]                 |
| <b>MMP-8</b>            | More susceptible to develop skin cancer, impaired wound healing in skin<br>Altered inflammatory response in wounds, delay of neutrophil infiltration<br>Altered TGF- $\beta$ signalling  | [76]                                 |
| <b>MMP-9</b>            | Impaired primary angiogenesis in bone growth plates<br>Resistant to bullous pemphigoid<br>Contact dermatitis: delayed resolution<br>Impaired vascular remodelling<br>Delayed healing of bone fractures   | [77]<br>[78]<br>[72]<br>[79]<br>[80] |
| <b>MMP-10</b>           | No overt phenotype<br>Pathological induced phenotype: pulmonary inflammation and mortality   | [81]                                 |
| <b>MMP-11</b>           | No overt phenotype<br>Decreased chemical-induced mutagenesis   | [82]                                 |
| <b>MMP-12</b>           | No overt phenotype<br>Impaired macrophage proteolysis<br>Resistant to cigarette smoke-induced emphysema  | [83]<br>[83]<br>[84]                 |
| <b>MMP-13</b>           | No overt phenotype<br>Induction of MMP-8 expression in <i>MMP13</i> <sup>-/-</sup> wounds, no difference in wound healing<br>Bone remodelling defects  | [85]<br>[86]                         |
| <b>MMP-14 (MT1-MMP)</b> | Premature death; skeletal defects and dwarfism<br>Normal at birth but develop multiple abnormalities (defect in remodelling of the connective tissue, increased bone resorption and defective secondary ossification centres) and die by 3–12 weeks<br>Angiogenesis defect and defects in lung and submandibular gland | [87]<br>[88]                         |
| <b>MMP-16 (MT3-MMP)</b> | Growth retardation   | [89]                                 |
| <b>MMP-17 (MT4-MMP)</b> | No overt phenotype   | [90]                                 |
| <b>MMP-19</b>           | Obesity and decreased skin carcinogenesis  | [91]                                 |
| <b>MMP-20</b>           | Defects in tooth enamel  | [92]                                 |
| <b>MMP-24</b>           | Abnormal response to sciatic nerve injury  | [93]                                 |
| <b>MMP-28</b>           | No overt phenotype; elevated macrophage recruitment in lung  | [94]                                 |
| <b>MMP-2/MMP-9</b>      | Impaired tumour invasion and angiogenesis  | [95]                                 |
| <b>MMP-2/MMP-14</b>     | Die immediately after birth with respiratory failure, abnormal vessels and immature muscle fibres  | [96]                                 |
| <b>MMP-9/MMP-13</b>     | Shortened bones  | [86]                                 |
| <b>MMP-14/MMP-16</b>    | Die one day after birth due to cleft palate  | [89]                                 |

TGF: transforming growth factor.

**Tabela 4 – Fenótipos dos ratinhos aos quais foram removidas as metaloproteínas (Loffek et al., 2011)**

| Nomenclature | Class/trivial or alternative name         | Involvement in CNS diseases   |
|--------------|---|---|
| MMP-1        | Collagenase-1/interstitial collagenase    | Neuroinflammation <sup>b</sup> , epilepsy <sup>a</sup> , AD <sup>a</sup> , brain cancer                                     |
| MMP-2        | Gelatinase A/72 kDa gelatinase            | Neuroinflammation, MS, cerebral aneurysms, stroke, epilepsy <sup>a</sup> , AD <sup>a</sup> , PD <sup>a</sup> , brain cancer |
| MMP-3        | Stromelysin-1                             | Neuroinflammation, MS, cerebral aneurysms, stroke, epilepsy <sup>a</sup> , AD <sup>a</sup> , PD, brain cancer               |
| MMP-7        | Matrilysin-1/PUMP-1                       | Neuroinflammation <sup>b</sup> , stroke, epilepsy <sup>a</sup> , AD <sup>a</sup>  |
| MMP-8        | Collagenase-2/neutrophil collagenase      | Neuroinflammation, brain cancer <sup>b</sup>  |
| MMP-9        | Gelatinase B/92 kDa gelatinase            | Neuroinflammation, MS, cerebral aneurysms, stroke, epilepsy, AD <sup>a</sup> , PD <sup>a</sup> , brain cancer               |
| MMP-10       | Stromelysin-2                             | Stroke, epilepsy <sup>b</sup> , brain cancer  |
| MMP-11       | Stromelysin-3                             | MS, stroke, brain cancer  |
| MMP-12       | Macrophage metalloelastase                | Neuroinflammation, MS, AD <sup>b</sup>  |
| MMP-13       | Collagenase-3                             | Neuroinflammation, brain cancer   |
| MMP-14       | Membrane-type-1 MMP (MT1-MMP)             | Neuroinflammation, cerebral aneurysms, MS, PD <sup>a</sup> , brain cancer   |
| MMP-15       | Membrane-type-2 MMP (MT2-MMP)             | MS, brain cancer  |
| MMP-16       | Membrane-type-3 MMP (MT3-MMP)             | MS, brain cancer  |
| MMP-17       | Membrane-type-4 MMP (MT4-MMP)             | Neuroinflammation <sup>a</sup> , MS <sup>a</sup> , AD <sup>b</sup> , brain cancer <sup>a</sup>                              |
| MMP-18       | Collagenase 4, xCol4, Xenopus Collagenase |   |
| MMP-19       | RASI-1 (Stromelysin-4)                    | Brain cancer <sup>b</sup>   |
| MMP-20       | Enamelysin                                |   |
| MMP-21       | X-MMP                                     | MS <sup>a</sup>   |
| MMP-23       | CA-MMP                                    |   |
| MMP-24       | Membrane-type-5 MMP (MT5-MMP)             | MS <sup>a</sup> , brain cancer <sup>a</sup>   |
| MMP-25       | Membrane-type-5 MMP (MT6-MMP)             | MS <sup>a</sup> , brain cancer <sup>a</sup>   |
| MMP-26       | Matrilysin-2, Endometase                  | Brain cancer <sup>b</sup>   |
| MMP-27       | MMP-22, C-MMP                             |   |
| MMP-28       | Epilysin                                  | MS <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup>MMP mRNA, protein and/or activity levels are elevated but involvement in disease is unclear.

<sup>b</sup>Limited literature (one to two publications) available to support MMP involvement in the disorders.

Tabela 5 – MMPs em doenças no Sistema Nervoso Central (Rempe, Ralf G; Hartz & Bauer, 2016)