

# Efeito da Nicotina na Morfologia e Proliferação de Células de Osso Alveolar Humano em Diferentes Fases de Diferenciação

Maria de Lurdes Lobo Pereira<sup>\*</sup>, Maria Adelina Costa<sup>\*\*</sup>,

João F.C. Carvalho<sup>\*\*\*</sup>, Maria Helena Raposo Fernandes<sup>\*\*\*\*</sup>

**Resumo:** O tabagismo tem um impacto negativo no tecido ósseo da cavidade oral. A nicotina está presente em níveis elevados no fumo do tabaco e causa efeitos locais e sistémicos que contribuem, de modo directo e/ou indirecto, para os efeitos nefastos do tabagismo no tecido ósseo. O objectivo deste trabalho foi caracterizar o efeito da nicotina na morfologia e proliferação de células de osso alveolar humano numa gama de concentrações representativa dos níveis salivares. As culturas celulares (1ª subcultura) foram mantidas por 14 dias e o efeito da nicotina - 0,1 a 1 mg/ml – foi avaliado em três situações representativas do comportamento de proliferação/diferenciação celular – a adesão celular, a fase de crescimento exponencial e após a confluência. A nicotina provocou efeitos citotóxicos dependentes da dose ( $\geq 0,2$  mg/ml) que incluíram vacuolização citoplasmática, aumento do tamanho celular, perda de definição dos limites celulares, diminuição do número de células aderentes e destruição celular na presença das concentrações mais elevadas (0,5 e 1 mg/ml). A citotoxicidade da nicotina foi elevada durante as fases de adesão e crescimento celular e mínima em culturas confluentes. Os resultados sugerem que a toxicidade directa da nicotina sobre as células osteoblásticas pode contribuir para os efeitos nefastos do tabagismo no tecido ósseo e que a susceptibilidade a estes efeitos depende da fase de diferenciação celular.

**Palavras-Chave:** Nicotina; Culturas celulares de osso alveolar humano; Morfologia celular; Estado de diferenciação celular

**Abstract:** Smoking has a negative impact in the bone tissue of the oral cavity. Nicotine is present in high levels in tobacco smoke and cause local and systemic effects that contribute, in a direct and/or indirect way, to the deleterious effects of smoking in the bone tissue. The aim of this work was to characterise the effect of nicotine in the morphology and proliferation of alveolar bone cells in a concentration range representative of the salivary levels. The cell cultures (first subculture) were maintained for 14 days and the effect of nicotine - 0,1 to 1 mg/ml – was assessed in three experimental situations representative of the cellular proliferation/differentiation behaviour – the cell adhesion, the exponential cell growth and after confluence. Nicotine caused dose-dependent ( $\geq 0,2$  mg/ml) toxic effects that included vacuolation of the cytoplasm, increase in the cell size, loss of cell definition, decreased number of adherent cells and cell destruction in the presence of the higher concentrations (0,5 and 1 mg/ml). Nicotine cytotoxicity was high during the cell adhesion and proliferation and very low in confluent cultures. Results suggest that the direct toxicity of nicotine in the osteoblastic cells might contribute to the negative effects of smoking in the bone tissue and that the susceptibility to these effects is dependent on the stage of cell differentiation.

**Key-words:** Nicotine; Human alveolar bone cell cultures; Cell morphology; Stage of cell differentiation

(Pereira MLL, Costa MA, Carvalho JFC, Fernandes MHR. Efeito da Nicotina na Morfologia e Proliferação de Células de Osso Alveolar Humano em Diferentes Fases de Diferenciação. Rev Port Estomatol Cir Maxilofac 2005;46:81-91)

<sup>\*</sup>Assistente de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

<sup>\*\*</sup>Professora do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

<sup>\*\*\*</sup>Professor de Cirurgia Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

<sup>\*\*\*\*</sup>Professora de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

## INTRODUÇÃO

Os hábitos tabágicos têm sido associados a um risco aumentado de diversas patologias, como doenças cardiovasculares, doenças obstrutivas pulmonares, úlcera péptica, patologias oncológicas e ósseas, entre outras<sup>(1)</sup>. No que diz respeito ao tecido ósseo, o tabagismo parece ser um factor de risco na osteoporose<sup>(2,3)</sup>, na incidência de fractura óssea<sup>(4)</sup> e no prolongamento do tempo de cicatrização<sup>(5,6)</sup>.

Dos numerosos constituintes do tabaco, a nicotina está presente em grande quantidade e os resultados de vários estudos experimentais sugerem o seu envolvimento nos efeitos nefastos do tabagismo no tecido ósseo<sup>(7-9)</sup>. A nicotina é absorvida através da pele e membranas mucosas do tracto respiratório e cavidade oral<sup>(1)</sup> e os níveis plasmáticos, no fumador médio, oscilam entre 15 e 75 ng/ml<sup>(10)</sup>. A nicotina provoca uma variedade de efeitos no tecido ósseo que contribuem, de modo directo e/ou indirecto, para uma perturbação do metabolismo celular e tecidual, bem como da sua resposta à agressão, por exemplo a que ocorre durante o processo de regeneração. Incluem vasoconstrição, com alteração na angiogénese e na irrigação dos tecidos<sup>(7-9)</sup>, diminuição da tensão do oxigénio<sup>(11)</sup> e alteração da resposta imunitária<sup>(1,12,13)</sup>. Estão também descritos efeitos a nível da adesão, proliferação e diferenciação das células ósseas<sup>(14-17)</sup>.

