

Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO FUMO DO TABACO NO
COMPORTAMENTO CELULAR NA INTERFACE COM O IMPLANTE**



Porto, 2008



*Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada à
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto*

Dissertação realizada sob a orientação do
Professor Doutor João Fernando Costa Carvalho

Investigação realizada no Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade da Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto.

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

CONSELHO CIENTÍFICO DA FMDUP

Prof. Doutor Acácio Eduardo Soares Couto Jorge
Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira
Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso
Prof. Doutora Ana Paula Coelho Macedo Augusto
Prof. Doutor António Cabral Campos Felino
Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas
Prof. Doutor António Marcelo Azevedo Miranda
Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva
Prof. Doutor David José Casimiro Andrade
Prof. Doutor Fernando Jorge Morais Branco
Prof. Doutor Filipe Poças Almeida Coimbra
Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas
Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha
Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz
Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes
Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho
Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho
Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes
Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo
Prof. Doutor José Albino Teixeira Koch
Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas
Prof. Doutor José Carlos Reis Campos
Prof. Doutor José Mário Castro Rocha
Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho
Prof. Doutor Manuel Pedro Fonseca Paulo
Prof. Doutora Maria Benedita Almeida Garrett de Sampaio Maia
Prof. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann
Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva
Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes
Prof. Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares
Prof. Doutora Maria Teresa Pinheiro Oliveira Rodrigues Carvalho

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva
Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos
Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto
Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo

PROFESSORES JUBILADOS OU APOSENTADOS

Doutor Adão Fernando Pereira
Doutor Fernando José Brandão Martins Peres
Doutor José Carlos Pina de Almeida Rebelo
Doutor José Serra Silva Campos Neves
Doutor Rogério Serapião Martins de Aguiar Branco

À minha Mãe com amor e infinita saudade...

Ao meu Pai com amor...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Fernando da Costa Carvalho agradeço a orientação desta tese, a disponibilidade e as palavras de encorajamento que sempre me manifestou.

Ao Professor Doutor Fernando José Martins Brandão Peres e Prof. Doutora Maria Adelina Ribeiro Costa agradeço a orientação no período inicial de realização desta tese.

À Professora Doutora Maria Helena Fernandes, o meu sincero e profundo reconhecimento pelo contributo fundamental para realização desta tese. Agradeço a amizade que sempre me dispensou, assim como o incentivo e também o exemplo de competência e grande rigor na investigação científica.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia, Pedro, Benedita, João, Catarina, Raquel e Hugo a minha gratidão por todo o apoio e amizade.

A todos quantos me incentivaram, de algum modo, a realizar esta tese, manifesto o meu sincero agradecimento.

PUBLICAÇÕES

1. Efeito da Nicotina na Morfologia e Proliferação de Células de Osso Alveolar Humano em Diferentes Fases de Diferenciação
Pereira MLL, Costa MA, Carvalho JFC, Fernandes MHR
Rev Port Estomatol Cir Maxilofac 2005; 46: 81-91
2. Efeito da Nicotina no Processo de Formação Óssea Alveolar: Estudo em Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano
Pereira MLL, Carvalho JFC, Fernandes MHR, Peres F
Rev Port Estomatol Cir Maxilofac 2006; 47: 79-90
3. Proliferação e diferenciação de células osteoblásticas de medula óssea humana na presença de níveis sanguíneos e salivares de nicotina
Pereira MLL, Carvalho JFC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MHR
Arquivos de Medicina 2007; 21 (1): 3-14
4. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine
Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH
Clin Oral Impl Res 2008; 19: 582–589
5. Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants
Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH
Journal of Biomedical Research – Part A 2008. doi: 10.1002/jbm.a.31873
6. Exposure of osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants to the simultaneous effects of nicotine, acrolein and acetaldehyde
Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH
Submetido para publicação ao *International Journal of Maxillofacial Implants*

A reprodução destas publicações foi feita com autorização das respectivas editoras.

RESUMO

Os hábitos tabágicos constituem um factor de risco importante na falência dos implantes dentários. De acordo com uma variedade de estudos clínicos, a exposição local dos tecidos peri-implantares a componentes do tabaco parece ter uma contribuição significativa neste processo. O fumo do tabaco é uma complexa mistura de mais de 4000 compostos, muitos dos quais atingem concentrações elevadas na saliva e apresentam potencial citotóxico a nível do tecido ósseo, de acordo com uma variedade de estudos efectuados em culturas celulares. Deste modo, a avaliação do perfil de actividade destes compostos no metabolismo ósseo a nível da interface osso/implante, pode contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos nos efeitos nefastos do tabagismo na osteointegração e longevidade dos implantes dentários.

Este trabalho teve como objectivo avaliar o perfil da nicotina, acroleína e acetaldeído na proliferação e actividade funcional osteoblástica na superfície de implantes de titânio TPS (*titanium plasma sprayed*), utilizando sistemas *in vitro* representativos. Estes compostos atingem concentrações elevadas nos fluidos biológicos dos fumadores, em particular na saliva, e apresentam potencial toxicidade para diversos tipos celulares.

Utilizaram-se como sistemas *in vitro*, culturas de células humanas derivadas de osso alveolar e de medula óssea, estabelecidas em condições experimentais apropriadas para o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Em algumas experiências, utilizou-se também a linha celular Saos-2, obtida de osteosarcoma humano. O comportamento celular foi caracterizado por parâmetros de morfologia celular, viabilidade/proliferação, conteúdo em proteína total e actividade funcional osteoblástica, nomeadamente síntese de fosfatase alcalina e mineralização da matriz. O perfil de actividade da nicotina foi avaliado em placas de cultura "standard" (culturas celulares de osso alveolar e de medula óssea) e na superfície de implantes de ti-

titânio TPS (culturas celulares de medula óssea e a linha celular Saos-2). A exposição das culturas celulares à nicotina (0,06 μ M–6 mM, gama de concentrações representativa dos níveis plasmáticos e salivares detectados nos fumadores) ocorreu de forma contínua ou apenas em diferentes fases do processo de proliferação/diferenciação celular. Os estudos de dose-efeito permitiram obter a seguinte informação: (i) ausência de efeitos significativos na presença de concentrações plasmáticas, 0,06 e 0,3 μ M; (ii) estimulação da proliferação celular e da actividade da fosfatase alcalina, com antecipação da mineralização da matriz extracelular, durante a exposição a níveis salivares de 0,3 a 1,2 mM; (iii) efeito inibitório na proliferação e função celular na presença de níveis salivares elevados, 1,8 mM a 6 mM. A nicotina causou também alterações morfológicas características, nomeadamente a vacuolização do citoplasma na presença de concentrações elevadas. A susceptibilidade celular aos efeitos da nicotina foi particularmente significativa na fase de adesão ao substrato e na fase de crescimento exponencial.

A avaliação do perfil de dose-efeito da acroleína (0,01 a 0,12 mM) e do acetaldeído (0,1 a 6 mM) foi efectuada em culturas de células de medula óssea humana cultivadas na superfície de implantes TPS e expostas de modo contínuo a estes compostos. A acroleína causou efeitos inibitórios na proliferação e função osteoblástica para níveis iguais e superiores a 0,03 mM, concentração semelhante aos níveis salivares máximos detectados na saliva dos fumadores. O acetaldeído exibiu efeitos citotóxicos no comportamento celular na gama de concentrações estudadas, que foi representativa dos níveis salivares presentes nos fumadores.

O comportamento de proliferação e função osteoblástica na superfície de implantes de titânio TPS foi também avaliado na presença de combinações de nicotina (1,2 e 2,4 mM), acroleína (0,06 mM, CI_{50}) e acetaldeído (0,3 mM, CI_{50}). A exposição a combinações de nicotina 1,2 mM com acroleína, acetaldeído ou ambos os aldeídos causou uma resposta celular intermédia entre a observada nas culturas expostas à nicotina (efeito indutor) ou aos aldeídos (efeito inibitório). A exposição a combinações de nicotina 2,4 mM com acroleína, acetaldeído ou ambos os aldeídos provocou um efeito citotóxico cumulativo, resultante dos efeitos inibitórios exibidos por estes compostos nestas concentrações.

Em conclusão, os resultados deste trabalho mostram que a nicotina, a acroleína e o acetaldeído afectam a proliferação e a actividade funcional de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície de implantes de titânio TPS, de modo dependente da dose. Adicionalmente, verifica-se uma interacção/contribuição de efeitos indutores e inibitórios na resposta celular observada durante a exposição simultânea a mais que um destes compostos. Embora não exista informação relativa aos níveis de componentes do fumo do tabaco na interface osso/implante, os resultados deste estudo sugerem a possibilidade de uma modulação local a nível do metabolismo ósseo peri-implantar, com eventual repercussão na osteointegração e longevidade dos implantes dentários.

ABSTRACT

Smoking is considered to be a risk factor affecting the success rate of dental implants. According to several clinical studies, local exposure of the peri-implant tissues to tobacco compounds has a significant contribution in this process. Cigarette smoke is a complex mixture of over 4000 compounds, with many reaching high salivary levels and presenting potential cytotoxicity in the bone tissue, according to a variety of cell culture studies. Thus, evaluation of the activity profile of these compounds in the bone metabolism at the bone/implant interface would provide information regarding the mechanisms subjacent to the deleterious effects of smoking in the osseointegration and long-time survival of dental implants.

The aim of this work was to assess the profile of nicotine, acrolein and acetaldehyde in the osteoblastic proliferation and function on the surface of titanium implants TPS (titanium plasma sprayed), using representative *in vitro* models. These compounds reach high levels in the biological fluids of smokers, particularly in the saliva, and present potential cytotoxicity to several cell types.

The *in vitro* systems used include cell cultures derived from human alveolar bone and bone marrow, established in appropriate experimental conditions to the development of the osteoblastic phenotype. In some of the experiments, the cell line Saos-2, derived from human osteosarcoma, was also used. Cell behaviour was characterized regarding cellular morphology, viability/proliferation, total protein content and osteoblastic functional activity, namely alkaline phosphatase activity and matrix mineralization.

Nicotine profile was addressed in standard tissue culture plates (alveolar bone and bone marrow cell cultures) and on the surface of titanium implants TPS (bone marrow cell cultures and the cell line Saos-2). Cell cultures were exposed to nicotine (0.06 μ M–6 mM, range representative of the plasmatic and salivary levels detected in smokers) continuously or in different stages of the cellular proliferation/differen-

tiation pathway. The dose-effect studies provided the following information: (i) absence of significant effects in the presence of plasmatic concentrations, 0.06 and 0.3 μM ; (ii) stimulation of the cell proliferation and alkaline phosphatase activity, along with early matrix mineralization, during exposure to salivary levels of 0.3 to 1.2 mM; (iii) inhibitory effects in the cell proliferation and function at high salivary levels, 1.8 mM to 6 mM. In addition, nicotine caused characteristic morphological alterations, namely vacuolization of the cytoplasm at high concentrations. Cellular susceptibility to the effects of nicotine was particularly significant in the phase of cell adhesion to the substrate and during the exponential cell growth.

Evaluation of the dose-effect profile of acrolein (0.01 to 0.12 mM) and acetaldehyde (0.1 to 6 mM) was performed in bone marrow cell cultures established on the surface of titanium implants TPS, exposed continuously to these compounds. Acrolein caused inhibitory effects in the osteoblastic proliferation and function at levels similar and higher than 0.03 mM, concentration similar to the maximum salivary levels detected in smokers. Acetaldehyde exhibited cytotoxic effects in the cell behaviour in the concentration range tested, which was representative of the levels measured in the saliva of smokers.

