



**DEPARTAMENTO DE BIOMATERIAIS E BIOLOGIA ORAL**  
**Disciplina ODB 400 – Materiais para uso direto**  
**Roteiro de estudos**  
**Princípios de Adesão**  
**Professor: Paulo Eduardo Capel Cardoso**

**Ativação das Metaloproteinases da Matriz e Cisteína-Catepsinas**

Profa. Dra. Ana Beatriz Silva e Sousa

Colapso da Interface Adesiva

A longevidade da interface material restaurador/estrutura dentária é afetada principalmente pelo tempo de uso clínico da restauração, a diminuição da estabilidade hidrolítica dos componentes resinosos e a degradação da matriz dentinária. Neste último caso, enzimas derivadas do próprio hospedeiro desempenham papel significativo na degradação da interface adesiva.

Morfologia da Matriz dentinária

A matriz dentinária é uma rede complexa de fibrilas e estruturas globulares, de modo que sua integridade reflete na longevidade da interface adesiva. É composta por 90% de colágeno tipo I, pequenas quantidades de colágeno tipo III e tipo IV, e proteínas da matriz.

O colágeno é uma proteína constituída por três polipeptídeos helicoidais associados em tripla hélice. Não é facilmente degradado, mas quando isso acontece não pode ser rearranjado. Essa estabilidade molecular se deve à formação de ligações inter e intra-moleculares, as quais podem ocorrer entre a região C-Terminal de uma molécula de colágeno e a N-terminal da molécula de colágeno adjacente. As pontes de hidrogênio também são importantes para estabilizar a sua estrutura.

O colágeno dentinário é o colágeno mais reticulado no corpo, e essas ligações cruzadas são responsáveis pela sua habilidade de ser passível de condicionamento ácido durante os procedimentos adesivos, mas sem desnaturar as fibrilas.

As proteínas da matriz são necessárias para que o tecido dentinário seja depositado, maturado e mineralizado corretamente. Dentre as proteínas não-colágenas temos as

proteoglicanas, sialoproteínas dentinárias, fosfoproteínas, proteínas morfogenéticas ósseas, enzimas e fatores de crescimento.

Durante o processo de maturação da dentina, cristalitos minerais de apatita precipitam preenchendo os espaços (de 67 nm) entre as moléculas de colágeno vizinhas, e depois os espaços interfibrilares; dessa forma as proteínas presentes na matriz extracelular ficam inativas. No entanto, diversas enzimas, entre as quais se destacam as metaloproteínas da matriz (MMPs) e as cisteína catepsinas (CTs), podem ser ativadas novamente por ácidos provenientes do condicionamento com ácido fosfórico ou com monômeros ácidos dos sistemas autocondicionantes, assim como por ácidos produzidos por bactérias. Estes ácidos diminuem o pH do meio, gerando alterações na estrutura dentinária que reativam essas enzimas.

#### O que são as MMPs?

As MMPs são proteases Zinco/Cálcio dependentes que podem degradar os componentes da matriz dentinária, portanto são capazes de clivar o colágeno. Há em torno de 23 metaloproteinases da matriz no corpo humano, sendo denominadas através de nomenclatura numérica.

A dependência do zinco e do cálcio se deve a sua estrutura. Sendo assim, uma das principais formas de inibir as MMPs é impedindo a ligação dos íons zinco e cálcio à estrutura da enzima através de um processo chamado de quelação.

As MMPs são agrupadas de acordo com a especificidade e homologia do substrato, isto é, o substrato onde a enzima se liga para clivar. Elas podem ser agrupadas em seis grupos: colagenases, gelatinases (clivam colágeno), estromelisinases, matrilisinas, tipo trans-membrana e outras MMPs. Contudo, apesar de ter maior afinidade por determinado substrato, as MMPs são capazes de degradar diferentes substratos. Por exemplo: as colagenases MMP-1 e -13 degradam gelatina (colágeno desnaturado), e as gelatinases MMP-2 e -9 atuam em vários tipos de colágeno.

Têm sido identificadas várias MMPs no complexo dentina-polpa, as quais participam da organização de componentes e compartimentos da matriz extracelular. Encontra-se gelatinases (MMP-2 e -9), colagenases (MMP-8 e 13), enamelinase (MMP-20) e estromelinase

(MMP-3). São secretadas pelos odontoblastos em resposta às agressões frente às lesões de cárie, resultando em expressão gênica 10 vezes maior em polpas inflamadas do que em polpas saudáveis.

