

Metalopectidases da Matriz na Resposta Celular à Compressão no Movimento Ortodôntico. Estudo *In Vitro*

10



OCULTADO PARA NÃO IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR

Conclusões

Este estudo mostrou que as forças mecânicas de compressão aplicadas não alteraram visivelmente a morfologia e a viabilidade celular, mas modularam a atividade de metalopeptidases da matriz em fibroblastos do LPO e osteoblastos, embora de forma distinta. Estes dados sugerem uma contribuição diferente do ligamento periodontal e do osso durante o movimento dentário ortodôntico.

Introdução

Durante o tratamento ortodôntico, a aplicação de forças mecânicas aos dentes desencadeia a remodelação do periodonto, culminando no movimento dentário¹. Este processo origina duas regiões distintas: os lados de compressão e de tensão, onde ocorrem, respetivamente, processos de reabsorção e de aposição^{2,3}. Ao detetarem estímulos mecânicos, os fibroblastos do ligamento periodontal (LPO), assim como os osteoblastos localizados na interface do LPO com o osso alveolar, regulam a atividade envolvida na movimentação dentária ortodôntica^{4,5}. Estas células produzem metalopeptidases da matriz (MMP)^{6,7}, enzimas proteolíticas capazes de degradar a matriz extracelular do LPO⁸. No entanto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre quais e qual a ação das MMP face à aplicação de forças de compressão. **Assim, este estudo *in vitro* tem como objetivo simular forças ortodônticas de compressão e avaliar a presença e atividade das MMP em culturas de fibroblastos e osteoblastos.**

Materiais e Métodos

Fibroblastos do LPO (HPLF) e osteoblastos (MG-63) foram cultivados em condições ótimas de crescimento num sistema tridimensional de gel de colagénio, e submetidos a forças de compressão estática de 2g/cm² durante 24 horas, utilizando a técnica *weight approach*. A viabilidade celular (1), a morfologia celular (2) e a atividade enzimática das MMP por zimografia de colagénio (3) foram analisadas e comparadas com as mesmas células cultivadas sem o estímulo mecânico.