A formação do tecido ósseo durante os processos de desenvolvimento, remodelação e regeneração envolve uma série complexa de eventos que incluem a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos e culminam com a formação de uma matriz extracelular mineralizada<sup>(18)</sup>. A formação óssea constitui um processo dinâmico, sujeito a mecanismos de controlo rigorosos, que é muito sensível a influências sistémicas e locais, por exemplo, à presença de fármacos que afectam de modo directo e/ou indirecto o comportamento das células osteoblásticas nas várias fases de diferenciação<sup>(6)</sup>. No entanto, o efeito directo da nicotina sobre as células ósseas, e em especial os osteoblastos, tem sido pouco estudado e a maioria dos trabalhos descritos diz respeito a células animais e linhas celulares imortalizadas<sup>(14-17)</sup>. Acresce ainda, que as condições experimentais utilizadas nestes trabalhos (modelo osteoblástico, fase de diferenciação celular, dose e tipo de nicotina utilizada e tempo de exposição) são muito variadas, o que dificulta a caracterização dos efeitos da nicotina nas células osteoblásticas e o esclarecimento dos

mecanismos subjacentes.

A nível da cavidade oral, estão também descritos vários efeitos adversos do tabagismo no tecido ósseo. Assim, os fumadores parecem apresentar um risco acrescido de perda óssea alveolar<sup>(19-21)</sup>, mobilidade dentária e perda dentária precoce<sup>(22)</sup>, reabsorção da crista alveolar<sup>(21,22)</sup>, atraso na cicatrização da ferida pós-extração dentária<sup>(23)</sup>, incidência de osso tipo IV<sup>(24)</sup>, doença periodontal<sup>(25,26)</sup>, morbilidade em enxertos ósseos<sup>(8)</sup> e falência na osteointegração de implantes<sup>(27)</sup>. Estes estudos sugerem que o tecido ósseo relacionado com a cavidade oral é muito sensível aos efeitos nefastos do tabagismo. O osso alveolar, que tem uma taxa de renovação muito elevada devido à necessidade de uma constante adaptação a forças oclusais variáveis, parece ser muito afectado<sup>(19-22)</sup>.

Na cavidade oral, os vários tecidos contactam com níveis elevados dos constituintes do fumo do tabaco e os efeitos locais são assim relevantes, como sugerem os vários estudos comparativos entre fumadores e não fumadores relativamente ao estado de saúde oral<sup>(28)</sup>. Assim, por exemplo, a nicotina está presente na saliva, no fluido crevicular e pode também ser encontrada nas superfícies radiculares dos dentes com doença periodontal<sup>(29)</sup>. Os níveis de nicotina na saliva variam entre 70 µg/ml e 1560 µg/ml e no fluido crevicular podem ser 2 a 10 vezes superiores aos níveis plasmáticos<sup>(30)</sup>. O tecido ósseo relacionado com a cavidade oral está, de um modo geral, resguardado do contacto directo com os fluidos orais. No entanto, as substâncias lipofílicas presentes na saliva e fluido crevicular, como é caso da nicotina, podem atingir o tecido ósseo por um processo de difusão passiva que depende apenas de um gradiente de concentrações. Além disso, há circunstâncias em que o tecido ósseo está sujeito aos efeitos locais de substâncias activas presentes na saliva, por exemplo, nos casos de doença periodontal grave, durante o processo de cicatrização pós-extração dentária e também nas situações de enxertos ósseos e colocação de implantes, devido à quebra de integridade dos tecidos envolventes<sup>(23,31)</sup>. Não existem na literatura estudos relativos ao efeito de componentes do fumo de tabaco em células ósseas provenientes de tecidos orais. Assim, o objectivo deste trabalho foi caracterizar o efeito da nicotina, em concentrações que podem estar presentes na saliva de um fumador médio, na morfologia e proliferação de culturas celulares de osso alveolar humano em três fases distintas do ciclo de proliferação-diferenciação celular.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultura celular

A cultura primária foi efectuada a partir de osso alveolar resultante de procedimentos cirúrgicos na cavidade oral. O osso alveolar, que de outro modo seria rejeitado após a cirurgia, foi obtido com consentimento do dador. O tecido ósseo recolhido foi fragmentado em pequenos pedaços, cultivado em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Corning 3055) com “ $\alpha$ -Minimum Essential Medium” (Gibco BRL 12000-097), contendo soro bovino fetal (10%, Gibco 10108 -165), gentamicina (50  $\mu$ g/ml, Gibco 15710-049), penicilina-estreptomicina (100 IU/ml e 100  $\mu$ g/ml, respectivamente, Gibco 15140-114) e anfotericina B (2,5  $\mu$ g/ml, Gibco 15290-026) e incubado à temperatura de 37° C, numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado semanalmente até ao aparecimento das primeiras células.

O crescimento celular a partir dos fragmentos ósseos observou-se após cerca de 7 a 10 dias e as culturas foram mantidas até próximo da confluência, com renovação do meio de cultura duas vezes por semana. Nesta fase, as células aderentes foram libertadas enzimaticamente, com tripsina (0,04%, Sigma T 4799) durante aproximadamente 10 minutos.

A suspensão celular obtida foi cultivada durante 14 dias em placas de 96 poços (Costar 3596) a uma densidade de 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e em condições semelhantes às descritas para a cultura primária, na ausência (culturas controlo) e na presença de nicotina.

