

RECEPTORES ATIVADOS POR PROTEASES (PARS) NO COMPLEXO DENTINA-POLPA: MAPEAMENTO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ATIVADORAS DE PARS EM TECIDO PULPAR SADIO E INFLAMADO

Lucas David de Souza¹; Fábio Dupart Nascimento²

Estudante do curso de Odontologia; -e-mail luucasdavid@live.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabionascimento@umc.br²

Área do conhecimento: Enzimologia

Palavras chaves: Receptores Ativados por Proteases, Polpa dental, Metaloproteinases de Matriz e Inflamação.

INTRODUÇÃO

A busca por um receptor responsável pela ativação de plaquetas e pela função mitogênica da trombina levaram a descoberta de um receptor do tipo GPCR (Receptor Acoplado a Proteína G) que poderia ser ativado por proteólise de seu domínio N-terminal extracelular que, posteriormente, é capaz de estimular a sinalização do receptor (Vu et al., 1991). Esta família sui generis de GPCR recebeu o nome de Proteinase Activated Receptor (PAR). O complexo dentina-polpa é responsável por promover uma complexa resposta regenerativa após sofrer estímulos lesivos ou infecciosos. Esse processo ocorre via formação de dentina terciária proveniente de odontoblastos primários ou de odontoblastos recém-diferenciados do tecido pulpar. As diferenças na complexidade dos eventos efetuados por estas duas populações celulares indicam que o impacto da resposta inflamatória, possivelmente, provocará efeitos distintos. Durante o desenvolvimento da doença danos teciduais e nas células da polpa estão diretamente relacionados a ação de proteases bacterianas e moléculas/enzimas provenientes de células do próprio sistema imune do hospedeiro. Ainda, várias evidências indicam que a inflamação pulpar, aguda ou crônica, seria o ponto de partida do processo de reparo, que, por sua vez, iniciará efetivamente apenas após o término da inflamação ou da infecção (Bergenholtz, 1981). Apesar dos inúmeros estudos evidenciando a importância de um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos que envolvem a progressão da doença cárie, até o momento nada foi descrito sobre o possível papel dos PARs no complexo dentina-polpa mediante ao estímulo inflamatório causado pelo avanço da doença. Diante deste cenário, acreditamos ser de extrema valia um estudo que não apenas identifique a presença dos PARs no tecido pulpar/pré-dentina, mas que também avalie o possível papel modulatório exercido por estes receptores durante o processo de evolução cárie.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar papel de diferentes enzimas proteolíticas no processo de ativação e modulação dos PARs em tecido pulpar sadio e acometido por processo inflamatório.

METODOLOGIA

Foram utilizados tecidos pulpares saudáveis provenientes de pré-molares e molares hígidos (n=10) com indicação de remoção cirúrgica do elemento dental por motivos ortodônticos e tecidos pulpares de dentes apresentando lesão pulpar do tipo inflamatória aguda (pulpite), com indicação clínica de pulpectomia (n=10). Os tecidos pulpares

saudáveis e inflamados foram imediatamente congelados em recipiente contendo gelo seco e acondicionados em freezer a -80°C . A atividade proteolítica total das enzimas envolvidas no processo de ativação de PARs foi monitorada espectrofluorimetricamente nos extratos de tecidos pulpareis sadio ou acometidos por inflamação. Para a avaliação da atividade enzimática nos domínios específicos de ativação de PARs foram utilizados peptídeos fluorescentes tipo FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), nas seguintes sequências de aminoácidos: PAR1, Abz-TLDPRSFLK-EDDnp; PAR2, AbzSSKGRSLIGK-EDDnp; PAR3, Abz-TLPIKTFRGK-EDDnp e PAR4, AbzLPAPRGYPGK-EDDnp (Angelo et al., 2006). Onde os grupos Abz (ácido orto-amino benzoico) e EDDnp (etilenodiamino 2,4-dinitrofenil) consistem em um grupo fluorescente e um grupo supressor de fluorescência. Quando ocorre a hidrólise em um determinado ponto da cadeia peptídica entre o grupo doador e o grupo supressor de elétrons, a variação da fluorescência pode ser detectada em espectrofluorímetro. Para o estudo das atividades, 10 μL de cada extrato obtido com os protocolos de extração foram adicionados ao tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo 10 μM de substrato fluorescente e incubados por 24 h em temperatura ambiente. Para verificar a especificidade das atividades, o mesmo procedimento foi realizado para amostras incubadas com inibidores específicos para cada família de protease estudada. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, sendo que cada amostra será utilizada em duplicata e as leituras serão feitas em leitor de placa (Hitachi F-7000, Japão), com comprimentos de onda de 320 nm para excitação e 420 nm para emissão. Após as leituras, as atividades específicas para cada extrato foram calculadas pela diferença das fluorescências inicial e após 24 h (Δ fluorescência), ajustadas para a concentração de proteína presente em cada extrato e expressas em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF/ μg de proteína).

RESULTADOS/DISCUSSÃO

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram os resultados de velocidade de hidrólise para os peptídeos referente aos PARs 1, 2 e 4 nos pHs 5,5, 7,5 e 9,0. Os inibidores enzimáticos utilizados foram os seguintes: Ortofenantrolina, EGTA e DTT, inibidores clássicos de metaloproteases, E-64, inibidor específico da família das cisteíno-proteases; TLCK, inibidor irreversível de enzimas da família das serino proteases; PMSF, inibidor específico da família das serino proteases.