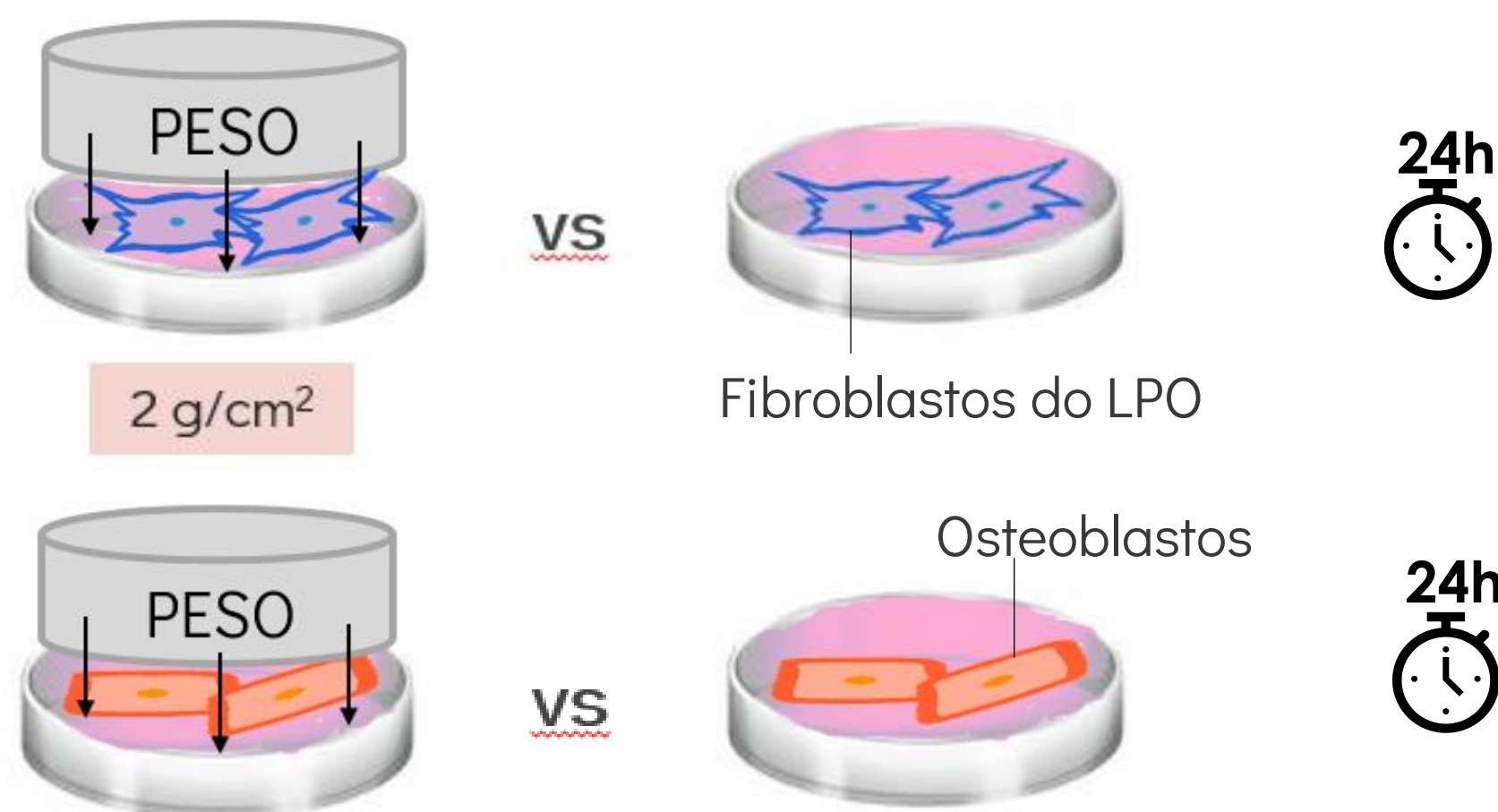


Fig. 1| Comparação da metodologia de aplicação de forças compressivas durante 24h, através da ação de um peso, a fibroblastos do LPO e a osteoblastos cultivados numa matriz de colagénio, e a situação padrão de células não sujeitas a peso.

Resultados

Os resultados obtidos evidenciaram que as células submetidas à compressão:

1. Preservaram a sua viabilidade, tanto quando a mesma foi quantificada através da utilização de fluorocromos IP+DAPI, como quando foi medida pela atividade metabólica no teste de MTT.
2. Preservaram a sua morfologia, conforme observado através de microscopia ótica.
3. Modularam a atividade colagenolítica, conforme observado na zimografia.

1. Testes de Viabilidade Celular:

Marcação celular com fluorocromos:

Teste MTT:

