

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DA DENTINA EM RELAÇÃO À ABUNDÂNCIA E ATIVIDADE DE PROTEASES

Larissa Gabriele Oliveira Nogueira (Bolsista PIBIC/CNPq-UNIAN-SP), e-mail: larissagb.nogueira@gmail.com. Marcela Rocha de Oliveira Carrilho (Orientadora), e-mail: marcelacarrilho@anhanguera.com.

Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN-SP) | Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biomateriais em Odontologia e Biotecnologia e Inovação em Saúde

Área: Bioquímica – Subárea: Enzimologia

Introdução

A teoria mais comum proposta para explicar o desenvolvimento das lesões de cárie indica que a produção de ácido pela placa bacteriana a partir da hidrólise de sacarose, leva à desmineralização da estrutura dental. Assim, a desmineralização do esmalte superficial resulta, inicialmente, no aparecimento das lesões de mancha branca. De acordo com esse modelo, a manutenção das condições ambientais para a doença, levam a sua progressão, e isso se reflete na desmineralização do tecido dentinário. Como o tecido dentinário é constituído não somente de minerais, mas também por uma matriz orgânica, admite-se por este modelo que as bactérias e enzimas proteolíticas bacterianas promoveriam, então, a destruição da matriz orgânica da dentina aumentando a lesão (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001).

Há poucos anos, no entanto, um novo modelo foi proposto para explicar a destruição da matriz orgânica da dentina durante a progressão da doença cárie, trazendo uma perspectiva diversa em relação ao real papel das enzimas bacterianas nesse processo. Esse novo modelo pressupõe que durante o processo de desenvolvimento da cárie, a dissolução do conteúdo mineral dada pelos ácidos bacterianos não somente promove a exposição da matriz orgânica dentinária, como também deflagra um mecanismo de ativação de enzimas do hospedeiro (supostamente presas na matriz orgânica ou provenientes da saliva), que então seriam responsáveis pela degradação da matriz orgânica dentinária (TJÄDERHANE *et al.*, 1998).

Até o momento, foram identificados no complexo dentina-polpa membros de duas famílias de proteases, as metaloproteases da matriz (MMPs) e a cisteíno proteases a saber: as catepsinas B e K (TERSARIOL *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2011; VIDAL *et al.*, 2014). Ainda assim não se sabe se haveria um grupo de proteases preferencialmente mais influente no processo de degradação da dentina; aspectos que são fundamentais para elucidar o grau de envolvimento e importância dessas enzimas na progressão das lesões de cárie.

Uma manobra metodológica muito crítica ao estudo da atividade enzimática de proteases da dentina consiste na extração dessas enzimas da matriz da dentina.

Como se tratam de enzimas que operam em condições fisiológicas diferentes, acredita-se que o método de extração possa influenciar a atividade final da protease investigada, alterando assim a interpretação da real função dessas enzimas em eventos como a cárie. O presente estudo teve por objetivo avaliar a presença e atividade enzimática de MMPs e Catepsinas (CTs) da dentina em função de diferentes métodos utilizados para extração dessas proteases da matriz dentinária.

Material e Métodos

1. Preparo dos dentes

Fragmentos de dentina de dentes sadios e cariados foram obtidos de 16 dentes (6 sadios; 10 cariados), coletados de consultórios particulares situados no bairro de Santana (São Paulo) e que haviam sido extraídos por indicação terapêutica e doados aos dentistas responsáveis pela extração desses dentes. O preparo das amostras foi o mesmo, tanto para dentes sadios como para dentes cariados, exceto que, nos dentes cariados, o tecido amolecido e contaminado foi removido com curetas estéreis e armazenado a -80 °C. Os fragmentos de dentina congelada foram triturados em moinho de bolas automático. As partículas de pó de dentina foram peneiradas e o pó resultante foi armazenado a -80 °C até o momento da realização da extração de proteínas.

2. Protocolos de extração

2.1 Extração com ácido fosfórico (AF)

O pó de dentina foi desmineralizado por incubação com ácido fosfórico 1% pH 1,0 por 10 min sob agitação a 4 °C. Em seguida, o ácido foi tamponado pela adição de NaOH 4M. Após centrifugação, o pó desmineralizado foi então ressuspensionado em tampão de extração contendo Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 0,1%, NONIDET 0,1%, ZnCl₂ 0,1 mM e NaN₃ 0,02%, pH 6,0. Então, a amostra foi centrifugada novamente e o precipitado foi separado, liofilizado e armazenado em -20 °C enquanto o sobrenadante contendo as proteínas foi armazenado em -80 °C.