O efeito da nicotina ((-) Nicotine ([-]-1-Metyl-2-[3-pyrrolidone]), Sigma N 3876) sobre a morfologia e proliferação celulares foi estudado em três condições experimentais. Assim, as culturas foram expostas à nicotina durante todo o período de incubação (dia 0 ao dia 14), após o processo de adesão celular (dia 1 ao dia 14) e após a fase de confluência (dia 10 ao dia 14).

Utilizaram-se as seguintes concentrações de nicotina - 0,1 mg/ml (0,6 mM); 0,2 mg/ml (1,2 mM); 0,3 mg/ml (1,8 mM); 0,4 mg/ml (2,4 mM); 0,5 mg/ml (3,0 mM); 1mg/ml (6 mM) - representativas das que podem estar presentes na saliva de um fumador médio<sup>(30)</sup>.

As culturas controlo e as culturas expostas à nicotina foram caracterizadas durante o processo de adesão celular (2, 6 e 24 horas) e ao longo do restante período de incuba-

ção (3, 7 e 14 dias). As culturas foram fixadas e coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina.

### Fixação e coloração histoquímica das culturas

As culturas foram lavadas com PBS (“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”, Sigma D-1408) e fixadas com glutaraldeído a 1,5% (Merck 1.04239) em tampão cacodilato de sódio a 0,14 M (TAAB 5007) durante 10 minutos.

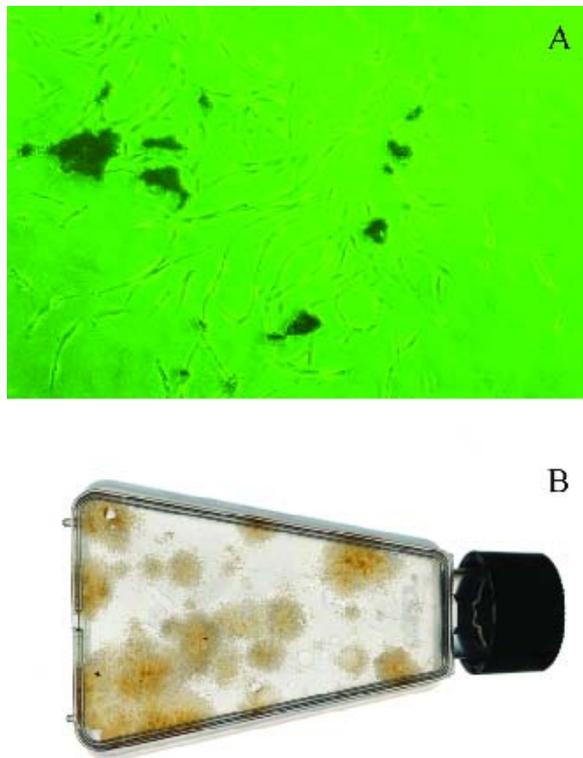
Depois de fixadas, as culturas foram lavadas com água destilada e coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina. Para isso, foram incubadas, no escuro, durante uma hora com uma solução de tampão Tris a 0,1 M, pH 10 (Sigma 8534) contendo  $\alpha$ -naftil fosfato de sódio (Sigma N-7255) e “fast blue RR salt” (Sigma F-0500). A reacção positiva foi identificada por uma coloração entre o castanho amarelado e o preto, dependendo da actividade da enzima. As culturas coradas foram observadas num microscópio óptico de contraste de fase (Nikon, modelo TMS) e fotografadas utilizando um sistema de imagem (Nikon, modelo Digital Net Camera - DN 100).

## RESULTADOS

### Culturas controlo

As culturas primárias foram obtidas pela técnica do explante, isto é, por crescimento celular a partir de fragmentos de osso alveolar. As primeiras células observaram-se 7 a 10 dias após o início das culturas e, seguidamente, verificou-se uma proliferação exponencial ao longo do tempo. As células apresentaram uma morfologia alongada com prolongamentos citoplasmáticos e extenso contacto intercelular. Proliferaram em pequenos agrupamentos que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação e formaram nódulos tridimensionais. Estes nódulos apresentaram uma reacção intensamente positiva para a fosfatase alcalina. A figura 1 mostra o aspecto de uma cultura primária com 12 e 20 dias.

As culturas primárias foram mantidas até ao preenchimento quase completo da superfície de cultura, aproximadamente 20 dias. Nesta fase, foram submetidas a um tratamento enzimático para o destacamento da camada



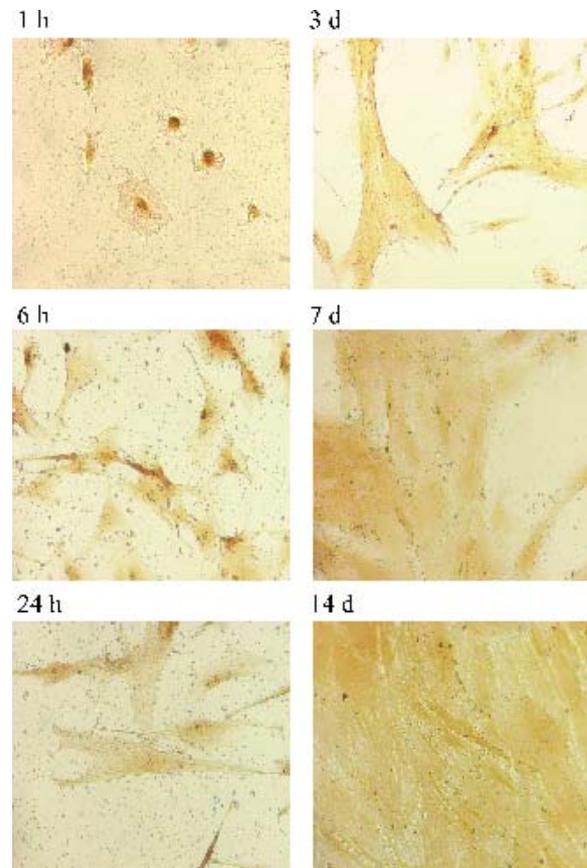
**Figura 1** - Aspecto de uma cultura primária de osso alveolar humano.