MTT → Cora células viáveis de roxo



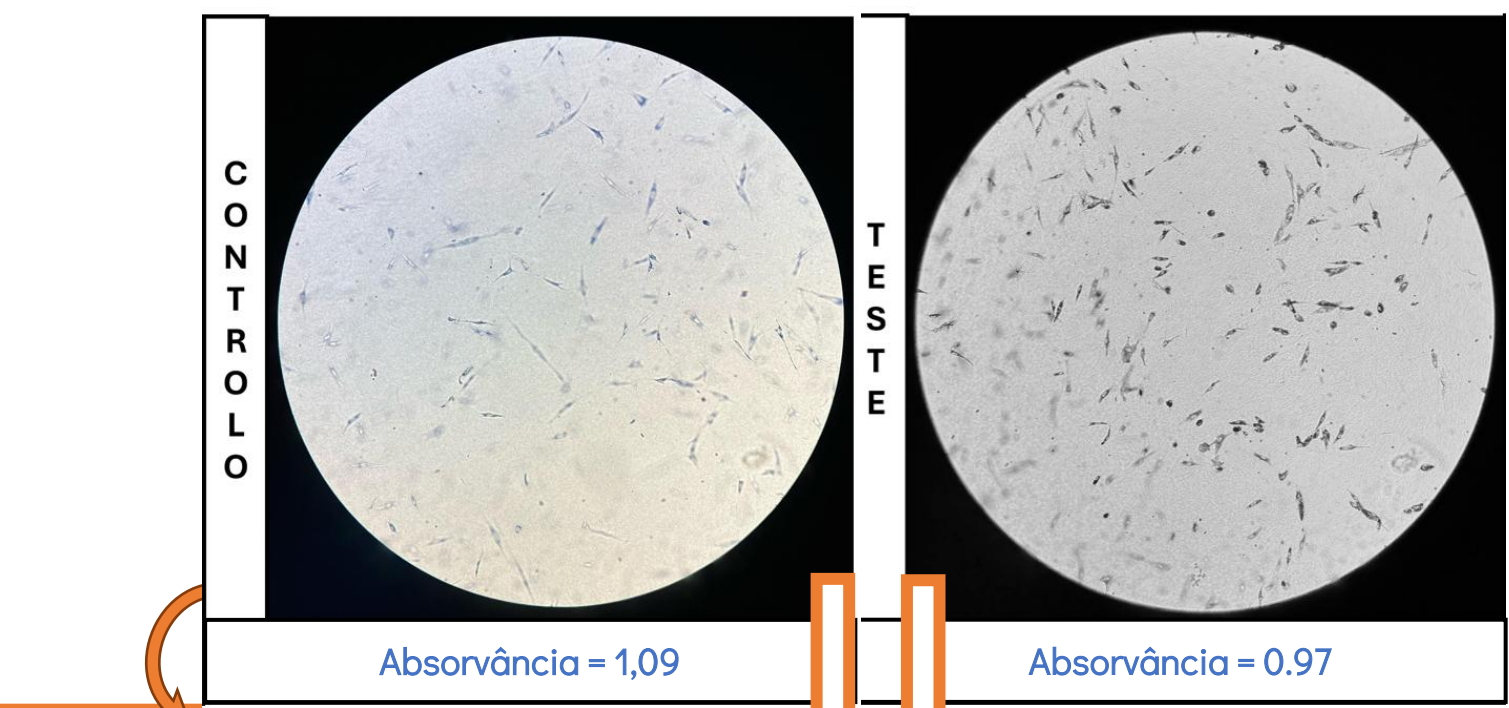
Coram células não viáveis de vermelho



Coram todas as células de azul

Apenas foi observada fluorescência azul nas células sujeitas a compressão e controlo - Células viáveis

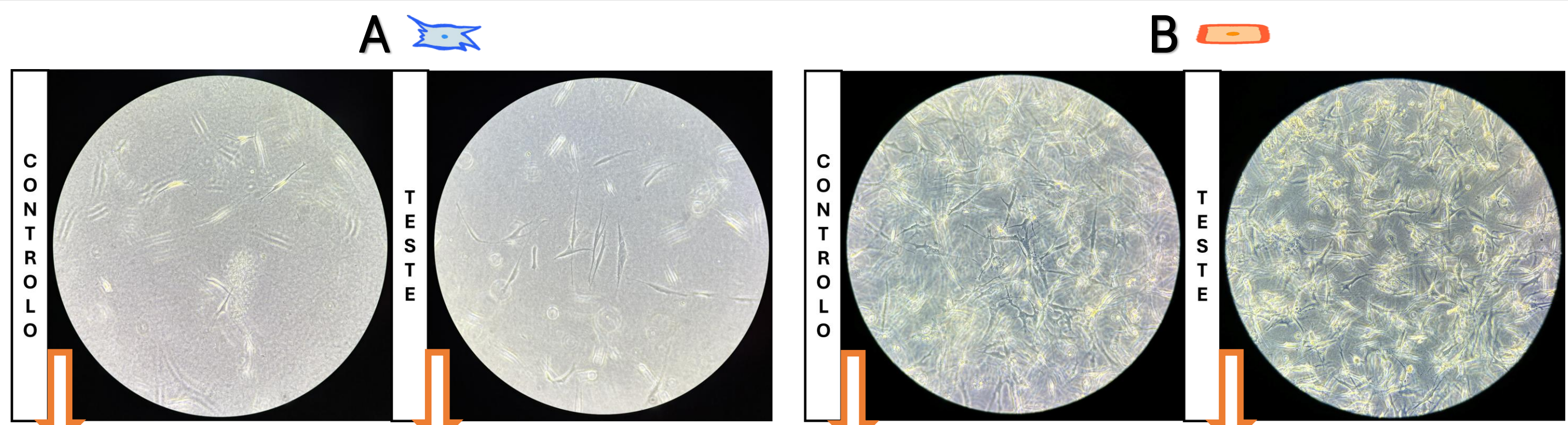
Fig. 2| Fibroblastos do LPO e osteoblastos dos grupos controlo e teste foram fixados com os fluorocromos iodeto de propídeo (IP) e 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI).