Tabela 1. Ensaio em pH 5.5

| | Atividade específica UAF/min/ μg | | | | | |
|--|---|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | PAR1 | | PAR2 | | PAR4 | |
| | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado |
| Controle | 1,07 | 1304,76 | 2,08 | 746,19 | 0,18 | 2005,71 |
| Ortofenantrolina (5 mM) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 232,38 | 0,01 | 414,29 |
| EGTA (10 mM) | 0,01 | 493,33 | 0,11 | 52,86 | 0,01 | 1154,29 |
| DTT (5 mM) | 0,22 | 3046,67 | 0,61 | 758,57 | 0,05 | 423,81 |
| E-64 (10 μM) | 0,75 | 1840,00 | 2,19 | 652,86 | 0,22 | 2247,62 |
| DTT (5 mM) + E-64 (10 μM) | 0,28 | 1413,81 | 0,48 | 666,19 | 0,05 | 647,62 |
| TLCK (100μM) | 0,79 | 1702,38 | 1,54 | 645,24 | 0,28 | 2014,29 |
| PMSF (2 mM) | 0,59 | 2405,24 | 1,98 | 566,19 | 0,22 | 1593,14 |

Tabela 2. Ensaio em pH 7.5

| | Atividade específica UAF/min/ug | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | PAR1 | | PAR2 | | PAR4 | |
| | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado |
| Controle | 1,23 | 1200,00 | 1,94 | 2477,14 | 0,48 | 1688,10 |
| Ortofenantrolina (5 mM) | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 98,10 | 0,00 | 527,62 |
| EGTA (10 mM) | 0,21 | 248,10 | 1,26 | 1495,24 | 0,04 | 1128,00 |
| DTT (5 mM) | 0,10 | 364,29 | 0,51 | 929,05 | 0,11 | 359,05 |
| E-64 (10 µM) | 1,05 | 1561,43 | 2,21 | 3751,43 | 0,53 | 2048,38 |
| DTT (5 mM) + E-64 (10 µM) | 0,22 | 160,00 | 0,66 | 1030,00 | 0,13 | 775,62 |
| TLCK (100µM) | 1,84 | 1643,33 | 2,73 | 2804,76 | 0,62 | 1083,24 |
| PMSF (2 mM) | 1,46 | 1726,67 | 3,12 | 5142,86 | 0,57 | 1036,95 |

Tabela 3. Ensaio em pH 9.0

| | Atividade específica UAF/min/ug | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | PAR1 | | PAR2 | | PAR4 | |
| | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado | Normal | Inflamado |
| Controle | 1,11 | 2084,29 | 2,96 | 5008,10 | 0,40 | 1544,38 |
| Ortofenantrolina (5 mM) | 0,91 | 297,62 | 0,01 | 230,48 | 0,00 | 700,48 |
| EGTA (10 mM) | 0,65 | 778,10 | 1,43 | 4080,95 | 0,00 | 936,95 |
| DTT (5 mM) | 1,00 | 109,52 | 0,31 | 392,38 | 0,26 | 1551,62 |
| E-64 (10 µM) | 1,03 | 2251,90 | 2,88 | 5119,05 | 0,34 | 1859,43 |
| DTT (5 mM) + E-64 (10 µM) | 1,00 | 132,38 | 0,39 | 594,76 | 0,22 | 1192,83 |
| TLCK (100µM) | 0,87 | 1576,19 | 2,51 | 4924,29 | 0,75 | 1904,57 |
| PMSF (2 mM) | 0,00 | 1877,14 | 2,70 | 4426,67 | 0,29 | 1973,27 |

Os resultados abrem um caminho para novas descobertas em uma área, até então, pouco explorada. As Tabelas 1, 2 e 3 mostram que dos quatro membros da família dos PARs o tecido pulpar apresenta atividade proteolítica para três deles, PARs 1, 2 e 4. O PAR 1, o receptor mais bem conhecido do grupo, foi descrito primeiramente como receptor de trombina, uma proteína que possui papel fundamental na cascata de coagulação e que, posteriormente, teve desvendado o seu papel na hidrólise do domínio ativador deste tipo de G-PCR. Interessantemente, os resultados apresentados pelas Figuras 1-3 e tabelas 1-3, contrariando toda a literatura publicada até o momento, que sugere, invariavelmente, membros da família das serino proteases como principais efetores no processo de clivagem e ativação destes receptores, aponta, muito provavelmente uma metaloproteinase de matriz como enzima responsável pela clivagem in vitro dos peptídeos avaliados. As metaloproteinases de matriz, por suas características colagenolíticas e gelatinolíticas, possuem um papel fundamental na fisiopatologia da cárie, degradando o conteúdo orgânico presente na dentina. No entanto, apenas a metaloproteinase de matriz-1 foi descrita, até o momento, como uma enzima capaz de ativar receptores PARs (Boire et al., 2005). Nosso estudo, apresenta de forma elegante, utilizando inibidores específicos para cada uma das famílias de proteases e diferentes pHs, que as serino proteases e as cisteíno proteases, possuem apenas um papel coadjuvante na hidrólise de sequências peptídicas referentes aos domínios de ativação dos quatro PARs no tecido pulpar.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados nos permitem concluir que, ao menos nas células do complexo dentino-pulpar, existe uma via não canônica de ativação de PARs mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. F. et al. Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. **J Biol Chem**, v. 281, n. 6, p. 3116-26, Feb 10 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321973> >

BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J Endod**, v. 7, n. 3, p. 100-4, Mar 1981. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6938628> >.

VU, T. K. et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1057-68, Mar 22 1991. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672265> >.

Boire, A., L. Covic, A. Agarwal, S. Jacques, S. Sherifi and A. Kuliopulos (2005). "PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells." **Cell** 120(3): 303-313 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707890> >.