A - Crescimento celular a partir dos fragmentos ósseos, 12 dias. Microfotografia de contraste de fase, 40x.

B - Cultura celular corada histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 20 dias. Aspecto macroscópico.

celular aderente. A suspensão celular obtida foi cultivada durante 14 dias – 1ª subcultura – e caracterizada ao longo do tempo de cultura relativamente à morfologia e proliferação celulares.

Imediatamente após a subcultura, as células iniciaram o processo de adesão ao substrato de cultura. Durante as primeiras horas, observaram-se alterações morfológicas profundas devido à expansão do citoplasma para aquisição gradual da forma celular característica. Após aproximadamente 24 horas, este processo estava completo e as células apresentaram um aspecto alongado, núcleo proeminente, nucléolos bem definidos e alguns prolongamentos citoplasmáticos. A partir desta fase, observou-se o crescimento celular gradual e preenchimento da superfície de cultura (fase de confluência) após aproximadamente 10 a 12 dias. À semelhança do observado na cultura primária, o crescimento celular não foi uniforme, notando-se a formação de agrupamentos celulares. As culturas apresentaram reacção positiva para a fosfatase alcalina, sendo a intensidade da reacção superior nas zonas de maior



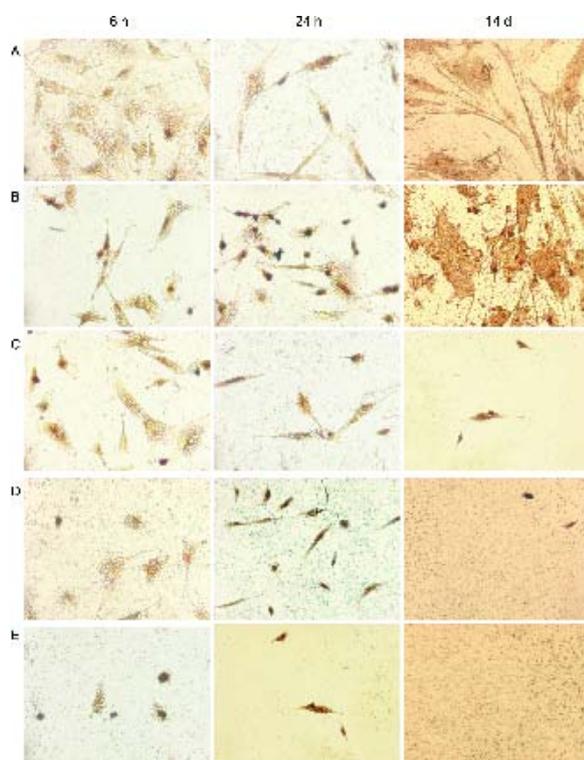
**Figura 2** - Comportamento de uma cultura celular de osso alveolar humano (1ª subcultura) durante a adesão ao substrato de cultura (1, 6 e 24 horas) e ao longo do período de incubação (3, 7 e 14 dias). Microfotografias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x.

densidade celular. A figura 2 documenta o processo de adesão das células de osso alveolar ao substrato de cultura e, também, o seu crescimento ao longo do tempo de incubação.

### Efeito da nicotina

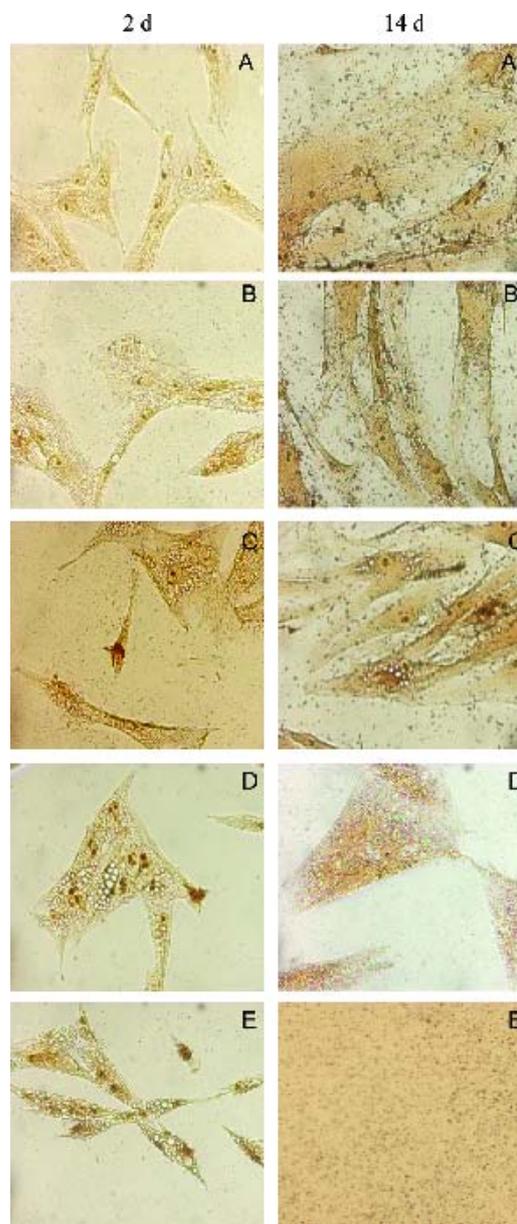
As culturas celulares de osso alveolar (1ª subcultura), cujo comportamento foi descrito na secção anterior, foram utilizadas para avaliar o efeito da nicotina na morfologia e proliferação celulares.