2.2 Extração com ácido acético (AC)

Em tal protocolo foi adicionado um volume de água destilada (4 mL/g de dentina) ao pó de dentina que foi desmineralizado por diálise contra ácido acético 1,0 M (pH 4,0), trocando-se a solução de ácido diariamente. Após a desmineralização, a amostra foi dialisada contra água destilada a 4 °C, trocando-se a água destilada diariamente. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas foi separado do precipitado (pó) e armazenado a -80 °C, enquanto o pó foi liofilizado e armazenado a -20 °C.

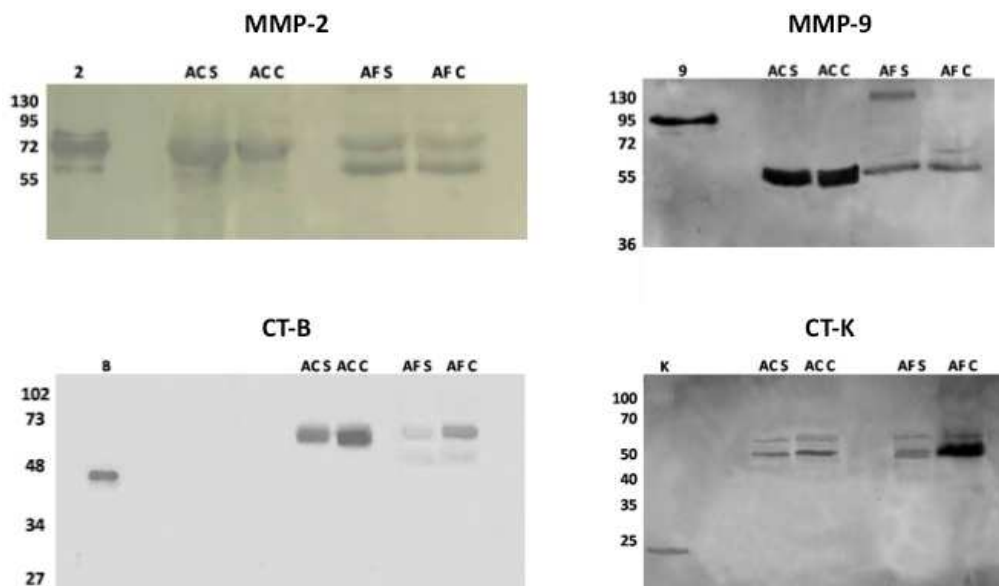
3. Métodos de Análise das Enzimas Extraídas da Dentina

A presença e atividade das enzimas MMP-2, MMP-9 e catepsina-B (CT-B) e catepsina-K (CT-K) foram avaliadas em dentina cariada e sadia, respectivamente, por Western-blot e por cinética da reação das enzimas com substratos fluorogênicos, utilizando inibidores específicos para MMPs (fenantrolina) e CTs (E-64).

Resultados e Discussão

A identificação das enzimas extraídas pelo método de *Western-blot* estão representados na figura 1.

Figura 1: Identificação das enzimas MMP-2, MMP-9, CT-B e CT-K por imunomarcação extraídas, com dois métodos de extração (AC e AF), da dentina sadia (S) ou cariada (C).



Em sentido horário: MMP-2, MMP-9, CT-K e CT-B. 1ª canaleta de cada imagem (enzima recombinante). 2ª canaleta = AC S: protocolo ácido acético em dentina sadia. 3ª canaleta AC C: protocolo ácido acético em dentina cariada. 4ª canaleta AF S: protocolo ácido fosfórico em dentina sadia. 5ª canaleta AF C: protocolo ácido fosfórico em dentina cariada.

