

Efeito da Nicotina no Processo de Formação Óssea Alveolar: Estudo em Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano

Maria de Lurdes Lobo Pereira *, João F.C. Carvalho **,

Maria Helena Raposo Fernandes ***, Fernando Peres ****

Resumo: A nicotina parece ter um papel importante nos efeitos nefastos do fumo do tabaco no tecido ósseo, provavelmente devido a uma combinação de mecanismos.

O objectivo deste trabalho foi caracterizar o efeito da nicotina (0,05 a 1 mg/ml) na proliferação e diferenciação osteoblástica de células de osso alveolar humano, numa gama de concentrações representativa dos níveis salivares determinados nos consumidores de tabaco.

As culturas celulares (1ª subcultura) foram mantidas por um período de 35 dias, tendo a nicotina sido adicionada após o processo de adesão celular (culturas de 24 h).

A nicotina provocou efeitos dependentes da dose. Na presença de concentrações inferiores a 0,3 mg/ml, observou-se um efeito de estimulação na proliferação celular, actividade da fosfatase alcalina e formação de uma matriz mineralizada. A exposição a concentrações superiores resultou num efeito negativo nestes parâmetros celulares.

Os resultados sugerem que os efeitos da nicotina na proliferação e diferenciação osteoblástica de células de osso alveolar humano podem modular o metabolismo ósseo por um efeito directo e, conseqüentemente, influenciar os processos de cicatrização óssea alveolar.

Palavras-Chave: Nicotina; Culturas celulares de osso alveolar humano; Proliferação celular; Diferenciação osteoblástica

Abstract: Nicotine appears to play a significant role in the adverse effects of tobacco smoking in the bone tissue, most probably due to a combination of mechanisms.

The aim of this work was to characterise the effect of nicotine (0,05 to 1 mg/ml) in the proliferation and osteoblastic differentiation of human alveolar bone cells, in a concentration range representative of the levels found in the saliva of the average tobacco user. The cell cultures (first subculture) were maintained for 35 days and nicotine was added after the cell adhesion process (cultures with 24 h).

Nicotine caused a dose-dependent effect. The presence of concentrations lower than 0.3 mg/ml caused an increase in the cell proliferation, alkaline phosphatase activity and matrix mineralization. The exposure to higher levels resulted in negative effects in these cellular parameters.

Results suggest that the effects of nicotine in the proliferation and osteoblastic differentiation of human alveolar bone cells might directly modulate bone metabolism and, consequently, affect alveolar bone cicatrization.

Key-words: Nicotine; Human alveolar bone cell cultures; Cell proliferation; Osteoblastic differentiation

(Pereira MLL, Carvalho JFC, Fernandes MHR, Peres F. Efeito da Nicotina no Processo de Formação Óssea Alveolar: Estudo em Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano. Rev Port Estomatol Cir Maxilofac 2006;47:79-90)

* Assistente das disciplinas de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

** Professor catedrático. Regente da disciplina de Cirurgia Oral I da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

*** Professora catedrática. Regente das disciplinas de Farmacologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

**** Professor catedrático. Regente da disciplina de Cirurgia Oral III da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Coordenador dos mestrados de Cirurgia Oral e Implantologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

INTRODUÇÃO

A criação de um defeito ósseo alveolar desencadeia um processo que se caracteriza por uma sequência de fenómenos inflamatórios, fibroplásticos, angiogénicos, osteogénicos e de epitelização, culminando com o preenchimento do alvéolo por novo osso⁽¹⁾. A formação de novo osso envolve uma complexa série de eventos que incluem a migração de células osteoprogenitoras e a sua proliferação e diferenciação em osteoblastos, que sintetizam uma matriz extracelular colagenosa que é subsequentemente mineralizada⁽²⁾. A formação de uma matriz óssea mineralizada é condição necessária para a reabilitação das estruturas envolvidas, a qual pode ocorrer simultaneamente ou após a cicatrização⁽³⁾.

O processo de cicatrização alveolar foi descrito com detalhe por vários autores⁽³⁻⁶⁾ que mostraram que a formação de novo osso é um fenómeno precoce durante o processo cicatricial. Amler descreveu o aparecimento de uma matriz óssea não mineralizada entre o 4º e o 7º dia e mostrou a sua mineralização pelo método de von Kossa ao 20º dia⁽³⁾. Boyne referiu a formação de novo osso nos espaços medulares justa - alveolares entre o 7º e 8º dia⁽⁵⁾. O tecido ósseo inicialmente formado é um tecido esponjoso primário que é obtido por uma rápida deposição de matriz ao longo dos trajectos vasculares presentes no tecido de granulação. Caracteriza-se por possuir uma matriz pouco organizada e rica em elementos celulares e por ter uma fraca resistência à carga⁽⁷⁾. No entanto, a formação deste tecido ósseo é essencial no processo de cicatrização, pois constitui uma fonte de células osteoprogenitoras e é ricamente vascularizado⁽⁷⁾.

Há uma grande variedade de factores que influenciam a cicatrização óssea, sendo os mais significativos relacionados com má-nutrição, diabetes, osteoporose, artrite reumatóide e tabagismo⁽⁸⁾. Em relação ao tabagismo, os vários estudos sugerem uma contribuição significativa da nicotina nos efeitos negativos que se observam no tecido ósseo⁽⁹⁻¹¹⁾. A nicotina apresenta um leque variado de acções que se manifestam a nível da resposta imunitária⁽¹²⁻¹⁴⁾, na angiogénese e revascularização^(10,11,15) e na reepitelização^(16,17), entre outras. Estas acções podem contribuir, pelo menos em parte, para o efeito negativo da nicotina nos processos de cicatrização em geral e do tecido ósseo em particular. Está também documentado um efeito directo da nicotina nas células ósseas. No entanto, a informação disponível é dispersa pois estes estudos têm sido condu-

zidos em condições experimentais muito diversas no que diz respeito ao modelo celular, gama de concentrações de nicotina estudada e tempo de exposição. Acresce ainda que muitos dos trabalhos foram efectuados em células animais⁽¹⁸⁾ ou linhas celulares imortalizadas^(19,20), e a utilização de células humanas tem sido pouco frequente^(21,22).