### Estrutura das MMPs

As MMPs também podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular. Sua estrutura é dividida em domínios, isto é, segmentos que desempenham funções-chaves específicas para a enzima, e determinam sua classificação e função principal. Nem todos os domínios dessas enzimas são iguais, contudo, há domínios que são de suma importância para o processo de ativação e inativação das MMPs:

- O *Domínio Pró-peptídeo ou Pró-domínio* atua diretamente na inibição das metaloproteinases já que contém uma cisteína residual que se liga ao sítio catalítico.
- O *Domínio Catalítico* é a região onde ocorre a ligação com o íon zinco, o qual tem um papel importante na ativação da enzima. Já o cálcio é um íon fundamental para preservar a estrutura terciária no formato ativo da própria enzima;
- A *Região de União-Hinge* é um sítio de união que algumas MMPs apresentam, como as gelatinases (principalmente a MMP-2). A região de Hinge une o sítio catalítico à próxima região que é o domínio Hemopexina;
- O *Domínio Hemopexina* é um domínio bastante importante porque tem a função de mediar interações entre as enzimas e seus próprios inibidores teciduais específicos, conhecidos pela sigla TIMPs;
- O *Domínio Fibronectina* está presente nas gelatinases (MMP-2 e -9). É responsável por auxiliar na ligação da MMP à estrutura do colágeno e auxiliar na sua quebra.

As MMPs são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas inativas/latentes, chamadas de zimogênios. Como comentado, num primeiro momento essas enzimas

participam ativamente do processo de formação e maturação da dentina e, após a finalização desse processo, ficam presas na estrutura em formato de zimogênios. A solubilização da matriz dentinária, que pode ocorrer em consequência de lesão de cárie, condicionamento ácido ou outros processos que envolvam a remoção do conteúdo inorgânico, faz com que essas enzimas sejam ativadas novamente.

#### Ativação e Inativação das MMPs

As MMPs além de serem proteases, são hidrolases, precisando então do zinco e da molécula de água para executar suas funções. Quando inativas, o domínio pró-peptídeo se encontra inibindo a atividade funcional do domínio catalítico. Especificamente, a cisteína residual presente no pró-domínio forma uma ponte com o zinco do domínio catalítico, excluindo as moléculas de água e prevenindo assim, a sua atividade enzimática. Se algum evento ocorrer, como o condicionamento com ácido, essa região é perdida, juntamente com a cisteína existente. Assim, o domínio catalítico fica disponível para se ligar ao substrato.

Além dessa via, as MMPs também podem ser ativadas por cisteínas catépsinas, outras proteases e quimicamente pelo ácido amino fenil mercúrio (APMA).

#### Ação das MMPs na estrutura do colágeno

A estrutura do colágeno, de tripla hélice, tem uma fita principal que passa no meio e outras duas que passam em volta da principal. Essa tripla hélice tem 2 ramificações terminais, um grupo amina e um grupo carboxila, chamadas de telopeptídeos.

As MMPs que clivam colágeno são as colagenases (MMP-1, -8, -13, -18), as gelatinases (principalmente a MMP-2 e -9) e a tipo trans-membrana. Contudo, as colagenases não conseguem quebrar diretamente as três hélices do colágeno porque a parte ativa do sítio de clivagem é menor do que o tamanho do colágeno em si, portanto o sítio não consegue englobar as 3 hélices. Estas precisam ser desenroladas para clivar uma fita de cada vez, criando a necessidade de que as MMPs funcionem em conjunto para alcançarem o objetivo final.

Como o grupo carboxila terminal fica dobrada por cima do resto do colágeno (enovelado), tampando as regiões onde a colagenase poderia clivar, é necessário que a gelatinase MMP-2 elimine essa porção através da hidrólise dos telopeptídeos volumosos na

superfície da fibra de colágeno, criando espaços para que posteriormente a MMP-1 desenrole a tripla hélice e clive cada fita por separado, facilitando a degradação do colágeno.

Por outra parte, a perda mineral além de ativar as MMPs, também podem levar à perda do grupo carboxila, deixando o colágeno exposto para ser clivado.