Osteoblastic proliferation and differentiation behaviour on the surface of titanium implants TPS was also assessed in the presence of combinations of nicotine (1.2 and 2.4 mM), acrolein (0.06 mM, IC_{50}) and acetaldehyde (0.3 mM, IC_{50}). Exposure to combinations of nicotine 1.2 mM with acrolein, acetaldehyde or both aldehydes caused a cell response intermediate between that observed in the cultures exposed to nicotine (inductive effect) or to the aldehydes (inhibitory effect). Exposure to combinations of nicotine 2.4 mM with acrolein, acetaldehyde or both aldehydes caused a cumulative cytotoxic effect, resulting from the inhibitory effects exhibited by the three compounds at these concentrations.

In conclusion, the results of this work show that nicotine, acrolein and acetaldehyde affect the proliferation and functional activity of human osteoblastic cells cultured on the surface of titanium implants TPS, in a dose-dependent way. In addition, an interaction/contribution of inductive and deleterious effects in the cell response is observed during the simultaneous exposure to more than one of these compounds.

Although the absence of information regarding the levels of tobacco compounds at the bone/implant interface, the results of this study suggest the possibility of a local modulation of the peri-implant bone metabolism, with eventual repercussion in the osseointegration and long-time survival of the dental implants.

CONTEXTO, OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE

O tabagismo está associado a um maior risco de falência de implantes orais, quer precoce quer tardia. Os mecanismos envolvidos nos efeitos negativos do uso do tabaco na osteointegração e longevidade do implante, isto é, na manutenção de um metabolismo ósseo apropriado na interface tecido ósseo/implante não estão esclarecidos. O fumo do tabaco é uma mistura complexa de mais de 4000 compostos e muitos deles apresentam elevado potencial citotóxico, estando descritos efeitos nefastos em vários órgãos e tecidos, incluindo o tecido ósseo. A nicotina, o composto responsável pelo hábito tabágico, é detectada no plasma e na saliva dos fumadores em concentrações de 4–73 ng/ml (0,024–0,44 μ M) e 96 ng/ml–1,6 mg/ml (0,58 μ M–9,6 mM, respectivamente). A nicotina tem um elevado coeficiente de difusão e é o composto mais frequentemente implicado nos efeitos negativos do tabagismo nos processos de regeneração óssea. Também, a acroleína e o acetaldeído, dois aldeídos voláteis muito reactivos, apresentam elevada citotoxicidade. Estes compostos são prontamente detectados na saliva após o acto de fumar e atingem níveis de 5,5–38,2 μ M e 0,312–1,986 mM, respectivamente. O potencial citotóxico da nicotina, acroleína e acetaldeído a nível dos tecidos orais tem sido documentado em estudos de culturas celulares, principalmente células epiteliais e fibroblastos gengivais e periodontais.

De acordo com vários estudos clínicos, a exposição local dos tecidos peri-implantares a componentes do tabaco tem uma contribuição significativa nos efeitos nefastos do tabagismo em implantologia dentária. Esta observação está muito provavelmente relacionada com os níveis elevados de vários compostos bioactivos detectados nos fluidos orais dos fumadores, que mantêm um gradiente de difusão através dos tecidos orais, e a factores locais que favorecem a presença destas substâncias na interface tecido ósseo/implante. Assim, está descrito que o epitélio peri-implantar juncional apresenta maior permeabilidade a substâncias presentes na saliva quan-

do comparado com o epitélio juncional que envolve os dentes naturais. Há também a possibilidade de penetração de fluidos orais na mucosa peri-implantar a nível do “microgap”. Considerando os factores mencionados, são de esperar interacções complexas no comportamento das células ósseas relativamente à manutenção de um metabolismo normal no microambiente osso/implante. Curiosamente, a avaliação da actividade potencial de componentes do fumo do tabaco no metabolismo ósseo peri-implantar, a nível celular, tem merecido pouca atenção. A utilização de sistemas *in vitro*, nomeadamente a interacção de culturas de células ósseas e implantes dentários, que permite uma avaliação em condições experimentais controladas, não estava descrita no início deste trabalho.

No contexto exposto, este trabalho iniciou-se com dois objectivos principais: (i) caracterizar o perfil de dose-efeito da nicotina, acroleína e acetaldeído no comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície de implantes de titânio TPS utilizados em implantologia oral (TPS, Titanium Plasma Sprayed, superfície de titânio revestida com pó de titânio de elevada pureza) e, com base neste estudo, (ii) avaliar, em condições experimentais semelhantes, o comportamento celular na presença de combinações de nicotina, acroleína e acetaldeído, para analisar a eventual interacção/contribuição de diversos tipos de efeitos na resposta celular durante a exposição simultânea a vários compostos bioactivos.

O comportamento celular foi caracterizado por parâmetros de morfologia celular, viabilidade/proliferação, conteúdo em proteína total e actividade funcional osteoblástica, nomeadamente síntese de fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. Neste estudo utilizou-se uma gama de concentrações de nicotina, acroleína e acetaldeído representativas dos níveis presentes no plasma e saliva dos fumadores.

Esta tese é composta por três capítulos.

No **capítulo I** é apresentada uma breve revisão bibliográfica que inclui a biologia do tecido ósseo peri-implantar, a cicatrização peri-implantar, o tabagismo e saúde oral

evidenciando o impacto negativo no desempenho de implantes endósseos e o perfil biológico da nicotina, acroleína e acetaldeído.

No **capítulo II** apresentam-se os resultados relativos ao perfil de dose-efeito da nicotina (0,06 μ M–6 mM) no comportamento de proliferação e diferenciação de culturas de células osteoblásticas humanas mantidas durante 28–35 dias em placas de cultura “standard” e na superfície de implantes de titânio TPS. Neste estudo, foram utilizados três sistemas *in vitro*: culturas de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, culturas de células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana e a linha celular Saos-2 (derivada de osteosarcoma humano).

Os resultados obtidos foram objecto das seguintes publicações:

- Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial 46: 81-91; 2005.
- Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial 47: 79-90; 2006.
- Arquivos de Medicina 21(1): 3-14; 2007.
- Clinical Oral Implants Research 19: 582-589; 2008.
- J Biomed Mater Res, aceite para publicação, DOI:10.1002/jbm.a-31873.

No **capítulo III** apresentam-se os resultados relativos a dois estudos: (i) perfil de dose-efeito da acroleína (0,01–0,12 mM) e do acetaldeído (0,1–6 mM) no comportamento de proliferação e diferenciação de culturas de células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana, mantidas durante 28 dias na superfície de implantes de titânio TPS e (ii) efeito da exposição simultânea das células osteoblásticas à nicotina, acroleína e acetaldeído em várias combinações de efeitos indutores e inibitórios.

Os resultados obtidos neste estudo foram submetidos para publicação no *International Journal of Maxillofacial Implants*.

No **capítulo IV** é apresentada a discussão geral e as principais conclusões deste estudo.

ÍNDICE

Agradecimentos	IX
Publicações	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XVII
Contexto estrutura e objectivos	XXI
Capítulo 1. Introdução	1
Introdução geral	3
1. Biologia do tecido ósseo peri-implantar.....	7
2. Cicatrização peri-implantar	13
3. Hábitos tabágicos	19
4. Tabagismo e Implantologia oral.....	23
5. Perfil biológico da nicotina, acroleína e acetaldeído.....	31
Capítulo 2. Efeito da nicotina no comportamento de células osteoblásticas cultivadas em implantes de titânio	41
1. Efeito da Nicotina na Morfologia e Proliferação de Células de Osso Alveolar Humano em Diferentes Fases de Diferenciação Pereira MLL, Costa MA, Carvalho JFC, Fernandes MHR <i>Rev Port Estomatol Cir Maxilofac</i> 2005; 46: 81-91	43
2. Efeito da Nicotina no Processo de Formação Óssea Alveolar: Estudo em Culturas Celulares de Osso Alveolar Humano Pereira MLL, Carvalho JFC, Fernandes MHR, Peres F <i>Rev Port Estomatol Cir Maxilofac</i> 2006; 47: 79-90.....	57

3. Proliferação e diferenciação de células osteoblásticas de medula óssea humana na presença de níveis sanguíneos e salivares de nicotina Pereira MLL, Carvalho JFC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MHR <i>Arquivos de Medicina</i> 2007, 21 (1): 3-14.....	71
4. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH <i>Clin Oral Impl Res</i> 2008; 19: 582-589	85
5. Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH <i>Journal of Biomedical Research</i> Part A 2008. doi: 10.1002/jbm.a.31873	95
 Capítulo 3. Efeito cumulativo da nicotina, acroleína e acetaldeído no comportamento de células osteoblásticas cultivadas em implantes de titânio	107
1. Exposure of osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants to the simultaneous effects of nicotine, acrolein and acetaldehyde Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH Submetido para publicação ao <i>International Journal of Maxillofacial Implants</i>	109
 Capítulo 4. Discussão e Conclusões	135
 Discussão Geral	137
 Conclusões	151
 Bibliografia	153

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO GERAL

Desde tempos remotos que o Homem tenta restaurar a função mastigatória e estética dos dentes perdidos. As implantações dentárias mais antigas foram encontradas em restos esqueléticos da era pré-colombiana, cerca de 600 anos A.C, num crânio que apresentava no maxilar fragmentos de madrepérola talhados em forma de dente e implantados nos alvéolos dos incisivos.¹

Ao longo do tempo, vários métodos e materiais foram utilizados na substituição dos dentes perdidos, mas foi no século XX, na década de sessenta, com os trabalhos do Professor Ingvar Brånemark e col, que a implantologia oral apresentou um franco desenvolvimento com a introdução do conceito de osteointegração.² Em 1952, Brånemark e col, com o objectivo de avaliarem longitudinalmente, *in situ* e *in vivo*, a circulação sanguínea, a reacção do tecido ósseo a diferentes tipos de traumatismo e os efeitos dos diferentes agentes traumáticos no processo de regeneração óssea, recorreram a dispositivos de titânio com um sistema óptico que introduziram nos perónios do coelho. No momento de remoção das câmaras de titânio instaladas na intimidade dos tecidos para posterior análise, estas não puderam ser retiradas, observando-se uma íntima interacção entre as microirregularidades do titânio e o tecido ósseo. A partir destas observações, Brånemark e col desenvolveram estudos no sentido de estabelecer um protocolo cirúrgico apropriado para a reabilitação oral com base em implantes de titânio.³ Esta interacção entre o biomaterial implantado e o tecido ósseo, sem interposição de tecido fibroso, foi definida por osteointegração e a sua descoberta representou um ponto importante no desenvolvimento da implantologia oral.

Albrektsson e col⁴ definiram inicialmente osteointegração como “uma conexão directa estrutural e funcional entre o tecido ósseo normal viável e o implante em função”.