A nicotina está presente em grande quantidade no fumo do tabaco e é detectada no plasma e fluidos orais dos consumidores de tabaco⁽¹²⁾.

São vários os autores que determinaram as concentrações plasmáticas de nicotina. Assim, Russel e col descreveram níveis plasmáticos que variam de 4 e 72 ng/ml⁽²³⁾. O mesmo autor, noutro estudo em que comparou os níveis de nicotina imediatamente após o acto de fumar e a utilização de pastilhas elásticas de nicotina, mediu concentrações plasmáticas que oscilam entre 15,5 e 48,4 ng/ml⁽²⁴⁾. A forma de utilização do tabaco (por inalação ou oralmente) não parece causar grande variação nas concentrações plasmáticas de nicotina. Com efeito, Hill e col referiram que os níveis plasmáticos oscilam entre 22,6 e 73 ng/ml imediatamente após o uso do tabaco, independentemente da forma como é utilizado⁽²⁵⁾. Gritz e col⁽²⁶⁾ mostraram que os níveis sanguíneos nos mascadores de tabaco eram semelhantes aos encontrados nos fumadores de cigarros e oscilavam entre 11,2 e 45,8 ng/ml. A avaliação dos níveis plasmáticos de nicotina nos fumadores de cigarros e nos fumadores de charuto ou cachimbo mostrou valores da ordem dos 15,7 ng/ml e 10,8 ng/ml respectivamente⁽²⁷⁾. Verifica-se assim uma relativa uniformidade nos valores encontrados por diferentes autores.

A nicotina está presente no fluido crevicular em concentrações muito superiores às determinadas no plasma⁽²⁸⁾. Ryder e col encontraram valores de 5961 ng/ml após exposição ao fumo do tabaco por um período de 1 a 5 minutos⁽²⁹⁾. Há também estudos que referem a presença da nicotina nas superfícies radiculares dos dentes com doença periodontal grave⁽³⁰⁾.

Relativamente aos níveis salivares de nicotina, há uma dispersão na informação disponível na literatura. Assim, alguns autores descreveram níveis salivares que variam entre 96 ng/ml e 1,6 mg/ml mas não especificaram a forma de utilização do tabaco (Pabst e col, Tipton e col, McGuire e col, citados por James e col)⁽³¹⁾. Hoffamn e col determinaram níveis salivares de nicotina entre 0,07 e 1,56 mg/ml nos indivíduos mascadores de tabaco⁽³²⁾. Ryder e col, num estudo em que avaliaram as concentrações salivares de nicotina imediatamente antes e após o acto de fumar

um cigarro, observaram, respectivamente, concentrações de 109 ng/ml e 1821 ng/ml⁽³³⁾. Segundo os autores, estes resultados sugerem que, durante a permanência do fumo do tabaco na cavidade oral, existe uma elevada incorporação de nicotina (e, provavelmente, de outros constituintes do fumo) na saliva. Também, Payne e col e Benzwig e col (cits por James e col) indicaram que, durante o acto de fumar, as concentrações de nicotina podem atingir valores muito mais elevados que os normalmente descritos para o plasma e saliva⁽³¹⁾.

A cavidade oral do fumador e outros consumidores de tabaco está sujeita aos efeitos locais e sistémicos da nicotina. Os efeitos locais traduzem-se por uma acção directa nas células do epitélio oral e, também, em estruturas menos acessíveis como o tecido ósseo, nas situações de perda de integridade tecidual, por exemplo, durante o processo de cicatrização que ocorre após a criação de um defeito ósseo alveolar.

O tecido ósseo oral, em particular o osso alveolar, possui uma elevada taxa de remodelação⁽³⁴⁾ e, deste modo, é muito sensível às características do meio circundante, nomeadamente a presença de substâncias exógenas como, por exemplo, a nicotina. As culturas de células provenientes de osso alveolar humano efectuadas em determinadas condições experimentais expressam a sequência completa de diferenciação osteoblástica^(35,36). Estas culturas celulares apresentam uma fase proliferativa e a formação de uma matriz extracelular mineralizada, numa sequência temporal de 21 - 28 dias. Este comportamento é semelhante ao observado durante o processo de cicatrização alveolar. Assim, as culturas de células osteoblásticas provenientes de osso alveolar humano constituem um modelo potencial para o estudo da fisiologia e farmacologia deste tecido ósseo. Os resultados de um estudo efectuado recentemente mostraram que a nicotina induz alterações significativas na morfologia das células de osso alveolar humano em cultura e também interfere com a sua proliferação⁽²²⁾. O presente trabalho tem como objectivo a caracterização mais completa do efeito da nicotina sobre o comportamento de proliferação/diferenciação deste tipo celular. As culturas celulares de osso alveolar foram expostas a uma gama de concentrações de nicotina representativa dos níveis presentes na saliva de consumidores de tabaco e avaliadas relativamente à proliferação celular, actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das culturas celulares

As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de osso alveolar humano resultante de procedimentos cirúrgicos na cavidade oral. A cultura primária foi obtida pela técnica de explante⁽³⁷⁾. O osso alveolar foi cortado em pequenos fragmentos que foram cultivados em frascos de 25 cm² em "α-Minimal Essential Medium" enriquecido com 10% de soro bovino fetal e na presença de gentamicina (50 µg/ml), penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml e 10.000 µg/ml, respectivamente) e anfotericina B (2,5 µg/ml).

As culturas foram incubadas a 37° C numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado semanalmente até ao aparecimento das primeiras células.

A migração celular a partir dos fragmentos ósseos verificou-se cerca de 10 dias após o início da cultura primária, sendo esta mantida até próximo da confluência, com renovação do meio de cultura duas vezes por semana. Nesta fase, os fragmentos foram removidos e as células aderentes libertadas enzimaticamente com tripsina e colagenase (0,04% e 0,025%, respectivamente) durante aproximadamente 10 minutos.