Atividade metabólica dos fibroblastos do LPO idêntica nas células sujeitas a compressão e controlo - Células viáveis

Fig. 3| Fibroblastos do LPO do grupo controlo e teste observados ao microscópio ótico invertido depois de sujeitos ao ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As imagens foram adquiridas com ampliação 100x. A mudança das células para uma coloração roxa e os valores de absorvância são indicadores de viabilidade celular.

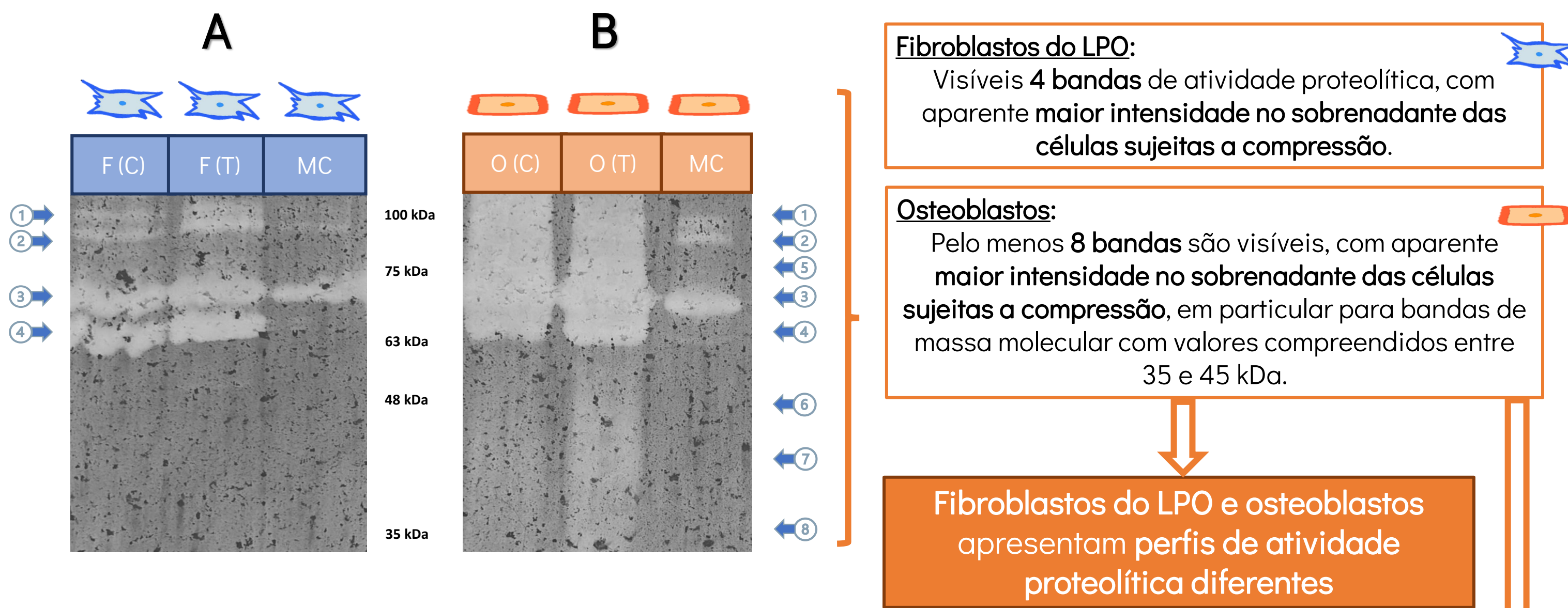
2. Morfologia Celular:



Células com morfologia característica de fibroblastos, que se mantém após compressão, independentemente do tipo de célula. As células submetidas a compressão apresentam uma nitidez superior, resultante da compressão concomitante do gel de colagénio.

Fig. 4| Fibroblastos do LPO (A) e osteoblastos (B) dos grupos controlo e teste observados ao microscópio ótico invertido. As imagens foram adquiridas com ampliação 200x em contraste de fase.