Ao nível da resolução de microscopia óptica, a osteointegração representa a imbricação directa entre o tecido ósseo e a superfície do implante, sem interposição de

nenhuma camada de tecido fibroso. No entanto, com o recurso a técnicas de análise a nível ultra-estrutural, é possível detectar na interface osso/implante uma camada de cerca de 0,1 a 0,2 μm de espessura preenchida por proteoglicanos e uma segunda camada de fibras de colagénio com aproximadamente 0,5 a 2 μm .⁵

Com base nestas observações e tendo em conta critérios clínicos baseados na estabilidade dos implantes, a osteointegração define-se, actualmente, como um processo através do qual a fixação de material aloplástico permanece imóvel e assintomática clinicamente e se mantém integrada no tecido ósseo após a colocação do elemento protético e a incidência de cargas oclusais.⁶

Os processos que ocorrem na interface osso/biomaterial e que culminam com a integração do implante no tecido ósseo são complexos e envolvem numerosos factores, incluindo factores relacionados com o biomaterial (forma, topografia, características químicas da superfície), com a técnica cirúrgica e características do hospedeiro (tipo e qualidade do osso, forças oclusais e doenças sistémicas).⁷

O desempenho biológico dos biomateriais resulta então da resposta do hospedeiro ao biomaterial e do comportamento do material no hospedeiro.⁷

O primeiro tecido biológico, que entra em contacto com o implante, é o sangue num volume que depende da geometria do implante e do local de colocação.⁸ Depois de inserido no leito implantar e dependendo do local de colocação, o biomaterial vai contactar com proporções variáveis de osso cortical, osso esponjoso e medula óssea.^{9,10} Assim, algumas áreas do implante encontram-se comprimidas contra o tecido ósseo e as restantes em contacto directo com o coágulo sanguíneo e fluidos tecidulares. As características da superfície do biomaterial modulam a adsorção das várias moléculas presentes no sangue e fluidos biológicos que, por sua vez, terão consequências directas no recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação das células envolvidas no processo de cicatrização peri-implantar.^{9,10}

Apesar de materiais como o tântalo, nióbio, zircónia e as ligas de titânio terem capacidade de osteointegração, o titânio comercialmente puro continua a ser amplamente utilizado na construção de implantes dentários.¹¹ A sua utilização deve-se à elevada biocompatibilidade, às propriedades mecânicas e à resistência à corrosão,

quando comparado com outros metais. A elevada biocompatibilidade do titânio é atribuída à camada de óxido, 2 a 17 nm, que se forma espontaneamente quando o titânio é exposto ao oxigénio.¹² Esta camada, constituída por vários tipos de óxidos, limita a corrosão superficial e possui estabilidade quando em contacto com os fluidos corporais.^{12,13}

Com o objectivo de aumentar o comportamento biológico dos implantes de titânio têm sido desenvolvidas várias estratégias que se baseiam em técnicas de modificação de superfície.^{14,15}

A alteração da superfície dos implantes metálicos a nível de uma escala macro e/ou, microscópica, por tratamentos mecânicos associados ou não a tratamentos químicos, condiciona a resposta celular na superfície do implante.¹⁶⁻²¹ O objectivo principal destas técnicas é a obtenção de um contacto mais eficaz e/ou mais rápido entre o tecido ósseo e a superfície do implante, permitindo, por exemplo, que os implantes sejam colocados mais rapidamente em carga e favoreçam o seu prognóstico quando aplicados em situações desfavoráveis.

A técnica de aspersão térmica com plasma de titânio (“titânio plasma spraying”) consiste em aspergir um pó de titânio sobre o substrato metálico, com recurso a várias técnicas.¹⁵ As alterações morfológicas da superfície obtida por este método permitem um aumento da área de superfície, proporcionando um maior contacto ósseo e conseqüentemente uma maior área de osteointegração.²² Adicionalmente, as alterações morfológicas favorecem a adsorção das proteínas presentes no micro ambiente ósseo, favorecendo a adesão celular e as fases precoces da osteointegração.

Embora os implantes disponíveis no mercado apresentem taxas de sucesso elevadas, novas superfícies têm sido desenvolvidas no sentido de promover uma maior e mais rápida osteointegração a curto e a longo prazo.¹⁵

As estratégias de desenvolvimento de novas superfícies passam pela criação de superfícies com rugosidade á escala nanométrica para a promoção da adsorção proteica e adesão celular, técnicas biomiméticas de recobrimento com fosfatos de cálcio com a finalidade de aumentar a osteocondução e ainda a incorporação de fármacos e factores de crescimento nas superfícies para acelerar a cicatrização óssea na área peri-implantar.^{15,23,24}

1. BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR

Estrutura do tecido ósseo

A crista óssea seleccionada para colocação de implantes dentários é revestida por mucosa, em geral queratinizada, que envolve o tecido ósseo. A superfície óssea da crista alveolar é constituída por osso compacto revestido por uma camada fibrocelular de tecido conjuntivo denominada periósteo.²⁵ O osso compacto alberga o osso esponjoso ou cortical que contém no seu interior a medula óssea.²⁵

O tecido ósseo mandibular e maxilar divide-se funcionalmente em osso alveolar e osso basal. A presença do osso alveolar está intimamente ligada à presença dos dentes, observando-se após uma extracção dentária a sua reabsorção e, nos indivíduos desdentados totais, pode ocorrer a reabsorção total do processo alveolar.²⁶

As superfícies externas dos ossos mandibular e maxilar são constituídas por osso lamelar compacto e contém no seu interior osso trabecular e a medula óssea.²⁷ A organização macro e microestrutural do tecido ósseo da cavidade oral é semelhante ao tecido ósseo dos restantes locais do organismo. No entanto, a disposição das trabéculas ósseas é feita segundo uma orientação que reflecte as forças de pressão efectuadas durante a mastigação.²⁶

Funcionalmente, o osso compacto tem funções mecânicas de protecção e sustentação, enquanto o osso esponjoso tem funções metabólicas, participando activamente na manutenção da homeostasia do cálcio do organismo.²⁸ O osso esponjoso tem uma taxa metabólica elevada e parece responder de forma rápida a pressões mecânicas.²⁶

Histologicamente, o tecido ósseo é classificado em dois tipos: imaturo ou primário e lamelar ou secundário. O osso primário pode ser encontrado durante o desenvolvi-

mento embrionário, sendo posteriormente substituído por osso lamelar ou secundário. Este tipo de osso pode também ser encontrado, durante os processos de cicatrização óssea, nas suturas cranianas, nos ossos do ouvido, nas placas das epífises dos ossos longos e nos processos alveolares da mandíbula e do maxilar.²⁸

Comparado com o osso lamelar, o osso imaturo possui uma taxa de renovação mais elevada. A nível estrutural, o osso primário difere do osso secundário por possuir fibras de colagénio com uma disposição irregular, sem organização definida, e uma elevada percentagem de osteócitos. A forma como as estruturas básicas que o compõem e as lamelas ósseas se dispõem permite a distinção em osso compacto e osso esponjoso.²⁹

Composição celular

No tecido ósseo existem fundamentalmente quatro tipos celulares: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos.²⁸ As células ósseas apresentam diferentes localizações e diferentes estados de maturação, reflectindo a função e papel biológico de cada elemento celular.³⁰

Osteoblastos

Os osteoblastos derivam de células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima presentes na medula óssea, endóstio, perióstio e canais medulares.³¹ São células mononucleadas, com citoplasma basófilo e prolongamentos citoplasmáticos que estabelecem comunicação com os osteócitos e osteoblastos adjacentes. Apresentam uma forma cubóide, um retículo endoplasmático rugoso volumoso e grandes complexos de Golgi. Possuem uma membrana plasmática rica em fosfatase alcalina. In vitro, a expressão de níveis máximos de fosfatase alcalina está associada com um nível superior de diferenciação osteoblástica e corresponde ao início do processo de mineralização.^{32,33} Os osteoblastos possuem adicionalmente receptores para várias hormonas como a hormona da paratiroide, vitamina D₃, estrogénios e prostaglandinas.²⁶ Na membrana plasmática estão também presentes receptores de Ca²⁺, acoplados à proteína G que são responsáveis pela movimentação dos iões

cálcio através da membrana.^{34,35} Para além da sua principal função, que consiste na síntese e deposição da matriz óssea,^{31,36-38} os osteoblastos expressam factores de crescimento, citocinas e prostaglandinas que regulam de uma forma autocrínica os osteoblastos e, de uma forma paracrínica, influenciam o comportamento de outras células especialmente os osteoclastos.²⁶ Os osteoblastos podem apresentar três destinos: diferenciação em células de revestimento, aprisionamento na matriz óssea mineralizada transformando-se em osteócitos ou ainda permanecer como osteoblastos.^{31,37}

Osteócitos

Os osteócitos constituem os elementos celulares presentes em maior número no tecido ósseo.³⁹ O processo de diferenciação dos osteoblastos em osteócitos envolve uma série de transformações morfológicas e ultra estruturais, tais como a diminuição do tamanho celular, aumento dos prolongamentos citoplasmáticos em tamanho e número, e alterações nos organelos intracelulares, nomeadamente, diminuição na quantidade do retículo endoplasmático e no tamanho do aparelho de Golgi.⁴⁰ Os osteócitos estão completamente envolvidos por matriz extracelular, formando um espaço denominado lacuna. As lacunas estão ligadas entre si através de uma rede de canais, os canalículos, que contém no seu interior os prolongamentos plasmáticos dos osteócitos, permitindo o contacto entre células adjacentes e formando uma rede celular complexa.⁴¹ Estes canais funcionam como vias de difusão de nutrientes e é através deles que se processam as trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos. Os osteócitos actuam como receptores sensíveis a estímulos mecânicos, transformando alterações físicas em sinais químicos que podem ter um papel importante nos processos de adaptação funcional e remodelação óssea.⁴²⁻⁴⁴ Estas células são essenciais para a manutenção da matriz orgânica mineralizada, sendo a sua morte seguida de reabsorção óssea.³⁹

Células de revestimento

Quando as superfícies ósseas não estão na fase formativa nem na fase de reabsorção, a superfície óssea é completamente revestida por uma camada de células

achatadas, denominadas células de revestimento ósseo.⁴⁵ Estas células formam camadas contínuas que contactam entre si e com os osteócitos vizinhos através de *gap junctions*. Têm origem em osteoblastos que cessaram a actividade sintética e que não se diferenciaram em osteócitos, podendo transformar-se em osteoblastos quando adequadamente estimulados.⁴⁶ As células de revestimento funcionam como uma barreira entre o osso e os tecidos adjacentes, protegem a superfície óssea da acção dos osteoclastos, contribuem para homeostasia mineral, regulando os fluxos minerais do fluido extracelular, e controlam o crescimento dos cristais ósseos.⁴⁷

Osteoclastos

Os osteoclastos derivam das células hematopoiéticas (células progenitoras de granulócitos e macrófagos) que se diferenciam em osteoclastos.⁴⁸

Os osteoclastos são células grandes, móveis e polimórficas, com um número variável de núcleos de forma oval e são responsáveis pela reabsorção óssea.⁴⁹ Estão localizados em depressões escavadas da matriz denominadas lacunas de Howship.³⁸ Ultraestruturalmente, os osteoclastos apresentam numerosos vacúolos e mitocôndrias, retículo endoplasmático escasso, numerosos complexos de Golgi e lisossomas com fosfatases ácidas.^{28,49} A membrana celular, nas zonas de contacto com o tecido ósseo, possui múltiplas interdigitações citoplasmáticas. Esta zona da membrana corresponde à parte activa das células permitindo-lhe as trocas necessárias para assegurar o processo de reabsorção. Estas células expressam intensa actividade de fosfatase ácida tartarato resistente. Para além da reabsorção óssea, os osteoclastos participam na manutenção a longo prazo da homeostasia do cálcio sanguíneo, através da sua resposta à hormona da paratiróide e à calcitonina e desempenham um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseos, através da libertação de factores de crescimento a partir da matriz extracelular mineralizada.^{49,50}

Matriz Extracelular

A matriz extracelular é composta por uma fase orgânica e por uma fase inorgânica formada principalmente por sais inorgânicos de cálcio e fosfato sob a forma de

cristais de hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. A fase orgânica da matriz é constituída por fibras de colagénio e por substância fundamental amorfa. As fibras de colagénio são predominantemente do tipo I (cerca de 95%, e o restante dos tipo V e tipo III), dispondo-se em feixes ao acaso, característicos do osso imaturo, ou num sistema organizado de lamelas paralelas, típicas do osso adulto.^{28,51} No osso compacto as lamelas apresentam-se mais compridas e densamente compactadas. Pode-se identificar três tipos de lamelas: circunferenciais, concêntricas e intersticiais. As lamelas circunferenciais envolvem a parede externa do osso, formando uma camada superficial. As lamelas concêntricas preenchem grande parte do osso compacto, formando uma unidade metabólica básica denominada ósteon, no centro do qual existe o canal de Havers.²⁹ As lamelas intersticiais preenchem os espaços entre as lamelas concêntricas e não são mais do que fragmentos das lamelas concêntricas que adoptam uma grande diversidade de formas.²⁹ As fibras de colagénio e a matriz mineralizada formam então cilindros ou sistemas de Havers, ordenados concêntricamente à volta dos vasos sanguíneos.²⁸ No entanto, quando o tecido ósseo se forma rapidamente, como durante os processos de cicatrização óssea, não existe organização preferencial das fibras de colagénio que se dispõem ao acaso.