A suspensão celular obtida por libertação enzimática das células da cultura primária foi cultivada durante 35 dias em placas de 96 poços a uma densidade de 10⁴ células/cm² na ausência (culturas controlo) e na presença de nicotina. As condições experimentais foram semelhantes às descritas na obtenção da cultura primária, mas o meio de cultura foi suplementado com ácido ascórbico (50 µg/ml), β-glicerofosfato de sódio (10 mM) e dexametasona (10 nM). A nicotina (-)-Nicotine, ([-]-1-metil-2-(3-pirrolidina)), foi adicionada às culturas após o processo de adesão celular (culturas de 24 horas) e esteve presente durante todo o tempo de incubação. O meio de cultura foi substituído três vezes por semana. Utilizaram-se as seguintes concentrações de nicotina: 0,05 mg/ml (0,3 mM); 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 mM) e 1 mg/ml (6 mM).

As culturas controlo e as culturas expostas à nicotina foram caracterizadas nos dias 5, 7, 14, 21, 28 e 35 relativamente ao conteúdo em proteína total, actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais (neste caso, nos dias 7, 14, 21, 28 e 35).

Caracterização das culturas celulares

Métodos bioquímicos

Conteúdo em proteína total

O conteúdo em proteína total foi avaliado pelo método de Lowry⁽³⁹⁾, após a remoção do meio de cultura, lavagem com tampão PBS ("Phosphate Buffer Solution") e dissolução da camada celular com NaOH a 0,1 M. Os resultados foram expressos em microgramas de proteína total por centímetro quadrado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Actividade da fosfatase alcalina

A actividade da fosfatase alcalina foi determinada em lisados da camada celular (tratamento com 0,1% de Triton) pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado ($\lambda = 405 \text{ nm}$). A actividade da fosfatase alcalina foi expressa em nmol de substrato metabolizado por minuto e por μg de proteína (nmol/min/ μg proteína).

Métodos histoquímicos

As culturas foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído a 1,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,14 M durante 10 minutos, seguindo-se lavagem com água destilada. As culturas fixadas foram coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina e de depósitos de cálcio e de fosfato. Seguiu-se a observação num microscópio óptico de contraste de fase e fotografia num sistema de imagem digital.

Fosfatase alcalina

Após fixação, as culturas foram incubadas no escuro, durante 1 hora, com uma solução de α -naftil fosfato de sódio e "fast blue RR salt" em tampão Tris a 0,1 M, pH 10. No fim do tempo de incubação, a reacção foi interrompida por lavagem das amostras com água destilada. A reacção positiva foi identificada por uma coloração que variou entre o amarelo acastanhado e o preto, dependendo da actividade da enzima.

Depósitos de cálcio –

Método da alizarina vermelha (AV)

As culturas celulares, após fixação, foram cobertas com uma solução de alizarina vermelha S a 1% em $\text{NH}_4 \text{OH}$ a 0,028%, pH 6,4, durante dois minutos, sendo depois lavadas com água destilada e posteriormente com etanol ácido. A presença de depósitos de cálcio foi identificada pelo aparecimento de uma coloração vermelha na matriz.

Depósitos de fosfato –

Método de von Kossa (VK)

As culturas fixadas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata 0,1% e mantidas sob luz ultravioleta durante 1 hora. Terminado o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com água destilada e recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio a 0,5%, durante dois minutos, e depois novamente lavadas com água destilada. Os depósitos de fosfato apresentaram uma coloração negra.

Análise estatística

Foram efectuadas seis experiências independentes, sendo as culturas celulares estabelecidas a partir de material biológico proveniente de pacientes diferentes. Em cada experiência, foram efectuadas 6 réplicas. Observou-se uma relativa variabilidade entre experiências, mas o padrão de comportamento das culturas efectuadas em situação controlo e na presença de nicotina foi idêntico nos vários ensaios. Apresentam-se os resultados de uma experiência considerada representativa.

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo método ANOVA. As diferenças observadas entre as culturas controlo e as culturas expostas à nicotina foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A migração celular a partir dos fragmentos ósseos observou-se a partir da 2ª semana de cultura (Figura 1A). As células proliferaram de forma gradual, em redor dos fragmentos, originando agrupamentos celulares que se foram interligando ao longo do tempo de incubação. A cultura