As MMPs são enzimas do tipo alostérica e na dependência do que ligou e do local da ligação (do material ou da substância e do domínio) mudam de função. Seu pico de atividade é no pH neutro.

#### Regulação das atividades das MMPs

A atividade das MMPs pode ser regulada através da transcrição, secreção e desgranulação de enzimas, e por inibidores específicos e não específicos.

Os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) são os inibidores específicos, responsáveis por inibir as MMPs ativas, impedir a ativação de MMPs latentes, e se encontram envolvidos em vários processos regulatórios celulares e teciduais.

Quando os TIMPs estão ligados às MMPs não permitem que haja quebra da ponte cisteína/Zinco. Na hora que o TIMP é degradado, as MMPs ficam ativas.

Os inibidores não específicos são substâncias que não são produzidas com a principal finalidade de inibir as MMPs. Podem ser agentes sintéticos (clorexidina e glutaraldeído) ou naturais (própolis).

#### Identificação das MMPs

As MMPs podem ser identificadas através de diversos ensaios, como por exemplo a zimografia em gel. Esta técnica consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida que permite detectar a atividade enzimática das MMPs e de seus inibidores teciduais (TIMPs) a partir da degradação de seu substrato copolimerizado no gel. A aplicação de uma corrente elétrica possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação pela diferença do peso molecular. Dependendo do substrato empregado, diferentes MMPs podem ser detectadas especificamente. São utilizados corantes para observar a expressão e posteriormente, pode ser utilizado o programa Image J para que esta seja quantificada. No

entanto, com este ensaio não é possível avaliar a atividade das MMPs no substrato dentário, utiliza-se apenas MMPs recombinantes.

Para detectar a atividade enzimática diretamente no tecido dentário emprega-se a zimografia *in situ*. Utilizando um substrato de proteases conjugado com fluoresceína (por exemplo, gelatina conjugada com fluoresceína) é possível quantificar a degradação por gelatinases/colagenases presentes no tecido. Quando o substrato é hidrolisado, emite fluorescência na cor verde que pode ser vista sob um microscópio apropriado. Quanto mais intensa a fluorescência, maior é a atividade. São obtidas imagens que podem ser analisadas com o programa Image J. Contudo, este ensaio não permite identificar especificamente as MMPs presentes no tecido já que diversas MMPs e inclusive cisteína catepsinas podem degradar um mesmo substrato.

Outro ensaio que pode ser realizado é o teste de resistência à biodegradação enzimática. Neste ensaio, o tecido dentário é frequentemente incubado com colagenase bacteriana tipo I. As taxas de biodegradação do tecido são calculadas pela diferença em porcentagem de massa seca, antes e após a digestão pela colagenase bacteriana.

Com estes ensaios pode-se determinar também a efetividade de novos tratamentos na inibição de MMPs.

#### O que são as cisteína catepsinas (CTs)?

São outro grupo de enzimas proteolíticas endógenas presentes na matriz dentinária. Estas proteases participam na renovação da matriz extracelular, na apresentação de antígenos e no processamento de eventos, mas também desempenham um papel fundamental na progressão da cárie e na degradação da camada híbrida.

Em humanos encontram-se 11 cisteína catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W), as quais podem ser ativadas por outras proteases ou por ácidos. Além disso, na presença de glicosaminoglicanos há uma ativação acelerada delas, já que os glicosaminoglicanos carregam água que leva à degradação hidrolítica.

Destaca-se a CT-K pois é responsável por 98% da atividade enzimática das catepsinas contra o colágeno, e difere das MMPs e das outras CTs em sua capacidade de clivar o colágeno helicoidal em vários locais, gerando múltiplos fragmentos de colágeno, pelo que é

considerada muito potente. Se expressa nos osteoclastos e odontoblastos, sendo fundamental para a reabsorção óssea osteoclástica normal e patológica.

As CTs também têm sido identificadas em dentina hígida e cariada, e em células pulpares, salientando a CT-B no interior de túbulos dentinários e em dentina em profundidade. Sabe-se que quanto mais profundo, maior é a atividade das CTs. Isto, sobretudo em jovens.

#### Estrutura das CTs

A estrutura das CTs é dividida em dois domínios: esquerdo e direito. Além disso, apresentam resíduos catalíticos (Cys e His) e um sítio ativo, o qual é maior do que as MMPs e poderia explicar sua maior agressividade.