O material proteico não colagénico inclui enzimas como a fosfatase alcalina e colagenase, factores de crescimento e proteínas como a osteocalcina, a osteonectina, a osteopontina, a sialoproteína óssea e a fibronectina, entre outras.⁵² Estes componentes são sintetizadas em diferentes fases da diferenciação osteoblástica⁵³ e a sua expressão observa-se numa sequência temporal coordenada.⁵⁴⁻⁵⁶

A matrix extracelular é rica em sais inorgânicos de cálcio e fosfato, dispostos sob a forma de pequenos cristais de hidroxiapatite dispostos ao longo das fibrilas de colagénio.^{32,57} Também estão presentes na matriz compostos amorfos de fosfato de cálcio que se encontram em equilíbrio com os iões cálcio e fosfato do fluido extracelular.

No tecido ósseo a mineralização da matriz inicia-se pela formação de vesículas a partir da membrana extracelular dos osteoblastos.^{32,58} Estas vesículas são exocitadas para a matriz a partir da superfície celular que está orientada para o osteoide. As vesículas são depositadas ao longo das fibras de colagénio e na substância

amorfa.³² Durante a primeira fase da mineralização, a concentração intravesicular de cálcio aumenta devido à sua afinidade com os fosfolípidos e proteínas existentes na membrana interna. As vesículas contêm fosfatases como a fosfatase alcalina, que hidrolisam os ésteres de fosfato e enzimas que degradam inibidores da mineralização, como, por exemplo, a adenosina trifosfato, pirofosfato e proteoglicanos.^{32,59} Observa-se a formação de um primeiro núcleo mineral perto da membrana da vesícula. Com a adição de íons de hidróxido e bicarbonato a esta fase mineral surgem os primeiros cristais de hidroxiapatite. A acumulação e crescimento destes cristais originam a perfuração da camada lipídica da vesícula com a consequente exposição ao fluido extravesicular que se encontra supersaturado em apatite, permitindo a proliferação axial e lateral dos cristais.⁵⁹

2. CICATRIZAÇÃO PERI-IMPLANTAR

Cicatrização óssea peri-implantar

A colocação do implante dentário na zona edêntula processa-se em diferentes fases cirúrgicas que se acompanham de agressão mecânica e conseqüentes lesões tecidulares a nível da mucosa e do tecido ósseo.²⁵ Os mecanismos subjacentes ao processo de cicatrização que ocorre na interface de um biomaterial são semelhantes aos que ocorrem na cicatrização das fracturas ósseas e envolvem uma cascata de acontecimentos celulares e acelulares.⁶⁰

A cicatrização óssea perimplantar traduz-se numa sucessão bem definida de respostas que visam a remoção de restos tecidulares, o restabelecimento do suprimento vascular e a produção de uma nova matriz óssea,⁶¹ compreendendo três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação.⁶¹

Fase inflamatória

A colocação de um implante envolve a criação de um defeito ósseo que se acompanha pelo corte de vasos sanguíneos e pela formação de uma fina camada de osso necrótico na região perimplantar.

O implante é colocado e ajustado contra o osso do leito implantar, o que permite a estabilidade física do implante, formando-se, no entanto, espaços vazios no local em que o biomaterial não contacta com o leito implantar.⁶²

Imediatamente após a colocação do implante, ocorre a adsorção na superfície implantar de água, iões e proteínas presentes no sangue e no fluido extracelular.^{7,63} As proteínas, uma vez na superfície do material, podem libertar-se ou permanecer mediando a resposta na interface tecido ósseo/implante.⁶⁴ A composição e organização da camada de água, iões e proteínas adsorvidas influenciam a resposta celular na interface osso/implante.⁵

O contacto das plaquetas sanguíneas com a superfície do biomaterial origina a sua adesão, activação e desgranulação.⁸ Durante o processo de desgranulação plaquetária, são libertadas citocinas e factores de crescimento. Este fenómeno condiciona também a libertação de substâncias pró-inflamatórias como a adenosina difosfato, serotonina, prostaglandinas, histamina e substâncias que promovem a agregação plaquetária como o troboxano A₂, formando-se então um rolhão hemostático, que constitui a primeira fase do processo de hemostase.⁶⁴ Paralelamente, o contacto do sangue com as proteínas e a superfície do biomaterial originam a activação da via intrínseca e extrínseca da coagulação, formando-se um coágulo sanguíneo no espaço perimplantar.⁸

O coágulo sanguíneo é rapidamente colonizado por células inflamatórias. Os neutrófilos são as primeiras células envolvidas na resposta inflamatória aguda, possuem uma elevada mobilidade e migram dos vasos sanguíneos adjacentes para o coágulo, onde fagocitam restos celulares e microrganismos. A infiltração por neutrófilos precede a infiltração por monócitos e linfócitos T e B. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que são responsáveis pela fagocitose dos restos tecidulares presentes.⁶⁴

Fase proliferativa

Nas primeiras horas após a colocação do implante, a interface osso/biomaterial caracteriza-se pela presença de osso necrosado e de um coágulo sanguíneo, rico em fibrina, colonizado por células inflamatórias com uma intensa actividade metabólica.⁶⁵

A actividade metabólica associada à não existência de vascularização no interior do coágulo determina um abaixamento do pH e uma diminuição da tensão de oxigénio, que, por sua vez, são factores quimiotácticos para a migração de células endoteliais e de células mesenquimatosas indiferenciadas.⁶⁶

A migração de células endoteliais inicia o processo de angiogénese. A angiogénese progride estimulada pela baixa tensão de oxigénio, alta actividade metabólica e pela activação de factores libertados pelos macrófagos e fibroblastos.^{64,65} A formação de

vasos sanguíneos é fundamental para manter a actividade celular durante o processo de cicatrização.⁶⁶

O coágulo sanguíneo é então progressivamente substituído por um tecido de granulação, que é caracterizado por uma grande quantidade de vasos sanguíneos e por vários tipos celulares – macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células mesenquimatosas indiferenciadas. Todas estas células encontram-se rodeadas por uma matriz composta principalmente por proteoglicanos, fibronectina, ácido hialurónico e colagénio tipo III que, posteriormente, se transforma em colagénio tipo IV.⁶⁵ Paralelamente, observa-se o aparecimento de osteoclastos nos espaços medulares da superfície óssea perimplantar que têm como função a reabsorção do osso necrosado presente no leito do implante.⁶⁷

As células mesenquimatosas indiferenciadas são células pluripotentes que, na presença de estímulos adequados, diferenciam-se em células da linhagem osteoblástica.⁹ Os pré-osteoblastos presentes no tecido conjuntivo proliferam e diferenciam-se em osteoblastos que são responsáveis pela síntese de uma matriz proteica na interface osso/implante que posteriormente mineraliza. O tecido ósseo recém-formado, osso primário ou embrionário, caracteriza-se por possuir uma fraca organização das fibrilas de colagénio, osteócitos de forma irregular e por possuir uma baixa densidade mineral. A formação de osso primário persiste durante cerca de quatro a seis semanas após a colocação do implante.⁶⁸

A formação de osso durante o processo de cicatrização perimplantar ocorre, segundo Davies,^{9,10} por dois mecanismos distintos, osteogénese à distância e osteogénese de contacto.

Os microtraumatismos no osso do leito implantar, seguidos de necrose, estimulam a formação de novo osso, ocorrendo um processo de remodelação com substituição do osso necrótico. A superfície óssea do leito implantar funciona como uma fonte de células osteoblásticas que produzem uma matriz óssea em direcção à superfície do implante. Este processo denomina-se osteogénese à distância.^{9,10}

A osteogénese de contacto ocorre na superfície do implante e baseia-se na migração de células mesenquimatosas indiferenciadas para a matriz de fibrina e proteínas

que constituem o coágulo sanguíneo que envolve o implante logo após a sua colocação. As células mesenquimatosas diferenciam-se em osteoblastos que iniciam a produção de matriz óssea na superfície do implante.^{9,40} Segundo Puleo et al,⁷ estes dois mecanismos de formação óssea parecem ocorrer simultaneamente.

Fase de remodelação

A fase final do processo de cicatrização é a fase de maturação que envolve a remodelação do tecido ósseo peri-implantar.

A remodelação óssea na superfície do implante inicia-se com a actividade coordenada da reabsorção óssea pelos osteoclastos acompanhada pela formação de novo osso pelos osteoblastos através da actividade das unidades básicas celulares (BMU – *basic multicellular units*).⁶⁹ O osso embrionário é reabsorvido de forma gradual e substituído por osso lamelar com a sua arquitectura característica. Durante toda a vida do implante o processo de remodelação ocorre também em resposta às forças de carga transmitidas através do implante ao osso.

Cicatrização dos tecidos moles peri-implantares

O processo de cicatrização do tecido conjuntivo que envolve a porção extra-óssea do implante é semelhante ao processo que ocorre no tecido ósseo, caracterizando-se por uma fase inflamatória inicial, uma fase proliferativa e uma fase de maturação, sem existir, no entanto, a intervenção de células da linhagem osteoblástica.

Durante o processo de cicatrização do tecido conjuntivo, o epitélio prolifera até encontrar a interface tecido conjuntivo/implante, observando-se então uma inibição da proliferação epitelial.⁷⁰ Os mecanismos que determinam este processo de inibição não estão totalmente esclarecidos. Normalmente, quando a superfície de continuidade de um epitélio é interrompida, a migração lateral das células epiteliais é activada para as margens da ferida, e esta migração só cessa quando as margens livres do epitélio se encontram (inibição de contacto), sendo então restituída a continuidade do tecido epitelial.⁷⁰

Após o processo de cicatrização e junto à porção extra-óssea do implante, observa-se uma porção de gengiva livre que se caracteriza por possuir um epitélio oral, um epitélio sulcular e um epitélio juncional que estabelece contacto com a superfície implantar.^{71,72} O epitélio gengival regenerado forma então um sulco em torno do colo do implante delimitado por epitélio crevicular não queratinizado e com uma zona de células epiteliais na base do sulco, que estabelecem a interface com o implante.⁷³ As células epiteliais produzem estruturas de ligação como a lâmina basal, compostas por colagénio tipo IV, hemidesmossomas e a laminina.^{74,75} Os componentes colagénicos não possuem capacidade para se incluírem no material implantado, como acontece no cimento das superfícies radiculares dos dentes naturais e o alto teor em glicosaminoglicanos cria uma zona com suficiente espessura e com propriedades de colagem, para formar uma área de selagem biologicamente activa e resistente a nível da interface do sulco gengival. A selagem biológica é uma barreira fisiológica que se deve desenvolver a partir do hospedeiro em torno do implante, e que tem por finalidade impedir a penetração de toxinas bacterianas e de outras substâncias presentes nos fluidos da cavidade oral. Se a selagem não for eficiente, poderá ocorrer a penetração destes agentes no interior do tecido conjuntivo, provocando fenómenos inflamatórios com a consequente destruição do estroma colagénico adjacente e do osso de suporte em torno do implante. Embora o epitélio juncional estabeleça uma barreira entre o meio bucal e a interface do implante, Ericsson e Lindhe⁷⁶ mostraram que a resistência à sondagem era menor que a observada nos dentes naturais. Ikeda et al⁷⁷ demonstraram que o epitélio juncional peri-implantar, embora estruturalmente semelhante ao observado nos dentes naturais, apresenta uma maior permeabilidade.