3. Atividade Enzimática das MMP por Zimografia de Colagénio:



Fibroblastos do LPO: Visíveis 4 bandas de atividade proteolítica, com aparente maior intensidade no sobrenadante das células sujeitas a compressão.

Osteoblastos: Pelo menos 8 bandas são visíveis, com aparente maior intensidade no sobrenadante das células sujeitas a compressão, em particular para bandas de massa molecular com valores compreendidos entre 35 e 45 kDa.

Fibroblastos do LPO e osteoblastos apresentam perfis de atividade proteolítica diferentes

São visíveis bandas mais intensas nas células sujeitas a compressão

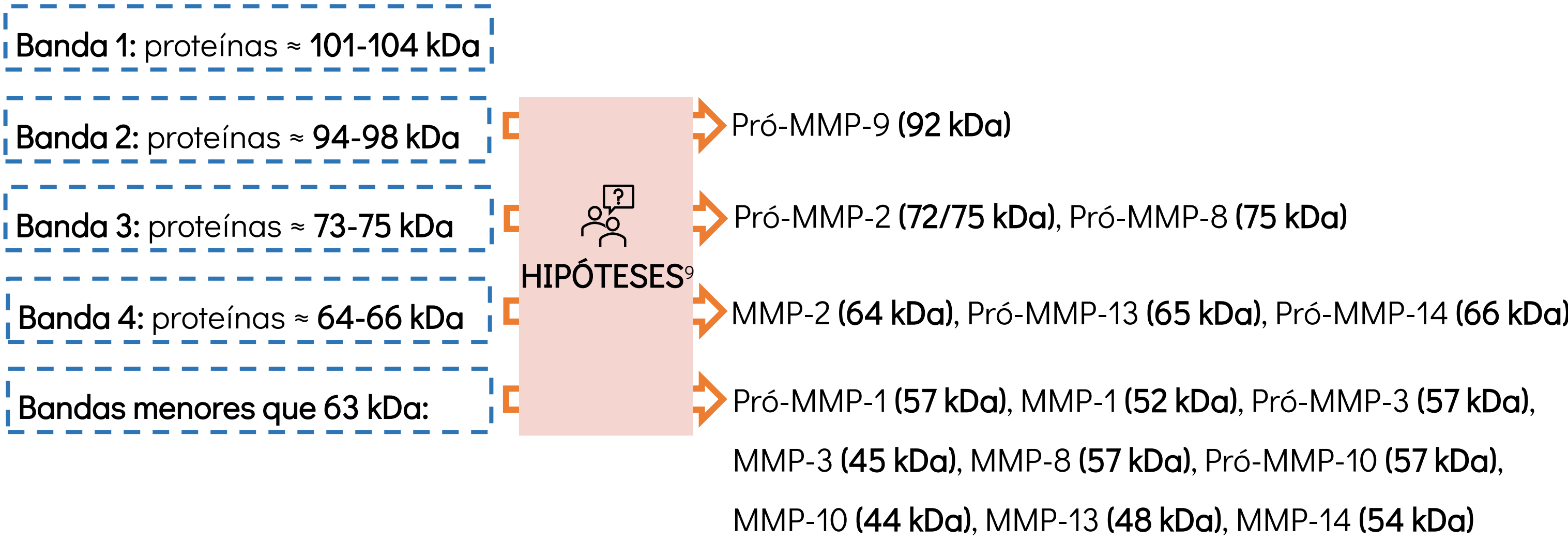


Fig. 5| Zimografia de colagénio dos sobrenadantes das amostras de fibroblastos do LPO (A) do grupo controlo - F (C) - e do grupo teste - F (T) e de osteoblastos (B) do grupo controlo - O (C) - e do grupo teste - O (T). Foi utilizado meio de cultura (MC) como controlo negativo. Foram aplicadas amostras com 15 µg de proteína. As bandas de atividade proteolítica são identificadas por serem zonas claras no fundo escuro e encontram-se assinaladas numericamente. A massa molecular foi calculada no Image J por comparação com a curva de calibração.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não existir conflitos de interesse relacionados com este estudo.

Fontes de Financiamento

Este trabalho foi realizado com o apoio institucional

Referências Bibliográficas