A figura 3 mostra o comportamento das culturas celulares expostas à nicotina durante os 14 dias do período de incubação (dia 0 ao dia 14). A presença de 0,1 mg/ml não provocou efeitos significativos, embora fosse evidente um ligeiro aumento da granulação citoplasmática. A exposição



**Figura 3** - Efeito da nicotina em culturas celulares de osso alveolar humano – exposição durante todo o período de cultura (dia 0 ao dia 14). Microfoto-grafias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x; 6 horas, 24 horas e 14 dias. A - 0,2 mg/ml; B - 0,3 mg/ml; C - 0,4 mg/ml; D - 0,5 mg/ml; E - 1 mg/ml.

a concentrações superiores causou alterações nítidas na morfologia celular, que foram evidentes logo nas primeiras horas de cultura. Assim, durante o processo de adesão, as células expostas à nicotina caracterizaram-se pela presença de vacúolos citoplasmáticos, aumento do tamanho celular e dificuldade de definição dos limites do citoplasma. Estes efeitos foram dependentes da dose e na presença das concentrações mais elevadas, sobretudo 0,5 e 1 mg/ml, observaram-se também indícios de apoptose, evidenciados por um adensamento do núcleo e diminuição da massa citoplasmática. As alterações morfológicas descritas foram visíveis durante o restante período de cultura, verificando-se ainda um efeito inibitório sobre a proliferação celular. Assim, observou-se uma diminuição nítida no número de células aderentes nas culturas expostas a 0,2 e 0,3 mg/ml e morte celular gradual na presença de concentrações superiores. Aos 14 dias, as culturas expostas a 0,4 mg/ml apresentaram apenas restos celulares e o tratamento com 0,5 e 1 mg/ml resultou em morte celular completa nos primeiros 3 a 4 dias de incubação.

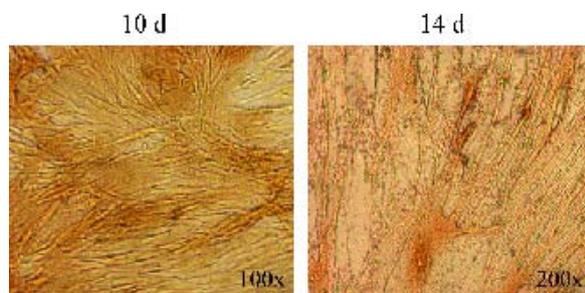


**Figura 4** - Efeito da nicotina em culturas celulares de osso alveolar humano – exposição após o processo de adesão celular (dia 1 ao dia 14). Microfoto-grafias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x; 2 dias (24 horas de exposição) e 14 dias. A - 0,2mg/ml; B - 0,3 mg/ml; C - 0,4 mg/ml; D - 0,5 mg/ml; E - 1 mg/ml.

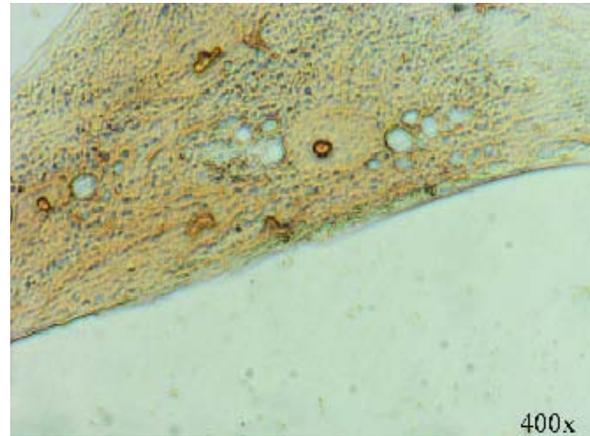
A exposição das culturas celulares à nicotina após o processo de adesão celular (dia 1 ao dia 14) causou efeitos dependentes da dose na morfologia e crescimento celulares (figura 4). Na presença de 0,1 e 0,2 mg/ml não se verificaram alterações significativas no comportamento das culturas relativamente ao observado na situação controlo. A exposição a 0,3 mg/ml provocou a vacuolização de

algumas células e tendência para um aumento do tamanho celular, principalmente nos primeiros dias de cultura. Também se verificou alguma inibição no crescimento celular nos primeiros dias de cultura. Na presença de concentrações mais elevadas ocorreu uma acentuação destes efeitos. Assim, aos 14 dias, as culturas tratadas com 0,5 mg/ml apresentaram apenas algumas células aderentes com uma morfologia muito alterada. Na presença de 1 mg/ml observou-se morte celular completa após aproximadamente uma semana.