3. HÁBITOS TABÁGICOS

O tabaco ou “herba sancta”, como foi denominado, foi introduzido na Europa, no início do século XVI, após a descoberta do Continente Americano pelos europeus.⁷⁸ Mas foi Jean Nicot, embaixador francês em Lisboa, que, acreditando nos seus poderes curativos, fomentou a sua expansão para o resto da Europa a partir da Corte de França.⁷⁹ Nessa altura, o tabaco era inalado, fumado, mascado e até ingerido, considerando-se que o seu uso tinha efeitos medicinais como analgésico e anti-séptico, além de possuir propriedades preventivas e curativas das mais diversas doenças, incluindo o cancro.⁸⁰

Nos finais do século XIX, em relação com o desenvolvimento de novas variedades de tabaco e de novas tecnologias no seu processamento, o consumo de tabaco começaria a generalizar-se, gozando o cigarro de uma aceitação progressivamente crescente.⁸¹ Em Portugal, a prevalência de fumadores foi avaliada em alguns estudos.⁸²⁻⁸⁷ No entanto, grande parte desses estudos abrange grupos específicos da população e em diferentes períodos, o que torna difícil a comparação, nomeadamente em relação à evolução temporal do seu uso.⁸⁷ Hoje em dia, o cigarro é a forma principal de uso do tabaco, contribuindo com cerca de 95%. Dependendo da região de cultivo, do solo, da secagem, do armazenamento e da composição da mistura que compõe os cigarros, estes podem conter mais de 500 substâncias químicas.

A combustão dos cigarros produz outras substâncias, que perfazem mais de 4000 substâncias químicas diferentes, entre as quais se incluem substâncias farmacologicamente activas, tóxicas, mutagénicas e carcinogénicas.^{88,89} Para além da nicotina, que se encontra presente em quantidades elevadas no tabaco, o fumo do tabaco contém numerosas substâncias, tais como aldeídos (acroleína, acetaldeído, formaldeído, entre outros), alcatrão, monóxido de carbono, fenóis, amónia, peróxido de nitrogénio, ácido cianídrico, nitrosaminas voláteis, metais e açúcares, entre outras.⁹⁰

O consumo de tabaco é actualmente responsável por taxas elevadas de morbilidade⁸⁰ e de mortalidade,^{91,92} tendo-se averiguado que é causa de uma morte em cada dez.⁸¹ Calcula-se que cerca de 5 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao consumo de tabaco e estima-se ainda que, se o padrão de consumo se mantiver, possa vir a causar 450 milhões de mortes nos próximos 50 anos.⁸¹

A exposição ao fumo do tabaco está associada a um risco aumentado de diversas patologias, como doenças cardiovasculares,⁹³ doenças obstrutivas pulmonares,⁹⁴ úlcera péptica,^{95,96} doenças oncológicas,⁹⁷ atraso nos processos de cicatrização após processos cirúrgicos^{98,99} e patologias ósseas.¹⁰⁰ No que diz respeito ao tecido ósseo, o tabagismo parece ser um factor de risco para a diminuição da massa óssea,¹⁰¹⁻¹⁰⁵ incidência de fracturas ósseas^{102,106} e prolongamento do tempo de cicatrização após cirurgia óssea.¹⁰⁷

4. TABAGISMO E SAÚDE ORAL

Na cavidade oral os hábitos tabágicos constituem um factor de risco para o cancro oral,¹⁰⁸ doença periodontal,¹⁰⁹⁻¹¹⁹ incidência de osso tipo IV,¹²⁰ morbilidade em enxertos ósseos, atraso na cicatrização após tratamentos cirúrgicos,¹²¹⁻¹²³ reabsorção óssea peri-implantar^{124,125} e falência de implantes.¹²⁶⁻¹²⁸

Em relação aos tecidos periodontais, a exposição ao do fumo do tabaco condiciona uma diminuição crónica da vascularização que se traduz em palidez das mucosas, numa diminuição no sangramento após sondagem e num menor número de vasos observados clínica ou histologicamente. Este aspecto pode revelar-se importante nos processos de cicatrização que envolvem os tecidos periodontais.¹¹⁹

O tecido ósseo relacionado com a cavidade oral parece ser muito sensível aos efeitos deletérios do tabagismo. O osso alveolar, porque possui uma taxa de renovação elevada devido à necessidade de uma constante adaptação a forças oclusais variáveis, parece ser muito afectado.^{109,112,116}

Embora muitos dos constituintes do tabaco sejam reconhecidas como substâncias tóxicas, pouco se sabe acerca da dose/resposta de cada um dos componentes ou do efeito resultante das interações entre os vários compostos.

A nicotina está presente no fumo do tabaco em elevada quantidade, tendo-lhe sido atribuídos muitos dos efeitos adversos do tabagismo nos vários sistemas biológicos. A combustão do tabaco produz centenas de compostos químicos e muitos dos efeitos celulares agudos associados com a exposição ao fumo do tabaco parecem ser da responsabilidade dos compostos voláteis presentes. Dentre estes compostos, os aldeídos constituem um grupo de substâncias com elevada reactividade e que podem, em parte, ser responsáveis por estes efeitos.

4. TABAGISMO E IMPLANTOLOGIA ORAL

A reabilitação oral de desdentados totais ou parciais com recurso a implantes endósseos apresenta, hoje em dia, uma elevada taxa de sucesso com valores superiores a 95% após 5 anos de utilização.¹⁵

No entanto, está descrito na literatura que determinados grupos de indivíduos, com determinadas características comuns, perdem uma proporção elevada de implantes.¹²⁷⁻¹³⁰ Embora factores como o comprimento e diâmetro do implante, localização e qualidade do osso do hospedeiro tenham sido associados com um aumento das taxas de falência implantar, os hábitos tabágicos constituem actualmente, um dos principais factores de risco para o insucesso dos implantes osteointegrados, principalmente nas múltiplas falências observadas num mesmo indivíduo.¹²⁷⁻¹³⁰

Em 1998, Esposito et al^{129,131} publicaram, em dois extensos artigos, uma revisão da literatura com o objectivo de identificar os factores associados à perda dos implantes dentários, tendo concluído que se tornava necessária a realização de estudos prospectivos para se obter uma melhor compreensão dos mecanismos etiopatogénicos implicados na falência dos implantes osteointegrados. Nesta revisão da literatura, foram analisados e discutidos múltiplos factores considerados como possíveis factores causais do fracasso dos implantes orais, designadamente factores relacionados com a saúde geral dos doentes, qualidade óssea, terapêutica por irradiação, trauma cirúrgico, infecção bacteriana, carga sobre os implantes, número de implantes como suporte das próteses e sua localização anatómica, características dos implantes e hábitos tabágicos. Considerando o grande número de factores potencialmente implicados no fracasso dos implantes, parece poder concluir-se que, em princípio, este se apresenta como o resultado de um processo multifactorial.

Uma falência da osteointegração e a consequente perda dos implantes tem sido verificada em diversas situações clínicas, manifestando-se por radiolucência peri-im-

plantar e mobilidade dos implantes, como um efeito aparente de múltiplos factores de natureza biológica, mecânica, iatrogénica ou ainda associados a uma adaptação inadequada dos doentes.¹²⁹

Existe actualmente evidência científica de que o tabagismo tem importantes efeitos negativos na cavidade oral que, directa ou indirectamente, podem influenciar de forma significativa o prognóstico dos implantes dentários. Verificou-se, por exemplo, que os fumadores tratados com implantes têm um risco acrescido para o desenvolvimento de peri-implantite.¹³² Tem sido observada, nos fumadores, cicatrização dificultada após tratamento cirúrgico na cavidade oral,¹³³ redução da altura óssea,¹⁰⁹ taxa aumentada de perda óssea,¹³⁴ reabsorção aumentada da crista alveolar¹³⁵ e maior incidência de periodontite¹³⁶ constituindo ainda os hábitos tabágicos um dos factores de risco para a falência implantar actualmente mais discutidos na literatura.¹²⁷⁻¹³⁰

Até à década de 90, os insucessos em implantologia eram geralmente atribuídos a má técnica cirúrgica, a má concepção protética e a factores relacionados com o doente, designadamente higiene oral deficiente e bruxismo.¹³⁷

Em 1992, Jones e Triplett¹²² publicaram um artigo em que os hábitos tabágicos foram considerados como um factor potencialmente significativo na falência dos implantes. O estudo de Jones e Triplett incidiu sobre 15 doentes, dos quais 5 eram fumadores. Em 5 dos 15 doentes participantes no estudo verificou-se cicatrização dificultada com perda óssea e/ou perda dos implantes, tendo 4 destes cinco doentes admitido ter fumado durante o período peri-operatório.¹²²

No estudo de Bain e Moy¹³² foram avaliados retrospectivamente 2194 implantes colocados por um único cirurgião no período compreendido entre 1984 e 1991, com consideração pelos seguintes factores: comprimento do implante e local anatómico da sua colocação, diabetes, medicação com esteroides, idade, sexo, tempo decorrido após a colocação e hábitos tabágicos. Os autores verificaram que, de todos estes factores, os hábitos tabágicos foram aqueles que se mostraram mais significativamente associados com um aumento da falência implantar cuja taxa global foi de 4,76% nos não fumadores e de 11,3% nos fumadores ($p < 0,01$). Verificou-se ainda neste estudo que os valores percentuais da taxa de falência tinham menor

diferença quando comparados a nível da mandíbula (4,64% nos fumadores *versus* 2,4% nos não fumadores) mas, quando comparados a nível da maxila, a diferença revelou-se altamente significativa (17,9% nos fumadores *versus* 7,3% nos não fumadores, com um valor de $p < 0,001$). Em relação ao tamanho dos implantes, os autores verificaram uma redução na frequência da falência implantar com o aumento do comprimento do implante mas, na maxila, foi observada uma maior percentagem de falência nos fumadores em relação aos implantes com um comprimento superior a 15 mm. A relação entre a influência do tabagismo na qualidade de osso e fracasso implantar foi estudada por Bain e Moy¹²⁰, tendo estes autores concluído que o tabagismo predispõe para a formação de osso tipo IV e para a falência dos implantes, estando estes efeitos relacionados com o número de cigarros fumados. Gorman et al¹³⁸ verificaram que a falência dos implantes nos fumadores foi 2 vezes superior à dos não fumadores.

A influência do tabagismo em implantologia foi também confirmada num estudo realizado por De Bryun e Collaert¹³⁹, em que a avaliação se limitou ao ponto de exposição do implante com o objectivo de evitar influências de outros factores (a carga, por exemplo), tendo sido encontradas falências implantares na maxila de 9% nos fumadores e apenas de 1% nos não fumadores. Os autores salientaram que existia, pelo menos, um implante fracassado em cada 3 fumadores *versus* um implante fracassado em 25 não fumadores.

Num estudo prospectivo de 10 anos, que incidiu sobre implantes mandibulares como suporte de próteses, Lindqvist et al¹⁴⁰ verificaram que a perda óssea marginal era maior nos fumadores que nos não fumadores, estando estas alterações correlacionadas com a quantidade de cigarros consumidos. Estes autores verificaram ainda que a perda óssea em torno dos implantes mandibulares estava associada com má higiene oral nos fumadores. Todavia, uma má higiene oral não afectava significativamente a perda óssea nos não fumadores.¹⁴⁰

Duyck e Naert¹⁴¹ publicaram, em 1998, um trabalho de revisão em que averiguaram as possíveis causas de fracasso dos implantes, tendo concluído que, entre outras causas, figuram os hábitos tabágicos, os quais são responsáveis pela progressão da doença periodontal, por alterações da microflora e da resposta inflamatória. Segun-

do os autores, uma redução na incidência dos fracassos implantares passa por uma selecção dos pacientes tendo também em atenção os seus hábitos tabágicos.¹⁴¹

Esposito et al^{129,131} concluíram que, em geral, os fumadores apresentam um número de falências implantares duplo daquele que é verificado nos não fumadores e que, não obstante ser consensual a ideia de que o tabagismo influencia negativamente a sobrevida dos implantes, se torna necessário efectuar estudos clínicos com desenhos apropriados.