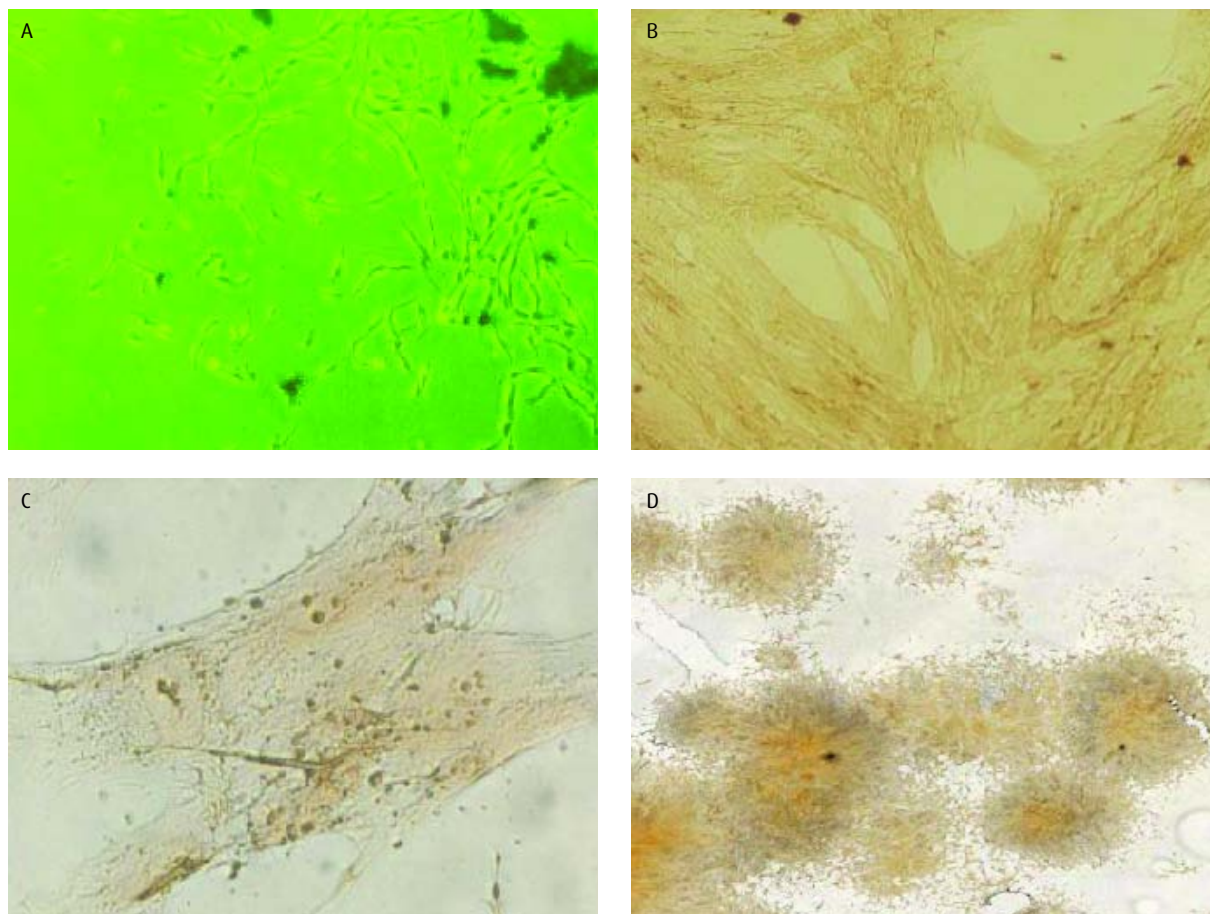


Figura 1 - Aspecto morfológico de uma cultura primária de osso alveolar humano. Células em cultura (ausência de coloração): **A** - cultura com 15 dias (40x). Culturas coradas para presença de fosfatase alcalina: **B** - 15 dias (100x); **C** - 15 dias (200x); **D** - 28 dias (aspecto macroscópico).

primária foi mantida durante aproximadamente 20 dias, tempo necessário para se verificar a ocupação quase completa da superfície de cultura (cerca de 80 a 90% de confluência). A confirmação do fenótipo osteoblástico das células em cultura foi efectuada pela identificação histoquímica da fosfatase alcalina (Figuras 1B, 1C e 1D). As células da primeira passagem foram cultivadas durante 35 dias na ausência e na presença de nicotina.

Efeito da Nicotina na proliferação celular

O efeito da nicotina na proliferação celular foi avaliado através da determinação do conteúdo em proteína total (Figura 2A).

As culturas controlo apresentaram um aumento do conteúdo proteico até ao dia 28, sendo mais acentuado durante a 4ª semana de cultura.

A exposição das culturas à nicotina nas concentrações de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,2 mg/ml resultou num aumento do conteúdo em proteína total durante todo o tempo de incubação, sendo este efeito proporcional à dose.

Assim, no dia 21 e relativamente à situação controlo, observou-se um aumento de respectivamente 12,9%, 26,9% e 68,9%. Na presença de 0,3 mg/ml de nicotina verificou-se um ligeiro efeito inibitório no conteúdo em proteína total durante a 1ª semana mas, logo a seguir, um aumento significativo deste parâmetro (cerca de 52%, no dia 21).

A nicotina, em concentrações iguais ou superiores a 0,4 mg/ml, provocou uma diminuição do conteúdo em proteína total, dependente da dose. Assim, as culturas expostas a 0,4 mg/ml apresentaram um aumento gradual do conteúdo em proteína total, ao longo do tempo de incubação, mas os valores foram cerca de 50% dos observados nas culturas controlo. Na presença de 0,5 mg/ml os níveis foram baixos e estáveis durante as duas primeiras semanas, ocorrendo seguidamente uma descida gradual ao longo do restante tempo de cultura. As culturas expostas a 1 mg/ml apresentaram níveis insignificantes de proteína total.

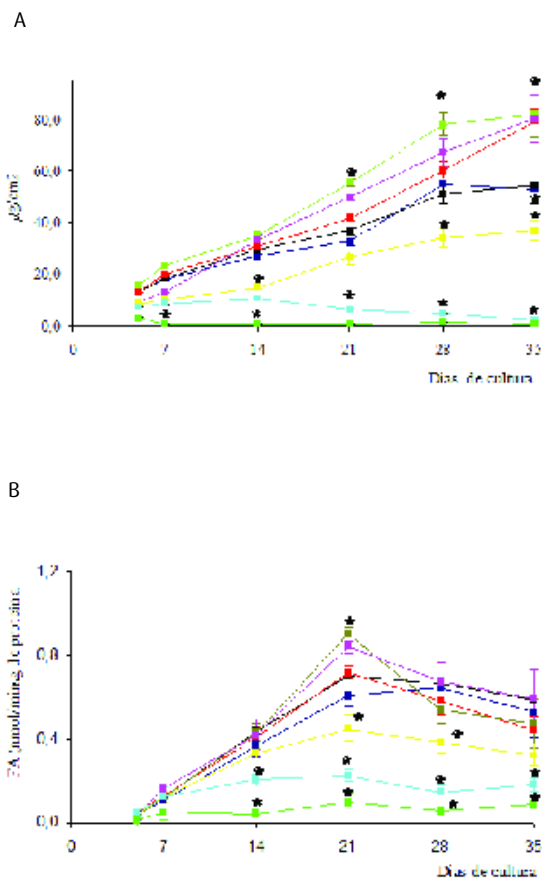


Figura 2 - Efeito da nicotina no conteúdo em proteína total (A) e actividade de fosfatase alcalina (B) de culturas celulares de osso alveolar humano. Situação controlo (■). Presença de nicotina: 0,05 (■); 0,1 (■); 0,2 (■); 0,3 (■); 0,4 (■); 0,5 (■) e 1 (■) mg/ml.