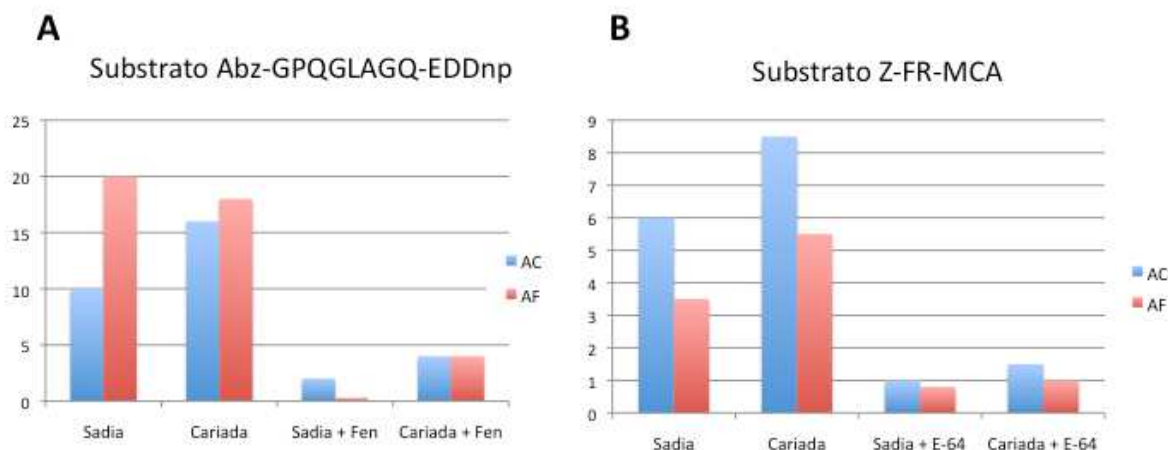
Fonte: O autor.

Os protocolos AC e AF identificam, de forma muito semelhante, a enzima **MMP-2**. Porém, no protocolo AF, pode-se observar a presença de MMP-2 na sua forma inativa (72 kDa) e ativa (66 kDa), sendo que a forma inativa é predominante no protocolo AC. Ao se comparar a abundância de MMP-2 nos tecidos S e C, não foram observadas diferenças notáveis para os dois protocolos, apesar da abundância da enzima em C ser ligeiramente maior que em S para o protocolo AF. Para a **MMP-9**, o protocolo de extração AC mostrou maior abundância em comparação ao protocolo AF, tanto em dentina S quanto em C. Foi observada abundância ligeiramente maior da enzima no tecido C ao se comparar dentina S para os dois protocolos. Para a **CT-B**, pode ser observada maior abundância no protocolo AC, sendo que, tanto no protocolo AC quanto no protocolo AF, maior abundância de CT-B foi observada nos extratos cariados. A diferença na abundância de enzima entre tecido sadio e cariado é evidente para os dois protocolos. Semelhante abundância de **CT-K** foi observada nos protocolos de extração AC e AF para a dentina sadia. Porém, ao compararmos dentina sadia e dentina cariada, maior abundância desta enzima no tecido cariado é notável para o protocolo AF, o

que não foi observado para o protocolo AC, com apenas ligeira diferença na abundância de enzima ao comparar os dois tecidos.

A atividade enzimática das proteases extraídas avaliadas pela cinética de degradação de substratos fluorogênicos é apresentada na figura 2.

Figura 2: Atividade proteolítica de MMPs e CTs na dentina sadia (S) ou cariada (C)



Atividade proteolítica de MMPs (A) e CTs (B) nos extratos obtidos com os protocolos de extração AC e AF, em dentina sadia e cariada. Os inibidores fenantrolina (A) e E-64 (B) foram adicionados aos extratos para testar a especificidade das enzimas MMPs e CTs, respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa.

A atividade proteolítica para MMPs e para CTs foi detectada em dentina S e C nos dois protocolos de extração avaliados. Observa-se porém que com o protocolo AC tende-se observar maior atividade de MMPs, enquanto que com protocolo AF foi maior atividade de CTs. Em todos os casos, a atividade de dentina C é sempre maior que dentina S. Além disso, a utilização de inibidores (fenantrolina e E-64) mostrou redução na atividade proteolítica para os dois substratos para todos os extratos, exceto para o extrato AF de dentes saudios.

Conclusão

A hipótese inicial do estudo deve ser aceita. A abundância e atividade de proteases da dentina variou em função do protocolo utilizado para extração dessas enzimas da matriz orgânica do tecido.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de IC (800781/2014-7).

Referências

NASCIMENTO, F.D. et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J. Dent. Res.*, v.90, n.4, p.506-511, 2012.

tersariol, i.l. et al. cysteine cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. *J. Endod.*, v.36, n.3, p.475-481. 2010.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. São Paulo: Santos, 2001.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J. Dent. Res.*, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.

VIDAL, C.M. et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J. Dent. Res.*, v.93, n., p.269-274, 2014