Wallace,¹²⁶ tendo examinado 187 implantes em 56 doentes, encontrou taxas de falência que variaram entre 16,6% nos fumadores e 6,9% nos não fumadores ($p < 0,01$), tendo os implantes mais curtos (10 mm ou menos) sido mais susceptíveis de falência nos fumadores.

Lambert et al,¹⁴² tendo realizado um estudo longitudinal que incidiu em mais de 800 doentes, em que examinaram 2900 implantes dentários, verificaram que um aumento de fracassos implantares nos fumadores não resultou de má cicatrização ou má osteointegração mas, principalmente, da exposição dos tecidos peri-implantares ao fumo do tabaco. Hultin et al,¹⁴³ tendo estudado a falência implantar tardia em 143 doentes, verificaram que, em 7 de 9 doentes com insucesso, após a colocação em carga, eram fumadores.

Ekfeldt et al¹⁴⁴ publicaram, em 2001, um trabalho de investigação cujos resultados permitiram concluir que os factores de risco para a falência dos implantes incluem uma falta de suporte ósseo adequado, bruxismo e hábitos tabágicos pesados. Wilmarm et al¹⁴⁵ referiram igualmente taxas mais altas de falências implantares nos fumadores que nos não fumadores

Schartz et al¹⁴⁶ realizaram uma investigação com o objectivo de comparar a incidência de complicações e a taxa de sobrevivência dos implantes dentários em fumadores versus não fumadores e de avaliar a influência do fumo do tabaco em 959 implantes colocados em 261 doentes entre 1995 e 1998, tendo encontrado uma correlação significativa entre as complicações implantares (exposição espontânea do implante e perda do implante) e o fumo do tabaco. Os implantes imediatos fracassaram mais vezes que os implantes não imediatos, e a cessação dos hábitos tabágicos favoreceu uma diminuição de incidência das complicações observadas.¹⁴⁶

Na avaliação retrospectiva da longevidade de 1852 implantes, colocados entre 1979 e 1999, Deluca et al¹⁴⁷ concluíram que os fumadores apresentavam uma taxa de falência superior (23%) aos não fumadores (13,3%). Os mesmos autores estudaram os factores de risco associados à perda óssea peri-implantar, tendo concluído que uma história de hábitos tabágicos positiva estava associada a uma maior reabsorção óssea peri-implantar, aumentando o risco de falência implantar.¹²⁵

Sanchez-Perez et al¹⁴⁸ correlacionaram os hábitos tabágicos e a sua intensidade com a sobrevivência dos implantes dentários, tendo concluído que o hábito de fumar aumenta o risco de falência. Adicionalmente, os autores concluíram que, nos fumadores de menos 20 cigarros/dia, o risco relativo de falência era de 10,1% e aumentava para 30,8% nos fumadores de mais de 20 cigarros/dia.¹⁴⁸

Strietzel et al¹²⁸ publicaram em 2007 um estudo de meta-análise sobre a interferência dos hábitos tabágicos no prognóstico dos implantes dentários. Após a verificação dos critérios de inclusão como ano de publicação, indicação da taxa de sobrevivência em função do número de implantes ou do número de doentes, indicação do número de indivíduos fumadores e não fumadores e a possibilidade destes dados poderem ser correlacionados com os implantes perdidos e não perdidos, os autores concluíram que os hábitos tabágicos constituem um risco aumentado para a falência dos implantes orais.¹²⁸

Com o objectivo de caracterizar o impacto do fumo do tabaco em geral e da nicotina em particular no processo de osteointegração de implantes endósseos foram realizados numerosos estudos em animais. Vários modelos animais foram assim utilizados para o estudo da regeneração do tecido ósseo após a implantação de implantes de titânio. Os métodos histomorfométricos utilizados permitiram comparar e quantificar a percentagem de contacto entre o osso formado e a superfície do material implantado e a qualidade do osso formado nos animais expostos e não expostos.

Stefani et al¹⁴⁹ investigaram a influência da administração sistémica de nicotina na osteointegração de implantes de titânio na tibia de coelhos, com diferentes tratamentos de superfície (maquinados e tratamento com jacto de Al_2O_3). Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a superfície do implante e exposição

à nicotina. Após 42 dias, os animais foram sacrificados e os resultados mostraram que a nicotina não influenciou de forma estatisticamente significativa o desempenho dos implantes endósseos.¹⁴⁹

Nociti Jr et al¹⁵⁰ procederam a uma investigação em ratos na tentativa de avaliar a influência do fumo do tabaco no processo de osteointegração e no osso recém-formado na superfície do implante. Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo controlo, não exposto ao fumo do tabaco e um grupo exposto à inalação intermitente de fumo de tabaco. Os animais foram sacrificados após 60 dias da implantação dos biomaterias e os resultados obtidos permitiram concluir que, dentro dos limites do estudo, a inalação intermitente de fumo de tabaco pode piorar a qualidade óssea em torno dos implantes de titânio colocados em ratos.¹⁵⁰

César Neto et al¹⁵¹ realizaram uma investigação com o objectivo de estudar a influência do fumo do tabaco e da nicotina no osso peri-implantar, a qual incidiu sobre 45 ratos Wistar que receberam implantes de titânio colocados bilateralmente. Os ratos foram classificados em três grupos: Grupo 1 – grupo de controlo; grupo 2 – grupo com inalação intermitente de fumo de tabaco; e Grupo 3 – grupo com administração subcutânea de nicotina 2 vezes por dia. Os animais foram sacrificados após 60 dias, tendo os resultados sido avaliados em relação à área de contacto osso/implante e à área dentro dos limites da rosca do implante, sendo medidos no osso cortical e no osso esponjoso. No tecido ósseo cortical, o fumo do tabaco causou uma influência negativa no contacto osso/implante e área óssea ($p < 0,05$) mas, em contraste, a administração subcutânea de nicotina não influenciou qualquer dos parâmetros ($p > 0,05$). No osso esponjoso a inalação do fumo de tabaco e a exposição à nicotina também resultou numa percentagem diminuída no grau de contacto osso/implante comparativamente com o grupo controlo ($p < 0,05$).¹⁵¹ Os autores concluíram que o efeito negativo do tabagismo nos resultados dos implantes podem estar relacionados com mais que uma substância presente no fumo do tabaco e com o tipo de osso presente. A contribuição nicotina nos efeitos negativos ocorre principalmente a nível do osso esponjoso.¹⁵¹

Com o objectivo de avaliar o efeito da exposição à nicotina (3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) e a doses elevadas de nicotina (6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), durante um período curto na osteointegração

de implantes de titânio, Balatsouka et al^{152,153} realizaram dois estudos em coelhos, os quais receberam, por via subcutânea, ou nicotina ou placebo. Após 4 semanas e 6 semanas de exposição à nicotina ou ao placebo, os animais foram sacrificados. Analisados os resultados, os autores concluíram que, dentro dos limites do estudo, a administração de nicotina e de doses elevadas de nicotina não influencia a osteointegração em torno dos implantes de titânio no côndilo do fêmur e tibia de coelhos, quando a exposição ocorre por períodos curtos. No entanto, os autores referem que o tempo de exposição à nicotina pode ter sido excessivamente curto para poder influenciar a densidade mineral óssea e a osteointegração.

César-Neto et al¹⁵⁴ testaram em ratos a hipótese de que a interrupção da inalação do fumo de tabaco poderá reverter o seu impacto na densidade óssea em torno dos implantes. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1 como grupo controlo; Grupo 2 com inalação intermitente de fumo de tabaco; Grupo 3 com inalação de fumo de tabaco durante 83 dias antes da colocação dos implantes e cessação da inalação 7 dias antes da colocação dos implantes; Grupo 4 com cessação da inalação 7 dias antes da colocação dos implantes e retoma da inalação 21 dias após a colocação dos implantes. Este estudo permitiu aos autores verificar os seguintes resultados: no osso cortical, notou-se uma ligeira diferença na densidade óssea entre os grupos (97,6% no grupo 1, 3 % no grupo 2, 98,8% no grupo 3 e 98,1% no grupo 4; valor de $p < 0,05$). Todavia, uma exposição continuada ao fumo de tabaco reduziu significativamente a densidade do osso esponjoso comparativamente com os restantes grupos (25,6% no grupo 1, 18,0% no grupo 2, 25,4% no grupo 3 e 26,3% no grupo 4; não sendo as diferenças significativas entre os grupos 1,3 e 4 ($p > 0,05$)). Os autores concluíram que o tabagismo pode afectar a boa qualidade óssea em torno dos implantes de titânio no osso esponjoso e que a cessação do hábito pode resultar num retorno aos níveis de qualidade óssea observados no grupo controlo.¹⁵⁴

5. CARACTERIZAÇÃO DA NICOTINA, ACROLEÍNA E ACETALDEÍDO

Nicotina

A nicotina encontra-se numa grande variedade de plantas solanáceas como a batata, o tomate, a pimenta verde e o tabaco. No entanto, as principais fontes de exposição à nicotina são o fumo do tabaco e a terapêutica de substituição tabágica.

A nicotina (1-metil-2-(3-piridil-pirrolidina), $C_{10}H_{14}N_2$), é uma amina composta por dois anéis piridina e pirrolidina, possui um pKa de 7,9 e está presente em elevada concentração na fase sólida do fumo do tabaco.

A absorção da nicotina ocorre através da mucosa pulmonar, da mucosa da cavidade oral e nasal, da pele, bexiga e, em menor grau, a partir do tracto gastrointestinal.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Após a absorção, é rapidamente distribuída atingindo o SNC em cerca de 10 segundos.¹⁵⁸ As concentrações plasmáticas e cerebrais diminuem rapidamente devido à distribuição periférica e rápida metabolização.¹⁵⁹ A nicotina é metabolizada predominantemente no fígado, envolvendo um sistema complexo,¹⁵⁹ mas também, em pequena percentagem, nos pulmões e rins.¹⁵⁶ O principal metabolito da nicotina é a cotinina que constitui, na maioria dos indivíduos, 70 a 80% do produto final da sua metabolização.¹⁵⁵ É excretada predominantemente pelo rim com uma taxa de reabsorção dependente do pH urinário,¹⁶⁰ mas também pode ser detectada na saliva e no fluido crevicular,^{160,161} fezes,¹⁵⁹ bile¹⁶² e suor.¹⁶³ A quantificação dos níveis de nicotina e do seu principal metabolito, a cotinina, no plasma, urina e saliva, constitui um método de avaliação da exposição ao fumo do tabaco. A forma de utilização do fumo do tabaco (por inalação ou mastigação) não parece influenciar de forma significativa os níveis sanguíneos de nicotina. Russel et al descreveram nos fumadores níveis plasmáticos variáveis entre 4 e 72 ng/ml¹⁶⁴ e, num outro estudo, os mesmos autores referiram valores variáveis entre 15,5 e 48,4 ng/ml.¹⁶⁵ Hukkanen et al¹⁶⁶ reportaram níveis arteriais de nicotina da ordem dos 100 ng/ml. Gritz et al¹⁶⁷ refe-

riram que os níveis plasmáticos obtidos nos mascaradores de tabaco variavam entre os 11,2 e 45,8 ng/ml. Na cavidade oral, a nicotina está presente no fluido crevicular com valores que podem atingir os 5961 ng/ml.¹⁶⁸ Relativamente aos níveis salivares de nicotina, há uma relativa dispersão na informação disponível na literatura e estão descritas concentrações variáveis entre 96 ng/ml e 1560 mg/ml.^{161,169,170}

A nicotina é um agonista dos receptores nicotínicos¹⁵⁸. *In vivo*, as suas acções farmacológicas são complexas e dependem da dose, órgão-alvo, predominância do tono simpático ou parassimpático e ainda de exposição prévia.¹⁵⁶