O efeito da nicotina foi também estudado em culturas confluentes. Na figura 5 mostra-se o aspecto de uma cultura confluenta que foi tratada com 0,5 mg/ml de nicotina durante 4 dias (adição no dia 10 e exposição até ao dia 14). A presença desta concentração elevada de nicotina não provocou alterações significativas na morfologia e crescimento celulares, bem como na intensidade de colo-ração histoquímica para a fosfatase alcalina. As culturas apresentaram um aspecto semelhante ao observado na situação controlo. Contrariamente, e como se referiu anteriormente, a exposição das células a estes níveis de nicotina na fase inicial da cultura (adição no dia 0 ou no dia 1, figuras 3 e 4) resultou num efeito significativo na morfologia celular, mesmo após algumas horas de exposição. Para comparação de efeitos, mostra-se na figura 6 um pormenor da morfologia de uma célula exposta a 0,5 mg/ml de nicotina durante 4 dias mas em que a exposição ocorreu do dia 1 ao dia 5.



**Figura 5** - Efeito da nicotina – 0,5 mg/ml - em culturas celulares de osso alveolar humano – exposição após a fase de confluência (dia 10 ao dia 14). Microfotografias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina; 10 dias (antes da exposição) e 14 dias (4 dias de exposição).



**Figura 6** - Pormenor da morfologia de uma célula de osso alveolar humano exposta a 0,5 mg/ml de nicotina após o processo de adesão (dia 1 ao dia 5). Microfotografia de uma cultura corada histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina; 5 dias (4 dias de exposição).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se o efeito da nicotina na morfologia e proliferação de culturas celulares de osso alveolar humano. As concentrações de nicotina utilizadas – 0,1 a 1 mg/ml – são representativas das que podem estar presentes na saliva de um fumador<sup>(30)</sup>. A nicotina é uma substância lipofílica e, como tal, é absorvida através da mucosa oral, exercendo vários efeitos a nível sistémico<sup>(1)</sup>. Além disso, contacta com os diferentes tecidos orais e causa um efeito local sobre vários tipos de células, principalmente células epiteliais e fibroblastos gengivais que são as mais acessíveis à exposição salivar. De acordo com esta observação, há uma variedade de estudos que descrevem um efeito directo da nicotina nestes tipos celulares que é dependente da dose e do tempo de exposição<sup>(32-39)</sup>. Há circunstâncias em que o tecido ósseo relacionado com a cavidade oral pode sofrer a influência de um efeito local de substâncias activas presentes na saliva. São exemplos, as situações de doença periodontal grave (que tem maior incidência nos fumadores)<sup>(40)</sup> e processos pós-cirúrgicos que possibilitam a acessibilidade ao tecido ósseo, o que se verifica após uma extracção dentária<sup>(23,31)</sup> e, também, quando da colocação de implantes<sup>(41)</sup>. Relativamente a este último aspecto, os resultados de um estudo clínico longitudinal que envolveu 2900 implantes dentários sugeriram que a

exposição local dos tecidos peri-implantares às substâncias tóxicas presentes no fumo do tabaco constitui o principal factor que contribui para a maior taxa de falência observada nos fumadores relativamente aos não fumadores<sup>(42)</sup>.

Não existem estudos relativos ao efeito local da nicotina nas células ósseas relacionadas com a cavidade oral. As culturas celulares de osso alveolar parecem ser um modelo apropriado para a caracterização destes efeitos pois este tecido ósseo tem uma taxa de renovação muito elevada, sendo de esperar que seja muito susceptível aos efeitos de substâncias activas presentes no meio circundante. Em concordância com esta observação, referem-se os variados estudos clínicos que mostram que o tabagismo tem um efeito nefasto no osso alveolar<sup>(19-22)</sup>.

As condições experimentais utilizadas neste trabalho permitiram obter culturas celulares com características osteoblásticas, evidenciadas pelo padrão de crescimento celular, com tendência para a formação de estruturas nodulares, e a presença de uma actividade elevada de fosfatase alcalina<sup>(18)</sup>. O estudo foi realizado na 1ª subcultura (cultura obtida directamente da cultura primária) pois trabalhos anteriores mostraram que há uma diminuição progressiva das características osteoblásticas com a subcultura sucessiva<sup>(43)</sup>. O efeito da nicotina foi avaliado em três situações experimentais representativas do comportamento de proliferação/diferenciação celular – a adesão celular, a fase de crescimento exponencial e a fase de confluência<sup>(44)</sup>.

As células ósseas são células aderentes e, assim, a adesão ao substrato (in vivo, uma superfície óssea pré-existente; in vitro, a superfície de cultura) constitui um pré-requisito para a proliferação e diferenciação normais<sup>(44,45)</sup>. Durante este processo observa-se a reorganização do citoesqueleto, estrutura que é determinante na organização do citoplasma, posição dos organelos, tradução e estabilidade do ARNm, movimento da célula e de componentes subcelulares, modelação da forma da célula, divisão celular e diferenciação<sup>(46,47)</sup>. Deste modo, a avaliação do efeito de uma determinada substância no processo de adesão celular providencia informação sobre a sua eventual toxicidade. A alteração do padrão normal da adesão celular traduz-se num comprometimento da viabilidade celular pois apenas as células aderentes que apresentam a morfologia fenotípica característica iniciam o processo de proliferação/diferenciação. Os resultados apresentados na figura 3 mostram que a nicotina afectou

o processo de adesão celular, de modo dependente da dose, para concentrações iguais e superiores a 0,2 mg/ml, sendo a vacuolização citoplasmática o efeito mais notório. No entanto, na presença das concentrações mais altas, 0,5 e 1 mg/ml de nicotina, este efeito conduziu a lise celular, pois nas culturas de 24 horas eram visíveis apenas algumas células aderentes.