#### Ativação e inativação das CTs

As CTs estão ativas e estáveis em pH levemente ácido. Já em pH neutro se tornam instáveis e irreversivelmente inativas, com exceção da CT-B que tem sua atividade máxima em pH 7,4, o qual é esperado para uma enzima que se encontra envolvida em muitos processos fisiológicos relacionados com a degradação da matriz extracelular. Sabe-se que a CT-B degrada colágeno tipo IV e fibronectina em pH ácido e neutro.

#### Ação das MMPs na estrutura do colágeno

A estrutura do colágeno, de tripla hélice, tem uma fita principal que passa no meio e outras duas que passam em volta da principal. Essa tripla hélice tem 2 ramificações terminais, um grupo amina e um grupo carboxila, chamadas de telopeptídeos.

As MMPs que clivam colágeno são as collagenases (MMP-1, -8, -13, -18), as gelatinases (principalmente a MMP-2 e -9) e a tipo trans-membrana. Contudo, as collagenases não conseguem quebrar diretamente as três hélices do colágeno porque a parte ativa do sítio de clivagem é menor do que o tamanho do colágeno em si, portanto o sítio não consegue englobar as 3 hélices. Estas precisam ser desenroladas para clivar uma fita de cada vez, criando a necessidade de que as MMPs funcionem em conjunto para alcançarem o objetivo final.

Como o grupo carboxila terminal fica dobrada por cima do resto do colágeno (enovelado), tampando as regiões onde a colagenase poderia clivar, é necessário que a gelatinase MMP-2 elimine essa porção através da hidrólise dos telopeptídeos volumosos na superfície da fibra de colágeno, criando espaços para que posteriormente a MMP-1 desenrole a tripla hélice e clive cada fita por separado, facilitando a degradação do colágeno.

Por outra parte, a perda mineral além de ativar as MMPs, também podem levar à perda do grupo carboxila, deixando o colágeno exposto para ser clivado.

As MMPs são enzimas do tipo alostérica e na dependência do que ligou e do local da ligação (do material ou da substância e do domínio) mudam de função. Seu pico de atividade é no pH neutro.

#### Regulação das atividades das MMPs

A atividade das MMPs pode ser regulada através da transcrição, secreção e desgranulação de enzimas, e por inibidores específicos e não específicos.

Os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) são os inibidores específicos, responsáveis por inibir as MMPs ativas, impedir a ativação de MMPs latentes, e se encontram envolvidos em vários processos regulatórios celulares e teciduais.

Quando os TIMPs estão ligados às MMPs não permitem que haja quebra da ponte cisteína/Zinco. Na hora que o TIMP é degradado, as MMPs ficam ativas.

Os inibidores não específicos são substâncias que não são produzidas com a principal finalidade de inibir as MMPs. Podem ser agentes sintéticos (clorexidina e glutaraldeído) ou naturais (própolis).

#### Identificação das MMPs

As MMPs podem ser identificadas através de diversos ensaios, como por exemplo a zimografia em gel. Esta técnica consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida que permite detectar a atividade enzimática das MMPs e de seus inibidores teciduais (TIMPs) a partir da degradação de seu substrato copolimerizado no gel. A aplicação de uma corrente elétrica possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação pela diferença do peso molecular. Dependendo do substrato empregado, diferentes MMPs podem



ser detectadas especificamente. São utilizados corantes para observar a expressão e posteriormente, pode ser utilizado o programa Image J para que esta seja quantificada. No entanto, com este ensaio não é possível avaliar a atividade das MMPs no substrato dentário, utiliza-se apenas MMPs recombinantes.

Para detectar a atividade enzimática diretamente no tecido dentário emprega-se a zimografia *in situ*. Utilizando um substrato de proteases conjugado com fluoresceína (por exemplo, gelatina conjugada com fluoresceína) é possível quantificar a degradação por gelatinases/colagenases presentes no tecido. Quando o substrato é hidrolisado, emite fluorescência na cor verde que pode ser vista sob um microscópio apropriado. Quanto mais intensa a fluorescência, maior é a atividade. São obtidas imagens que podem ser analisadas com o programa Image J. Contudo, este ensaio não permite identificar especificamente as MMPs presentes no tecido já que diversas MMPs e inclusive cisteína catepsinas podem degradar um mesmo substrato.