A activação dos receptores nicotínicos origina a libertação de neurotransmissores, incluindo a acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, beta endorfinas e glutamato, entre outros. A nicotina também facilita a libertação da hormona de crescimento e de ACTH.¹⁵⁸

Os efeitos da nicotina têm sido amplamente investigados no homem, em animais e em diversos sistemas celulares. A nicotina estimula a actividade simpática e aumenta os níveis circulantes de catecolaminas, originando aumento do trabalho cardíaco, vasoconstrição coronária e vasoconstrição periférica. Estes mecanismos são responsáveis, em parte, pelos efeitos cardiovasculares associados aos hábitos tabágicos.¹⁷¹ Acessoriamente, a nicotina pode contribuir para a doença aterosclerótica ao aumentar os níveis de LDL e VLDL e diminuir os níveis de HDL.¹⁷²

Embora a nicotina seja identificada como um elemento não carcinogénico do fumo do tabaco, evidências crescentes sugerem que esta substância pode ser um factor potencialmente carcinogénico ao actuar como promotor do crescimento de vários tipos de cancro.¹⁷³ A nicotina em concentrações normalmente presentes no plasma dos fumadores exhibe um efeito mitogénico em vários tipos celulares^{174,175} e interfere nos mecanismos de regulação da apoptose celular.¹⁷⁶ A nicotina interfere na proliferação das células endoteliais e na expressão do factor de crescimento do endotélio vascular de um modo dependente da dose, ocorrendo inibição da proliferação para exposição a concentrações elevadas e efeito inverso para concentrações baixas.¹⁷⁴

Entre os tecidos alvo para os efeitos da nicotina, as células da cavidade oral representam o primeiro tecido a ser exposto a este fármaco, quer durante a exposição ao

fumo do tabaco quer como no tratamento da dependência tabágica. A cavidade oral dos utilizadores de tabaco está assim exposta aos efeitos sistémicos e locais da nicotina. Quando em contacto com as células da cavidade oral, a nicotina é capaz de atravessar a barreira epitelial^{177,178} e difundir para o espaço extracelular causando uma variedade de efeitos nas células dos tecidos orais. Theilig et al¹⁷⁹ e Ringdhal et al¹⁸⁰ mostraram que a nicotina é rapidamente captada pelos queratinócitos da cavidade oral. Giannopoulou et al,¹⁸¹ em coculturas de células epiteliais e fibroblastos gengivais expostas à nicotina, mostraram que as células epiteliais, funcionando como uma barreira mecânica, podem diminuir mas não eliminar completamente os efeitos nocivos da nicotina sobre os fibroblastos gengivais. Os autores trataram coculturas de células epiteliais e fibroblastos gengivais com concentrações de nicotina variáveis entre 1 µg/ml e 500 µg/ml durante um período de 24 horas, tendo concluído que a proliferação e diferenciação celulares eram afectadas pela exposição à nicotina, apesar da existência da barreira das células epiteliais.¹⁸¹ Nguyen et al¹⁸² mostraram que as células do epitélio queratinizado da gengiva aderida expressam receptores não neuroniais da acetilcolina e que estes receptores seriam alvo da acção da nicotina. Estes receptores têm um papel regulador em numerosos processos biológicos que estão interligados entre si, incluindo a adesão, migração, proliferação, diferenciação e apoptose das células epiteliais.¹⁸³

Numerosos estudos *in vitro* mostraram que a nicotina exerce efeitos tóxicos nas funções dos fibroblastos gengivais e/ou periodontais. A nicotina, em concentrações que podem estar presentes na cavidade oral dos fumadores, afecta negativamente o processo de adesão e proliferação dos fibroblastos gengivas e periodontais.^{170,173,181,184-188} Hanes et al¹⁸⁹ expuseram fibroblastos gengivais à nicotina e observaram que os fibroblastos tinham a capacidade de se ligarem à nicotina e de a captar rapidamente, resultando em níveis intracelulares de nicotina relativamente elevados que, segundo os autores, podem interferir com as funções celulares normais.

Os mecanismos envolvidos no efeito da nicotina sobre o processo de adesão celular dos fibroblastos gengivais foram estudados por vários autores.^{185,186} Austin et al¹⁸⁶ demonstraram que a exposição à nicotina diminui significativamente a distribuição

da sub-unidade $\beta 1$ das integrinas presentes na superfície celular dos fibroblastos gengivais.

Alpar et al¹⁸⁵ mostraram que a exposição à nicotina condicionou alterações no citoesqueleto dos fibroblastos gengivais e periodontais, alterando a organização dos microtúbulos e dos filamentos de actina. Este efeito sobre o citoesqueleto originou alterações na morfologia normal dos fibroblastos e na organização celular. Paralelamente, estes autores observaram vacuolização citoplasmática para concentrações elevadas de nicotina. Esta alteração morfológica está descrita por vários autores em trabalhos que envolvem para além de fibroblastos gengivais e periodontais,^{181,185,187,189,190} outro tipo de células tais como macrófagos¹⁹¹ e células osteoblásticas derivadas de calvária de embrião de pinto.¹⁹²

A nicotina influencia também parâmetros funcionais, tais como a síntese de colagénio tipo I, a síntese proteica e a síntese de fibronectina em fibroblastos^{170,184,185,188}. Tipton e Dabbous demonstraram que a exposição de fibroblastos gengivais a concentrações de nicotina variáveis entre 0,06 mM e 5 mM (0,01 a 0,81mg/ml) inibia significativamente a proliferação e afectava a função celular ao inibir a produção de fibronectina e colagénio e ao estimular a produção de colagenase.¹⁸⁴

Argentin et al,¹⁷³ num estudo realizado em fibroblastos gengivais humanos mostraram que a nicotina danifica a estrutura do ADN, afecta os mecanismos de apoptose e induz mecanismos de stress oxidativo que contribuem para os danos observados na estrutura do ADN.

O efeito da nicotina sobre as células ósseas tem sido caracterizado em vários sistemas celulares, com diferenças de comportamento nos vários parâmetros estudados. Estas diferenças observadas podem reflectir diferenças nas condições de cultura, na origem das células osteoblásticas utilizadas, na fase de diferenciação em que a exposição ocorreu, duração da exposição e nas concentrações utilizadas. Fang et al¹⁹³ estudaram o efeito da nicotina nas concentrações de 0,001 a 1000 μ M (0,17 ng/ml a 0,17 mg/ml), em culturas de células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de rato (UMR 106-01), com um grau de confluência de 45% a 75%, e observaram um efeito inibitório dependente da dose na proliferação celular e um efeito de estimulação da actividade da fosfatase alcalina na gama das concentra-

ções estudadas.¹⁹³ Ramp et al,¹⁹² expuseram, por 24 horas, células ósseas derivadas da calvária do embrião da galinha a concentrações de nicotina variáveis entre 300 e 3600 μM (0,05 a 0,6 mg/ml) e observaram um efeito inibitório na produção de fosfatase alcalina e síntese de colagénio e estimulação da proliferação celular.

O efeito da nicotina sobre a diferenciação osteoblástica, nomeadamente sobre a capacidade de formação de depósitos mineralizados, foi evidenciado por Yahura et al¹⁹⁴. Neste estudo, os autores utilizaram duas linhas celulares imortalizadas (ROB - C26 e MC3T3-E1, derivadas da calvária do rato e da calvária do ratinho, respectivamente) e expuseram as culturas próximas da confluência à nicotina nas concentrações de 60 a 1500 μM , (0,01 mg/ml a 0,25 mg/ml) durante 12 dias. As células ROB - C26 responderam à nicotina com um aumento da expressão da fosfatase alcalina e estimulação na formação de depósitos mineralizados. Paralelamente, nas células MC3T3-E1, os autores observaram uma inibição na produção de fosfatase alcalina e uma inibição na formação de depósitos mineralizados nas culturas expostas a 0,25 mg/ml de nicotina.¹⁹⁴

O efeito da nicotina sobre células ósseas humanas foi evidenciado por Walker et al¹⁹⁵ em culturas de osso trabecular expostas à nicotina durante 48 horas. Estes autores observaram estimulação da proliferação celular acompanhada pelo aumento de expressão do gene *c-fos* para níveis inferiores a 1000 μM (0,17 mg/ml) e inibição para níveis superiores de nicotina.¹⁹⁵

Gullihorn et al¹⁹⁶ avaliaram a proliferação celular e a actividade metabólica (actividade de fosfatase alcalina, conteúdo em proteína total e síntese de colagénio) em células osteoblásticas, MC3T3-E1, na presença de nicotina nas concentrações de 0,08 a 1, 6 μM (12,5 ng/ml a 250 ng/ml), e de extractos de fumo de tabaco com concentrações de nicotina semelhante. Os autores, embora tenham observado um efeito de estimulação em todos os parâmetros caracterizados, verificaram que o grau de estimulação variava com o número da passagem celular e que o efeito diminuía em presença de mecamilamina (antagonista dos receptores nicotínicos). Nas células expostas aos extractos do fumo observou-se uma diminuição em todos os parâmetros metabólicos, embora se mantivesse a estimulação da proliferação celular.¹⁹⁶

Kamer et al.¹⁹⁷ avaliaram a acção da nicotina em dois sistemas celulares, células osteoblásticas derivadas de calvária de rato e células osteoblásticas humanas. Os autores mostraram que níveis de nicotina de 10^{-6} M (0,0017 µg/ml) estimulavam a proliferação celular e aumentavam a secreção da interleucina 6 (IL-6) e do factor de necrose tumoral α (TNF- α) nas culturas de células osteoblásticas de rato. No entanto, nas culturas expostas a 10^{-3} M (0,17 µg/ml) observou-se um efeito inibitório em todos os parâmetros avaliados.¹⁹⁷ Os autores verificaram a mesma tendência de comportamento sobre a proliferação celular nas células osteoblásticas humanas, mas o efeito da nicotina dependia do dador.¹⁹⁷

A acção da nicotina sobre as células Saos-2, linha celular derivada de osteosarcoma humano, foi estudada por vários autores.^{198,199} Tanaka et al.¹⁹⁸ mostraram que a exposição à nicotina nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} M (0,017 e 0,17 µg/ml), durante 14 dias, diminuía significativamente a produção de fosfatase alcalina, a expressão dos genes do colagénio tipo I e da osteopontina, e estimulava a expressão genética da sialoproteína óssea. Adicionalmente, os autores observaram uma diminuição na formação de depósitos minerais nas culturas expostas a 10^{-3} M de nicotina.¹⁹⁸ No mesmo sistema celular e em culturas expostas à nicotina a concentrações de 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M (0,0017, 0,017 e 0,17 µg/ml), Katono et al.¹⁹⁹ observaram indução na expressão genética das metaloproteinases 1, 2, 3, 13 e 14, no factor inibidor das metaloproteinases 1, 2, 3 e 4 e na expressão do gene *c-fos*.

Acroleína e acetaldeído

Os aldeídos presentes na fase gasosa do fumo do tabaco são formados directamente durante a combustão das folhas do tabaco ou a partir de precursores como polisacarídeos, pectinas, proteínas ou triglicéridos presentes na mistura que constitui o tabaco.