Após a adesão, as células iniciam o processo de proliferação/diferenciação. De início, a população celular é muito proliferativa e pouco diferenciada e, progressivamente, torna-se menos proliferativa e mais diferenciada<sup>(44)</sup>. Na fase de crescimento activo, as células têm uma elevada actividade metabólica, sendo muito susceptíveis ao efeito de substâncias activas<sup>(18)</sup>. Os resultados apresentados na figura 4 mostram que a exposição das culturas à nicotina após o processo de adesão e durante a fase de crescimento celular (dia 1 ao dia 14) resultou em efeitos adversos significativos na morfologia e no número de células aderentes, que foram dependentes da dose. No entanto, para igual concentração e tempo de exposição, o efeito citotóxico foi de menor intensidade que o observado quando as culturas foram expostas durante todo o período de cultura (dia 0 ao dia 14, figura 3). Assim, a nicotina afectou o comportamento celular para concentrações iguais e superiores a 0,3 mg/ml e, na presença de concentrações mais elevadas, 0,5 e 1 mg/ml, a lise celular foi menos significativa e ocorreu para tempos de exposição mais elevados (figura 4).

Na fase de confluência, altura em que há o preenchimento completo da superfície de cultura, as células apresentam um índice mitótico muito baixo (devido à inibição do crescimento por contacto celular) e exibem com maior intensidade as características fenotípicas<sup>(44)</sup>. Os resultados deste trabalho mostraram que, nesta fase, as culturas celulares de osso alveolar apresentaram uma susceptibilidade mínima à presença de nicotina (figura 5), não se observando alterações aparentes na morfologia e densidade celulares e, também, na intensidade da reacção histoquímica para a fosfatase alcalina. Este comportamento explica-se, em parte, pela baixa actividade metabólica celular e, por isso, uma menor sensibilidade ao meio circundante<sup>(18)</sup>.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os efeitos citotóxicos da nicotina dependem do estado de proliferação/diferenciação celular. Esta observação está de acordo com estudos anteriores que mostram que a susceptibilidade celular a níveis tóxicos de substâncias activas é maior nas fases iniciais, nomeadamente durante

a adesão e a proliferação activa<sup>(48)</sup>. Este facto está relacionado com as características da população celular, como se referiu anteriormente, mas também, com a diferente acessibilidade das células ao contacto com as substâncias activas presentes no meio. Assim, por exemplo, na fase de confluência, a área de exposição celular é relativamente pequena, devido ao grande contacto intercelular (e, por vezes, formação de multicamadas) e à presença da matriz extracelular.

A observação das figuras 3 e 4 mostra que a vacuolização do citoplasma, com conseqüente aumento do tamanho celular, foi a alteração morfológica mais característica observada nas culturas expostas à nicotina. Esta substância é uma base fraca ( $pK_a = 7,9$ ) e, após a sua difusão para a célula, tem tendência a acumular-se nos lisossomas pois estes organelos têm um meio relativamente ácido. A elevação da concentração de nicotina no interior dos lisossomas é acompanhada por um aumento da entrada de água nestas estruturas e os lisossomas convertem-se em vacúolos que se tornam progressivamente maiores com o tempo de exposição. Dependendo da dose e/ou do tempo de exposição, o processo de vacuolização pode resultar em destruição celular. Esta alteração morfológica está descrita em trabalhos anteriores envolvendo vários tipos de células, como fibroblastos gengivais e periodontais<sup>(33,34,49)</sup>, macrófagos<sup>(50)</sup> e células osteoblásticas provenientes de calvária de embrião de pinto<sup>(14)</sup>. Este autor descreveu um efeito de vacuolização em culturas confluentes expostas durante 2 dias a níveis de nicotina de 0,1 a 0,6 mg/ml<sup>(14)</sup>. A diferença de susceptibilidade celular relativamente ao observado neste trabalho e documentado na figura 5 está provavelmente relacionada com as características dos modelos osteoblásticos usados e o grau de confluência das culturas. A acumulação de nicotina nos lisossomas (com conseqüente vacuolização citoplasmática) pode funcionar como um mecanismo protector da célula contra os efeitos da nicotina<sup>(49)</sup>. No entanto, durante a sua difusão para os lisossomas, a nicotina pode afectar estruturas e processos citoplasmáticos envolvidos na proliferação e/ou actividade funcional. Por outro lado, as alterações morfológicas induzidas pela nicotina têm muito provavelmente repercussões a nível do crescimento celular<sup>(34)</sup>. Assim, estão descritos efeitos adversos na taxa de crescimento e na actividade de diversos tipos de células expostas a concentrações de nicotina semelhantes às utilizadas neste estudo<sup>(14,38)</sup>.