*Significativamente diferente da situação controlo

Efeito da nicotina na actividade de fosfatase alcalina

A actividade de fosfatase alcalina das culturas celulares (Figura 2 B) foi expressa em nmol de substrato hidrolisados por minuto e por μg de proteína, deste modo, normalizada em termos de crescimento celular.

Nas culturas controlo, a actividade da fosfatase alcalina aumentou de modo significativo nas 2^a e 3^a semanas de cultura, seguindo-se uma fase estacionária. Os valores máximos foram observados entre os dias 21 e 28.

A exposição das culturas a níveis de nicotina compreendidos entre 0,05 e 0,3 mg/ml resultou num aumento da actividade da fosfatase alcalina, que foi dependente da dose. A estimulação foi sobretudo evidente durante a 3^a semana de cultura e os valores máximos foram observados por volta do dia 21. A partir da 4^a semana, observou-se

uma diminuição progressiva da actividade enzimática, sendo este efeito mais acentuado nas culturas expostas a 0,2 e 0,3 mg/ml de nicotina.

A exposição a concentrações de nicotina iguais ou superiores a 0,4 mg/ml resultou numa inibição da actividade da fosfatase alcalina ao longo de todo o tempo de incubação. Este efeito foi dependente da dose. Na presença de 0,4 mg/ml, o padrão de variação da actividade da enzima foi semelhante ao do controlo, mas os valores observados foram significativamente menores. As culturas tratadas com 0,5 mg/ml mostraram níveis de fosfatase alcalina muito baixos, mas ainda mensuráveis; na presença de 1 mg/ml, os valores foram insignificantes.

O efeito dose - dependente da nicotina na actividade de fosfatase alcalina das células de osso alveolar foi também evidente na observação microscópica das culturas coradas histoquimicamente para presença desta enzima. Na figura 3, que mostra o aspecto das culturas nos dias 21 e 28, é bem visível o efeito de estimulação da nicotina nas concentrações de 0,1 a 0,3 mg/ml e o efeito inibitório na presença de 0,4 mg/ml.

O efeito mais característico da nicotina na morfologia celular é a vacuolização do citoplasma. Este processo foi descrito em detalhe num estudo anterior⁽²²⁾ e está documentado na figura 3.

Efeito da nicotina na formação de depósitos mineralizados

A Figura 4 mostra o aspecto macroscópico das culturas celulares de osso alveolar coradas histoquimicamente para a identificação de depósitos de cálcio (reacção da Alizarina vermelha, AV) e de depósitos de fosfato (reacção de von Kossa, VK).

As culturas controlo apresentaram reacções histoquímicas positivas no dia 28, tendo a intensidade de coloração aumentado até ao dia 35.

Na presença de 0,05 a 0,3 mg/ml de nicotina as reacções de coloração foram positivas no dia 21, e acentuaram-se ao longo do tempo de incubação. Nos dias 21 e 28, as reacções de coloração foram mais intensas nas culturas tratadas com 0,2 e 0,3 mg/ml de nicotina. No final do período de incubação, dia 35, a intensidade de coloração foi idêntica nas culturas controlo e nas culturas tratadas com nicotina.

As culturas expostas a concentrações de nicotina de 0,4 a 1 mg/ml apresentaram as reacções de AV e VK negativas.

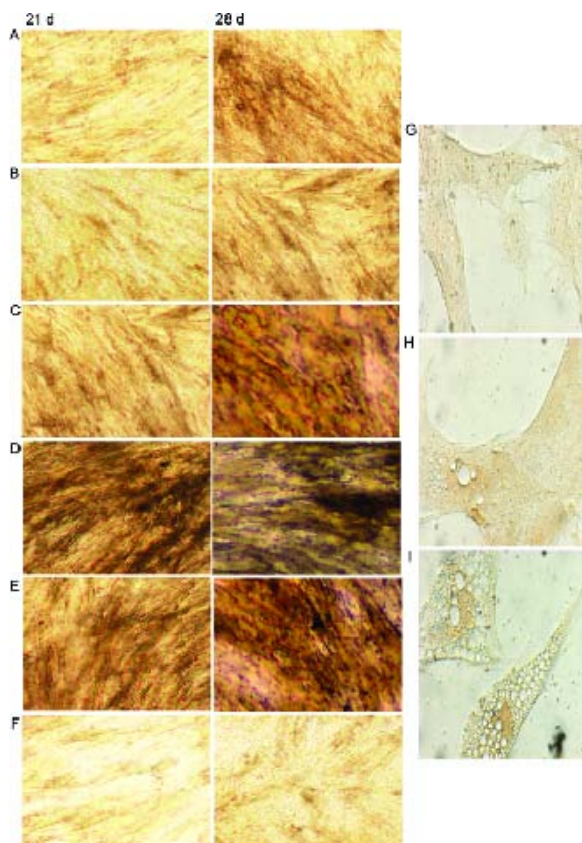


Figura 3 - Aspecto de culturas celulares de osso alveolar humano coradas histoquimicamente para a presença da fosfatase alcalina. A-F) Culturas com 21 e 28 dias, 40x. Cultura controlo (A) e culturas expostas a 0,05 (B), 0,1 (C), 0,2 (D), 0,3 (E) e 0,4 (F) mg/ml de nicotina. G-I) Culturas com 7 dias, 200x. Pormenor da acção da nicotina na morfologia celular. Culturas controlo (G) e culturas expostas a 0,3 (H) e 0,4 (I) mg/ml de nicotina.

A Figura 5 evidencia, a nível microscópico, o efeito de estimulação da nicotina no processo de formação de depósitos minerais em culturas celulares expostas a 0,2 mg/ml. Os resultados relativos aos dias 21 e 28 mostraram que o processo de mineralização iniciou-se mais precocemente nas culturas tratadas com nicotina, em comparação com o observado na situação controlo.