Outro ensaio que pode ser realizado é o teste de resistência à biodegradação enzimática. Neste ensaio, o tecido dentário é frequentemente incubado com colagenase bacteriana tipo I. As taxas de biodegradação do tecido são calculadas pela diferença em porcentagem de massa seca, antes e após a digestão pela colagenase bacteriana.

Com estes ensaios pode-se determinar também a efetividade de novos tratamentos na inibição de MMPs.

#### O que são as cisteína catepsinas (CTs)?

São outro grupo de enzimas proteolíticas endógenas presentes na matriz dentinária. Estas proteases participam na renovação da matriz extracelular, na apresentação de antígenos e no processamento de eventos, mas também desempenham um papel fundamental na progressão da cárie e na degradação da camada híbrida.

Em humanos encontram-se 11 cisteína catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W), as quais podem ser ativadas por outras proteases ou por ácidos. Além disso, na presença de glicosaminoglicanos há uma ativação acelerada delas, já que os glicosaminoglicanos carregam água que leva à degradação hidrolítica.

Destaca-se a CT-K pois é responsável por 98% da atividade enzimática das catepsinas contra o colágeno, e difere das MMPs e das outras CTs em sua capacidade de clivar o colágeno helicoidal em vários locais, gerando múltiplos fragmentos de colágeno, pelo que é considerada muito potente. Se expressa nos osteoclastos e odontoblastos, sendo fundamental para a reabsorção óssea osteoclástica normal e patológica.

As CTs também têm sido identificadas em dentina hígida e cariada, e em células pulpares, salientando a CT-B no interior de túbulos dentinários e em dentina em profundidade. Sabe-se que quanto mais profundo, maior é a atividade das CTs. Isto, sobretudo em jovens.

#### Estrutura das CTs

A estrutura das CTs é dividida em dois domínios: esquerdo e direito. Além disso, apresentam resíduos catalíticos (Cys e His) e um sítio ativo, o qual é maior do que as MMPs e poderia explicar sua maior agressividade.

#### Ativação e inativação das CTs

As CTs estão ativas e estáveis em pH levemente ácido. Já em pH neutro se tornam instáveis e irreversivelmente inativas, com exceção da CT-B que tem sua atividade máxima em pH 7,4, o qual é esperado para uma enzima que encontra-se envolvida em muitos processos fisiológicos relacionados com a degradação da matriz extracelular. Sabe-se que a CT-B degrada colágeno tipo IV e fibronectina em pH ácido e neutro.

#### Ação das CTs no colágeno

As CTs clivam o colágeno na porção C-terminal, tornando o colágeno mais susceptível à degradação. Também são capazes de inativar as TIMP-1 e -2, o que leva à ativação de MMPs. Além disso, especula-se que as CTs e as MMPs possam trabalhar sinergicamente, pois se encontram muito próximas uma da outra e de seus substratos alvo.

#### Identificação das CTs

As CTs podem ser identificadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão utilizando reagentes. No entanto, teremos apenas uma representação bidimensional.

Tal como as MMPs, sua atividade enzimática também pode ser detectada por zimografia *in situ*. Além disso, pode-se avaliar a degradação do colágeno da dentina através de uma análise de imuno-histoquímica. Esta análise determina de forma indireta a atividade enzimática das proteases no seu estado natural. A taxa de solubilização da matriz orgânica dentinária pode ser determinada pela quantificação do aminoácido hidroxiprolina, uma vez que o colágeno é composto por 10% deste aminoácido. A atividade proteolítica no tecido dentinário pode levar à solubilização do colágeno, liberando fragmentos de hidroxiprolina que são quantificados. Também, pode ser determinada pela quantificação de telopeptídeos C-terminal.

**MATERIAL DIDÁTICO PRODUZIDO NA DISCIPLINA “MATERIAIS ADESIVOS E  
PROCEDIMENTOS PREVENTIVO-RESTAURADORES**

Conteúdo redigido pelos alunos da Pós-Graduação em Odontologia: Letícia Araújo, Handially dos Santos Vilela, Karina Felix Santos, Rocio Geng Vivanco, Ruan Mendes, Nathalia Ribeiro Cunha de Oliveira e Leandro Ruivo de Santis, sob orientação dos Professores Doutores: Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza e Paulo Eduardo Capel Cardoso