O trabalho em curso compreende a caracterização dos efeitos de níveis plasmáticos e salivares de nicotina na

organização do citoesqueleto, proliferação e actividade funcional de células osteoblásticas humanas, nomeadamente na síntese de proteínas da matriz extracelular e no processo de mineralização.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que a nicotina afecta negativamente a morfologia e a proliferação de células provenientes de osso alveolar humano, em concentrações representativas das que podem estar presentes na saliva de um fumador. A susceptibilidade aos efeitos tóxicos da nicotina depende do estado de diferenciação celular, sendo grande durante o processo de adesão ao substrato e proliferação exponencial e pequena na fase de confluência. Os resultados sugerem que a toxicidade directa da nicotina sobre as células osteoblásticas pode contribuir para os efeitos nefastos do tabagismo no tecido ósseo da cavidade oral.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e o Conselho de Prevenção do Tabagismo no âmbito de um protocolo de investigação entre as duas instituições

O trabalho experimental foi efectuado no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

## BIBLIOGRAFIA

1. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 1986;37:21-32.
2. Jeffcoat MK, Chesnut CH. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. *JADA* 1993;124:49-56.
3. Laroche M, Lasne Y, Felez A. Osteocalcin and smoking. *Rev Rhum Ed Fr* 1994;61:433-6.
4. Pocock N, Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN, Yeates MG. Effects of tobacco on axial and appendicular bone mineral density. *Bone* 1989;10:329-31.
5. Ueng SW, Lee MY, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study in rabbits. *J Trauma* 1997;42:231-8.
6. Kalfas IH. Principles of Bone healing. *Neurosurg Focus* 2001;10:1-4.
7. Daftari KT, Whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, MacCary BE, Hutton CW. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994;19:904-11.
8. Hollinger OJ, Schmitt JM, Hwang K, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294-301.
9. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002;13:3-9.
10. Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J* 1976;1:1043-6.
11. Jensen J, Goodson W, Hopf H, Hunt TK. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg* 1991;126:1131-4.
12. Pabst MJ, Pabst KM, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS, Waring MB, Jegdish P. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 1995;66:1047-55.
13. Mariggio MA, Guida L, Laforgia A, Santacrose R, Curci E, Montemurro P. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? *J Periodont Res* 2001;36:32-9.
14. Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;197:36-43.
15. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991;12:283-6.
16. Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol* 1999;383:387-93.
17. Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001;28:603-8.
18. Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: 1996:69-86.
19. Bolin A, Eklund G, Frithiof L, Lavstedt S. The effect of changed smoking habits on marginal alveolar bone loss. *Swed Dent J* 1993;17:211-6.
20. Mullally BH, Breen B, Linden GJ. Smoking and patterns of bone loss in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:349-401.
21. Krall E, Garvey AJ, Garcia RI. Alveolar bone loss and tooth loss in male cigar and pipe smokers. *JADA* 1999;130:57-64.
22. Albandar JM, Adesanya MR, Streckfus CF, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as a risk factor for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000;71:1874-81.

23. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Maxillofac Surg* 1988;26:402-9.
24. Bain CA, Moy PK. The influence of smoking on bone quality and implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:123.
25. Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: Etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998;3:88-101.
26. Bergström J, Dock J, Eliasson S. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000;27:61-8.
27. Esposito M, Hirsch J, Lehholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (II) Etiopathogenesis. *Euro J Oral Sci* 1998;106:721-64.
28. Macgregor ID. Smoking and periodontal disease. In: Seymour RA, Heasman PA, eds. *Drugs, diseases, and the periodontium*. Oxford, New-York and Tokyo: Oxford Medical Publications, 1992:117-30.
29. Cuff MJA, MacQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol* 1989;60:564-9.
30. Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981;41:4305-8.
31. Sweet JB, Butler DP. The relationship of smoking to localized osteitis. *J Oral Surg* 1979;37:732-5.
32. Hanes JP, Schuster SG, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991;147-52.
33. Tipton DA. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:1056-64.
34. Alpar B, Leyhausen G, Sapotnick A, Günay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingiva fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998;2:40-6.
35. James JA, Sayers MN, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999;70:518-25.
36. Austin WG, Cuenin FM, Hokett SD, Peacock ME, Sutherland DE, Erbland JF, Billman AM. Effect of nicotine on fibroblast b 1 ntegrin expression and distribution in vitro. *J Periodontol* 2001;72:438-44.
37. Giannopoulou C, Roehrich N, Mombelli A. Effects of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2001;28:769-75.
38. Chang Y-C, Huang F-M, Yang L-C, Chou M-Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodont Res* 2002;37:279-85.
39. Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol* 2002;29:763-70.
40. Haber J. Cigarette smoking: A major risk factor for periodontitis. *Compend Contin Educ Dent* 1995;XV:1002-14.
41. Decker BC. Osseointegration. In: Miloro M, ed. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2 ed. London: 2004:189-203.
42. Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Ann Periodontol* 2000;5:79-89.
43. Fernandes HR, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mat Sci: Mat Med* 1997;8:61-5.
44. Freshney RI. Biology of the cultured cell. In: Freshney RI, ed. *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique*, 3 Th ed. Wiley-Liss, 1994:9-16.
45. Gwynn IAP. Cell biology at interfaces. *J Mat Sci: Mat Med* 1994;5:357-60.

46. David- Ferreira JF. Citoesqueleto: Composição, organização e significado funcional. In: Azevedo C, ed. *Biologia celular*. Lisboa: Lidel-Edições Técnicas, 1994:189-202.
47. Alberts B, Bray D, Lewis J, Ratt M, Roberts K, Watson JD. The cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*, Third Edition ed. New York and London: Garland Publishing, Inc, 1994:787-861.
48. Costa MA, Fernandes HR. Proliferation/differentiation of osteoblastic human bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion. *J Mat Sci: Mat Med* 2000;11:141-53.
49. Chamson A, Garrone R, Auger C, Frey J. Effects of Tobacco smoke extracts on the ultrastructure of fibroblasts in culture. *J Submicrosc Cytol* 1980;12:401-6.
50. Ohkuma S, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J Cell Biol* 1981;90:656-64.