DISCUSSÃO

O efeito da nicotina a nível das células dos tecidos provenientes da cavidade oral tem sido estudado principalmente em células epiteliais⁽³⁹⁾ e fibroblastos gengivais e periodontais^(31,40-43), por constituírem os tipos celulares que estão sujeitos aos efeitos directos da nicotina presente nos fluidos orais. No entanto, a caracterização do efeito da nicotina nas células ósseas provenientes do osso alveolar é

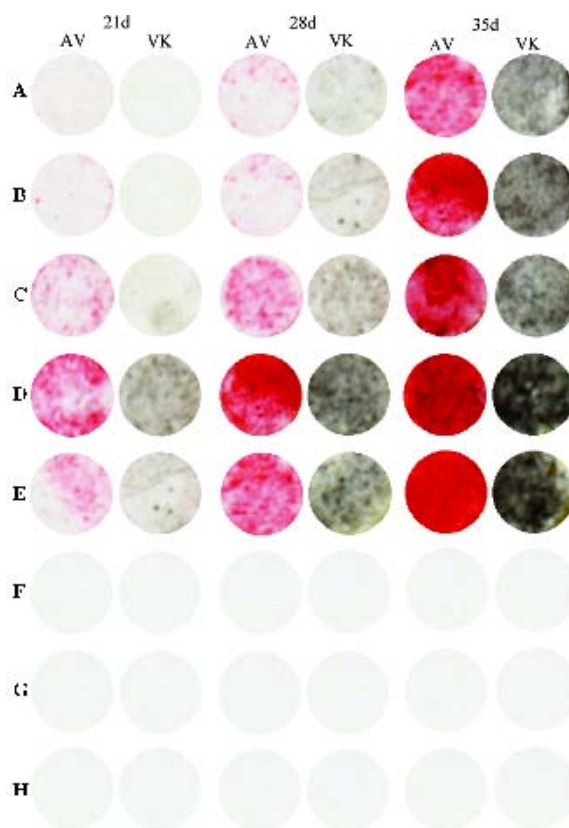


Figura 4 - Efeito da nicotina na capacidade de formação de uma matriz mineralizada em culturas de osso alveolar humano. Aspecto macroscópico de culturas celulares com 21, 28 e 35 dias, coradas histoquimicamente para a visualização de depósitos de cálcio (AV - Alizarina vermelha) e depósitos de fosfato (VK - von Kossa). Culturas controlo (A). Culturas expostas à nicotina: 0,05 (B), 0,1 (C), 0,2 (D), 0,3 (E), 0,4 (F), 0,5 (G) e 1 (H) mg/ml.

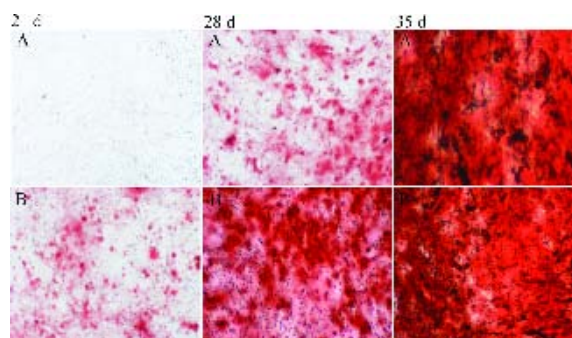


Figura 5 - Aspecto microscópico de culturas celulares de osso alveolar humano com 21, 28 e 35 dias, coradas histoquimicamente para a presença de depósitos de cálcio (reação de Alizarina vermelha). Culturas controlo (A) e culturas expostas a 0,2 mg/ml de nicotina (B).

igualmente relevante, pois há situações em que estas células podem sofrer a influência de um efeito local. Salientam-se os casos em que há quebra da integridade dos tecidos orais, por exemplo durante o processo de cicatrização alveolar. Este processo foi descrito detalhadamente

por vários autores e envolve a migração, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, culminando com a formação de novo osso⁽³⁻⁵⁾.

Neste trabalho, apresentam-se os resultados relativos ao efeito da nicotina na proliferação e actividade funcional de culturas celulares de osso alveolar humano. Estudos anteriores mostraram que estas culturas, efectuadas em determinadas condições experimentais, apresentam um comportamento que mimetiza a sequência temporal que se observa in vivo durante o processo de cicatrização óssea alveolar^(35,36).

A cultura celular primária foi obtida pela técnica do explante⁽³⁷⁾. Esta técnica é útil quando se dispõe de pequenas quantidades de material biológico, como acontece normalmente nos procedimentos cirúrgicos que envolvem o osso alveolar. O efeito da nicotina no comportamento das células de osso alveolar foi efectuado na 1ª subcultura, pois há vários estudos que mostraram que as características osteoblásticas das células em cultura diminuem progressivamente com a subcultura sucessiva^(35,36). A gama de concentrações de nicotina utilizada é representativa dos níveis presentes na saliva de consumidores de tabaco, de acordo com várias referências bibliográficas⁽³¹⁻³³⁾. A nicotina foi adicionada ao meio de cultura após o processo de adesão celular (24 horas após o início da cultura) e esteve presente durante todo o tempo de incubação, sendo renovada quando da mudança de meio (três vezes por semana).

A proliferação celular foi avaliada através da quantificação do conteúdo de proteína total. A exposição das culturas à nicotina provocou um efeito no crescimento celular que foi dependente da concentração. Para concentrações compreendidas entre 0,05 e 0,3 mg/ml verificou-se um efeito de estimulação e, para níveis superiores, uma resposta claramente inibitória. Este comportamento dose-dependente observou-se numa gama relativamente estreita de concentrações. Assim, na presença de 0,2 mg/ml verificou-se o efeito máximo de estimulação, mas a exposição a 0,4 mg/ml provocou já uma resposta inibitória. A situação de viragem ocorreu para níveis de nicotina na vizinhança de 0,3 mg/ml. Nestas culturas, observou-se um efeito inibitório inicial (durante a 1ª semana) que foi totalmente suplantado pela significativa estimulação do crescimento celular que se verificou durante o restante tempo de incubação. O comportamento descrito sugere uma adaptação das células à presença de nicotina. Este efeito de adaptação foi descrito anteriormente em culturas de fibroblastos gengivais expostos à nicotina (0,025 a 0,4 µM; 4,25 ng/ml a 68 ng/ml) durante 4 a 48 horas. Neste

estudo, a exposição a concentrações na ordem de 0,2 µM (34 ng/ml) causou, nas primeiras horas, uma inibição da proliferação celular, seguida de um efeito de estimulação⁽⁴⁴⁾.

O efeito dose-dependente da nicotina na proliferação celular foi observado anteriormente em culturas de células ósseas. Assim, Walker et al observaram este tipo de resposta em células de osso trabecular humano incubadas, durante 48 horas, e após o processo de adesão, com concentrações de nicotina semelhantes às usadas neste estudo⁽²¹⁾. Estes autores obtiveram inibição da proliferação celular na presença de níveis iguais ou superiores a 0,2 mg/ml. A tendência de estimulação da proliferação celular foi observada também em culturas confluentes de células ósseas derivadas de calvária de embrião de galinha e expostas à nicotina (0,05 a 0,6 mg/ml) durante 48 horas⁽¹⁸⁾. No entanto, Fang et al observaram um efeito inibitório geral na proliferação de células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de rato (UMR 106-01), com um grau de confluência de 45 a 75% e expostas por um período de 24 horas a uma gama de concentrações de nicotina de 0,001 a 1000 µM (0,17 ng/ml a 0,17 mg/ml)⁽¹⁹⁾. Nestes estudos, a proliferação celular foi avaliada através da quantificação da síntese de ADN ou por contagem celular.

A actividade funcional das células de osso alveolar foi estudada pela determinação da actividade de fosfatase alcalina e da capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, parâmetros que parecem estar intimamente relacionados. Vários estudos demonstraram a importância da fosfatase alcalina no processo de mineralização ao aumentar, através da sua actividade hidrolítica, a concentração local de fosfato inorgânico^(45,46).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as culturas efectuadas em situação controlo sintetizaram níveis elevados de fosfatase alcalina e que a actividade da enzima, expressa em nmoles/min/µgproteína, aumentou de modo significativo durante as três primeiras semanas de cultura, observação que sugere uma progressão no processo de diferenciação osteoblástica⁽⁴⁷⁾. Os valores máximos foram observados entre os dias 21 e 28, seguindo-se o processo de mineralização da matriz extracelular (presença de depósitos de cálcio e de fosfato no dia 28). Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura, que indicam que a fosfatase alcalina tem um papel essencial no desencadear do processo de mineralização^(45,46).

A exposição contínua das culturas à nicotina, na gama de concentrações utilizada, afectou a síntese de fosfatase alcalina de modo dependente da dose e com um padrão

semelhante ao observado na proliferação celular. Assim, verificou-se um efeito positivo na actividade da enzima para concentrações de 0,05 a 0,3 mg/ml, com tendência para se observar os níveis máximos mais precocemente que na situação controlo (por volta do dia 21). De acordo com este padrão de síntese de fosfatase alcalina, o processo de mineralização ocorreu mais cedo que nas culturas controlo, com reacções AV e VK positivas no dia 21. As culturas tratadas com 0,4 mg/ml de nicotina não apresentaram qualquer evidência da presença de depósitos minerais, apesar de se ter verificado crescimento celular e síntese de fosfatase alcalina (cerca de metade do observado nas culturas controlo). Este facto pode estar relacionado com a presença de níveis baixos da enzima e/ou com a formação de uma matriz extracelular com características quantitativas e/ou qualitativas inadequadas para suportar o processo de mineralização, pois estes parâmetros afectam de modo decisivo a diferenciação osteoblástica⁽⁴⁸⁾. Na presença de 0,5 e 1 mg/ml, o crescimento celular foi muito baixo ou praticamente inexistente, o que explica os resultados negativos para as reacções de AV e VK.

Há vários estudos que mostram que a nicotina afecta a actividade funcional de células osteoblásticas. Fang et al estudaram o efeito da nicotina em células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de rato⁽¹⁹⁾. Neste trabalho, as culturas próximas da confluência foram tratadas durante 24 horas com nicotina e os autores observaram estimulação da actividade de fosfatase alcalina na gama de concentrações estudada (0,001 a 1000 µM; 0,17 ng/ml a 0,17 mg/ml)⁽¹⁹⁾. Yahura et al⁽²⁰⁾, compararam o efeito da nicotina em duas linhas celulares imortalizadas (ROB-C26 e MC3T3-E1). A nicotina (0,01 a 0,25 mg/ml) foi adicionada a culturas próximas da confluência e por um período de 12 dias. Este estudo mostrou uma diferença de comportamento das duas linhas celulares na presença de nicotina. Assim, nas células ROB-C26, a exposição à nicotina resultou na estimulação da actividade da fosfatase alcalina e aumento da deposição de depósitos de cálcio, tendo este último efeito sido mais evidente na presença de 0,1 e 0,25 mg/ml. No entanto, nas células MC3T3-E1, verificou-se uma diminuição da actividade da fosfatase alcalina na presença de todas as concentrações estudadas e inibição da capacidade de formação de áreas mineralizadas nas culturas expostas a 0,25 mg/ml. O efeito inibitório na actividade de fosfatase alcalina foi também encontrado por Ramp et al em células ósseas derivadas de calvária do embrião de galinha expostas à nicotina (0,05 a 0,6 mg/ml) durante 48 horas⁽¹⁸⁾. As diferenças de comportamento celular observadas entre o

presente trabalho e os disponíveis na literatura podem reflectir diferenças nas condições de cultura, no tipo de células osteoblásticas utilizadas, no tempo de exposição à nicotina e na fase de diferenciação em que a exposição ocorre. Todos estes parâmetros podem afectar a resposta celular na presença de nicotina. A importância do modelo de cultura celular foi evidenciada por Yahura et al que observaram diferenças de comportamento quando compararam duas linhas celulares osteoblásticas⁽²⁰⁾. Por outro lado, os resultados do presente estudo e os de outros descritos na literatura⁽¹⁸⁻²¹⁾ sugerem que as células ósseas apresentam alguma capacidade de adaptação à presença de determinadas concentrações de nicotina e, deste modo, o tempo de exposição é também um parâmetro relevante. A sensibilidade das células à composição do meio circundante varia durante o processo de proliferação/diferenciação celular. Assim, de um modo geral, a susceptibilidade celular é elevada durante o processo de adesão e na fase de proliferação celular activa e menor após a confluência⁽²²⁾. Este aspecto está relacionado com a acessibilidade das células às substâncias presentes no meio e também com o nível de actividade metabólica durante o ciclo celular. Relativamente a este aspecto, referem-se os resultados de um estudo anterior que avaliou o comportamento de culturas celulares de osso alveolar expostas à nicotina em diferentes fases de cultura. Os autores observaram que a susceptibilidade celular aos efeitos tóxicos da nicotina a nível da morfologia e proliferação foi elevada em culturas tratadas durante o processo de adesão celular e praticamente insignificante em culturas expostas após a fase de confluência⁽²²⁾. Os aspectos apontados evidenciam a importância da definição das condições experimentais na caracterização do efeito da nicotina a nível celular. Além disso, mostram o risco da comparação e extrapolação de resultados obtidos em modelos diferentes do mesmo tipo celular.

CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que a nicotina afecta a proliferação e a capacidade funcional das células derivadas de osso alveolar, em concentrações que podem estar presentes na saliva de consumidores de tabaco. Na presença de níveis baixos (0,05 a 0,3 mg/ml) observou-se um efeito de estimulação da proliferação celular, actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos mineralizados. A exposição a concentrações mais elevadas (superiores a 0,3 mg/ml) afectou negativamente estes

parâmetros celulares. O comportamento das células de osso alveolar na presença de nicotina sugere a possibilidade de esta substância modular o metabolismo ósseo por um efeito directo e, consequentemente, influenciar os processos de cicatrização óssea alveolar

AGRADECIMENTOS


Este trabalho foi financiado pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e pelo 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 e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

BIBLIOGRAFIA

1. Hupp JR. Wound Repair. In: Peterson LJEE, Hupp J R, Tucker M R, eds. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery. St Louis: Mosby, 2003:49-62
2. Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz L G, Rodan G A, eds. Principles of Bone Biology. San Diego: 1996:69-86
3. Amler HM. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1969;27:309-318
4. Amler HM, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. J Am Dent Assoc 1960;61:32-44
5. Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1966;21:805-813
6. Simpson HE. The healing of extraction wounds. Br Dent J 1969;126:550-557
7. Lang PN, Araújo M, Karring T. Alveolar Bone formation. In: Lindh J, Karring T, Lang N, eds. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Oxford: Blackwell, 2003:866-895
8. Kalfas IH. Principles of Bone healing. Neurosurg Focus 2001;10(4):edição electrónica.
9. 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;42:231-238
10. Hollinger OJ, Schmitt JM, Hwang K, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. J Biomed Mater Res 1999;45:294-301
11. 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
12. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. Annu Rev Med 1986;37:21-32
13. Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS, Waring MB, Babu JP. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. J Periodontol 1995;66:1047-1055
14. Mariggio MA, Guida L, Laforgia A, Santacroce R, Curci E, Montemurro P, Fumarulo R. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? J Periodont Res 2001;36:32-39
15. Daftari KT, Whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, MacCarey BE, Hutton CW. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. Spine 1994;19:904-911
16. Peacock EE, Van Winkle W. Wound Healing, 2 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1976:
17. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect on wound healing. Plast Reconstructiv Surg 1978;61:570-575
18. 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
19. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. Bone 1991;12:283-286

20. 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;383:387-393
21. 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;28:603-608
22. 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
23. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 1980;280:972-976
24. Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J* 1976;1:1043-1046
25. Hill P, Haley NJ, Wynder EL. Cigarette smoking: Carboxyhemoglobin, plasma nicotine, cotinine and thiocyanate vs self reported smoking data and cardiovascular disease. *J Chron Dis* 1983;36:439-449
26. Gritz ER, Baer-Weiss V, Benowitz NL, Van Vunakis H, Jarvik ME. Plasma nicotine and cotinine concentrations in habitual smokeless tobacco users. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:201-209
27. Ockene JK, Pechacek TF, Vogt T, Svendsen K. Does Switching from Cigarettes to Pipes or Cigars Reduce Tobacco Smoke Exposure. *Am J Public Health* 1987;77:1412-1416
28. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated monocytes. *J Periodont Res* 1996;31:99-104
29. Ryder MI, Fujitaki R, Lebus S, Mahboub M, Faia B, Muhaimin D, Hamada M, Hyun W. Alterations of neutrophil L-selection and CD18 expression by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *J Periodont Res* 1998;33:359-368
30. 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;60:564-569
31. James JA, Sayers MN, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999;70:518-525
32. Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981;41:4305-4308
33. Ryder MI, Fujitak R, Johnson GK, Hyun W. Alterations of Neutrophil Oxidation Burst by in Vitro Smoke Exposure: Implications for Oral and Systemic Diseases. *Ann Periodontol* 1998;3:76-87
34. Garant PR. Bone. In: Arinne Dickson, ed. *Oral Cells and Tissues*. Illinois: Quintessence Books, 2003:195-239
35. Fernandes HR. Culturas celulares de osso alveolar humano. *Revista de Saúde Oral* 1996;2:87-95
36. Fernandes HR, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:61-65
37. Freshney RI. Disaggregation of the Tissue and Primary Culture. In: Freshney RI, ed. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 1994:127-147
38. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-267
39. 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;28:769-775
40. Hanes JP, Schuster SG, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991;62:147-152
41. Tipton DA. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:1056-1064

- 
42. 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;2:40-46
 43. Austin WG, Cuenin FM, Hokett SD, et al. Effect of nicotine on fibroblast β 1 Integrin expression and distribution in vitro. *J Periodontol* 2001;72:438-444
 44. Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL, Van Dyke TE. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1993;64:658-665
 45. Bellows CG, Aubin JE, Heersch JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphates. *Bone Miner* 1991;14:27-40
 46. Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundy JR, Martin TJ, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology* - vol 107. Berlin: Springer-Verlag, 1993:267-298
 47. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediated proliferation - differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype; update. *End Rev* 1995;4:290-297
 48. Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Bouleckbache H, Forest N. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation* 1985;29:160-168