A acroleína (C₃H₄O) é um aldeído α,β -insaturado com elevada reactividade, ao qual o Homem está exposto em variadas situações, tais como a exposição profissional, ambiental ou endógena. A acroleína forma-se durante a combustão incompleta de

produtos orgânicos como a madeira, óleos, alimentos e tabaco, mas é o tabagismo, no entanto, que constitui uma das principais fontes de exposição crônica.^{200,201} Nos indivíduos fumadores, os níveis de ácido 3-hidroxi-propil mercaptúrico, principal metabolito da acroleína, presentes na urina são duas vezes superiores aos encontrados nos não fumadores.²⁰⁰ *In vivo*, a acroleína é gerada durante os processos de peroxidação lipídica²⁰², durante a metabolização de fármacos como a ciclofosfamida ou ainda a partir da treonina por acção da mieloperoxidase dos neutrófilos.²⁰³ Embora a formação endógena de acroleína exponha localmente as células e esteja aumentada em vários processos patológicos, tem sido referido que esta forma de exposição não tem significado, antes funcionando como um marcador biológico de situações patológicas.²⁰⁴ A acroleína reage rapidamente com as moléculas proteicas que contêm grupos sulfidrilo, aminas primárias e secundárias e as terminações livres dos grupos tiois. A exposição à acroleína causa a rápida depleção dos tiois celulares, nomeadamente a glutatona.²⁰⁵ A glutatona é um tripeptídeo que impede a intervenção de agentes oxidantes sobre outros compostos, porque ela própria é oxidada, poupando assim esses compostos, o que constitui um mecanismo de defesa celular *in vitro*^{206,207} e *in vivo*²⁰⁸ contra substâncias tóxicas exógenas e, consequentemente, a sua depleção afecta os mecanismos de defesa.

No indivíduo fumador e como consequência da elevada reactividade, a acroleína liga-se aos locais primários de exposição, células da cavidade oral e do tracto respiratório, reduzindo de forma significativa a biodisponibilidade após inalação e, consequentemente, a determinação das concentrações plasmáticas.

A acroleína, embora presente em menor quantidade no fumo do tabaco quando comparada, por exemplo, com o acetaldeído, apresenta uma elevada toxicidade, mesmo para baixas concentrações. É detectada na saliva em concentrações médias de 12 ± 2 e de 21 ± 4 μM nos fumadores de menos de 10 e mais de 10 cigarros, respectivamente.²⁰⁹ Holden et al²¹⁰ referiram que, imediatamente após a inalação do fumo de um cigarro, a concentração de acroleína no fluido brônquico pode atingir valores da ordem dos 80 μM .

O acetaldeído, C_2H_4O , é um composto com uma elevada reactividade em consequência da polaridade do seu grupo carbonilo. É gerado durante a combustão da madeira, óleos e em vários processos industriais. Endogenamente, é sintetizado pelas bactérias do tracto gastrointestinal, incluindo a flora oral, e durante processos metabólicos, como por exemplo, na síntese do ácido pirúvico. O acetaldeído é o produto inicial da oxidação do etanol e é responsável por muitos dos efeitos negativos relacionados com os hábitos alcóolicos.²⁰⁷ A ingestão de álcool condiciona a formação de elevadas concentrações de acetaldeído na cavidade oral por acção da microflora e da actividade da desidrogenase alcoólica presente nas células da mucosa.²¹¹ O acetaldeído está presente em elevada quantidade no fumo do tabaco, cerca de 980 $\mu\text{g}/\text{cigarro}$, e resulta principalmente da combustão directa dos polissacarídeos presentes no tabaco, incluindo a celulose,²¹² e contribui com uma percentagem elevada para a totalidade dos aldeídos presentes no fumo do tabaco, podendo atingir 72% da sua totalidade.²¹³ Os hábitos tabágicos e alcóolicos constituem no Homem a principal fonte de exposição a concentrações elevadas de acetaldeído na cavidade oral.²¹⁴

A dificuldade na determinação dos níveis plasmáticos de acetaldeído após o acto de fumar prende-se com o facto de uma elevada percentagem ficar retida na cavidade oral e vias áreas durante processo de inalação^{215,216} e ainda pelo facto de possuir uma elevada reactividade e ser rapidamente metabolizado. McLaughlin et al²¹⁷ conduziram um estudo no qual os níveis plasmáticos de acetaldeído foram determinados em indivíduos não fumadores e em fumadores antes e imediatamente após um período de intensa inalação de fumo. Os autores não conseguiram encontrar diferenças significativas entre os níveis plasmáticos de acetaldeído entre os não fumadores e os fumadores e, dentro do grupo dos fumadores, não se observou uma elevação significativa dos níveis de acetaldeído. No entanto, e relativamente aos níveis de acetaldeído, os autores observaram uma elevação significativa no ar exalado pelos fumadores.²¹⁷ Este estudo permitiu concluir que o acetaldeído retido no tracto respiratório e cavidade oral não é completamente absorvido, sendo em parte posteriormente exalado. A cavidade oral dos fumadores está assim exposta a concentrações elevadas de acetaldeído. Durante o acto de fumar o acetaldeído

dissolve-se na saliva, atingindo concentrações médias de 886 ± 77 e de 1332 ± 146 μM nos fumadores de menos de 10 e mais de 10 cigarros, respectivamente.²⁰⁹

A acroleína e o acetaldeído reagem rapidamente com as moléculas biológicas, particularmente as que contêm grupos sulfidrílo (SH) como a cisteína, histidina e lisina, prejudicando a síntese proteica, interagem com as moléculas de ADN, inibindo a sua síntese, e reagem rapidamente com a glutatona, promovendo a sua depleção.^{201,204,218}

Estudos *in vitro* mostraram que o acetaldeído e a acroleína exibem efeitos cito e genotóxicos nas células epiteliais e fibroblastos do sistema respiratório.^{206,206,219-222}

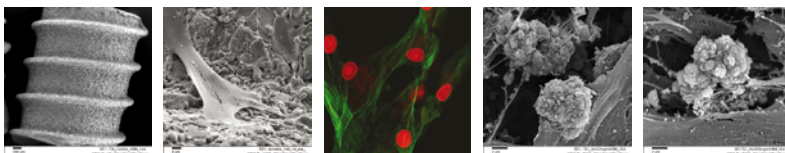
A acroleína inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células T e pelos macrófagos.²²³ A acroleína estimula²²⁴ ou inibe^{225,226} os mecanismos responsáveis pela apoptose. Diferenças nas condições de cultura, composição do meio, concentrações de acroleína utilizadas e tipos celulares estudados podem explicar as diferenças observadas em relação à resposta apoptótica após exposição à acroleína.²⁰¹ O efeito do acetaldeído nas células ósseas foi avaliado em culturas osteoblásticas derivadas de osso fetal de rato.²²⁷ O acetaldeído, em concentrações variáveis entre 0,54 a 1,79 mM), inibe significativamente a síntese de ADN, de colagénio e de prostaglandina E_2 .²²⁷

Em relação com a diminuição da massa óssea observada nos indivíduos alcoólicos, Giulini et al²²⁸ investigaram o efeito do acetaldeído nas concentrações de 10,74 a 0,179 mM na formação das células osteoprogenitoras em culturas de medula óssea humana e culturas de medula óssea de rato. Paralelamente, foi investigado o efeito do acetaldeído na proliferação celular de duas linhas celulares de células osteoblásticas (MG-63 e HOBIT).²²⁸ Os autores observaram uma diminuição na formação de colónias fibroblásticas (*fibroblasts colony-forming units* – CFU-F) nos dois sistemas celulares e ausência de formação de colónias nas culturas expostas à concentração mais elevada de acetaldeído (10,74 mM).²²⁸ As CFU-F são unidades básicas que derivam de uma simples célula inicial e são fonte de células osteoprogenitoras que originam, *in vitro*, e na presença de estímulos adequados, células com capacidade

de formação de nódulos mineralizados.^{229,230} O acetaldeído pode comprometer directamente o potencial osteogénico da medula óssea e, deste modo, contribuir para uma diminuição da formação de tecido ósseo observada nos indivíduos expostos. A nível das células presentes na cavidade oral, a acroleína e o acetaldeído induzem, *in vitro*, alterações citotóxicas nos fibroblastos gengivais.²³¹⁻²³³ Cattaneo et al²³¹ examinaram o efeito da acroleína e do acetaldeído na proliferação, adesão e na ultraestrutura de fibroblastos gengivais humanos em cultura. Acroleína na concentração 3×10^{-5} M, e o acetaldeído na concentração de 3×10^{-3} M inibiam a adesão e a proliferação. A nível ultraestutural, os autores observaram a formação no interior das células de corpos residuais com um material electrodense. Os efeitos citotóxicos foram reversíveis quando ambos os compostos eram retirados do meio de cultura. Rota et al²³² mostraram que a exposição a doses elevadas de acroleína (8×10^{-5} M a 10^{-4} M) e de acetaldeído (6×10^{-3} a 10^{-2} M) causava desorganização dos microtúbulos e dos filamentos intermediários de vimentina e uma diminuição da capacidade de adesão das células. Os efeitos negativos da acroleína e do acetaldeído sobre o citoesqueleto de fibroblastos gengivais foram também observados por Poggi et al.²³³ Neste estudo, estas duas fracções voláteis presentes no fumo do tabaco causaram alterações na organização dos microtúbulos e nos microfilamentos de actina e vimentina. Estes resultados mostraram que a acroleína e o acetaldeído têm efeitos deletérios sobre os fibroblastos gengivais humanos, o que sugere um papel negativo destes dois compostos na manutenção, integridade e remodelação do tecido conjuntivo da cavidade oral.

CAPÍTULO II

EFEITO DA NICOTINA NO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS CULTIVADAS EM IMPLANTES DE TITÂNIO



PUBLICAÇÃO I

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

Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária
e Cirurgia Maxilofacial 2005; Volume 46: 81-91.

INVESTIGAÇÃO

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

Maria de Lurdes Lobo Pereira*, Maria Adelina Costa**,

João F.C. Carvalho***, Maria Helena Raposo Fernandes****

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)

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

** Professora do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

*** Professor de Cirurgia Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

**** 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⁽¹⁾. No que diz respeito ao tecido ósseo, o tabagismo parece ser um factor de risco na osteoporose^(2,3), na incidência de fractura óssea⁽⁴⁾ e no prolongamento do tempo de cicatrização^(5,6).

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⁽⁷⁻⁹⁾. A nicotina é absorvida através da pele e membranas mucosas do tracto respiratório e cavidade oral⁽¹⁾ e os níveis plasmáticos, no fumador médio, oscilam entre 15 e 75 ng/ml⁽¹⁰⁾. 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 vaso-constricção, com alteração na angiogénese e na irrigação dos tecidos⁽⁷⁻⁹⁾, diminuição da tensão do oxigénio⁽¹¹⁾ e alteração da resposta imunitária^(11,12,13). Estão também descritos efeitos a nível da adesão, proliferação e diferenciação das células ósseas⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

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⁽¹⁸⁾. 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⁽⁹⁾. 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⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. 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⁽¹⁹⁻²¹⁾, mobilidade dentária e perda dentária precoce⁽²²⁾, reabsorção da crista alveolar^(21,22), atraso na cicatrização da ferida pós-extração dentária⁽²³⁾, incidência de osso tipo IV(24), doença periodontal^(25,26), morbilidade em enxertos ósseos⁽⁹⁾ e falência na osteointegração de implantes⁽²⁷⁾. 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⁽¹⁹⁻²²⁾.

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⁽²⁸⁾. 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⁽²⁹⁾. 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⁽³⁰⁾. 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^(23,31). 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 cm² (Corning 3055) com "α-Minimum Essential Medium" (Gibco BRL 12000-097), contendo soro bovino fetal (10%, Gibco 10108 -165), gentamicina (50 µg/ml, Gibco 15710-049), penicilina-estreptomicina (100 IU/ml e 100 µg/ml, respectivamente, Gibco 15140-114) e anfotericina B (2,5 µg/ml, Gibco 15290-026) e incubado à temperatura de 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.

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 10⁴ células/cm² 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⁽³⁰⁾.

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.

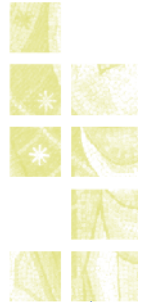
Depois de fixadas, as culturas foram lavadas com água destilada e coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina. Para isso, foram incubadas, no escuro, durante uma hora com uma solução de tampão Tris a 0,1 M, pH 10 (Sigma 8534) contendo α-naftil fosfato de sódio (Sigma N-7255) e "fast 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



Pereira MLL et al

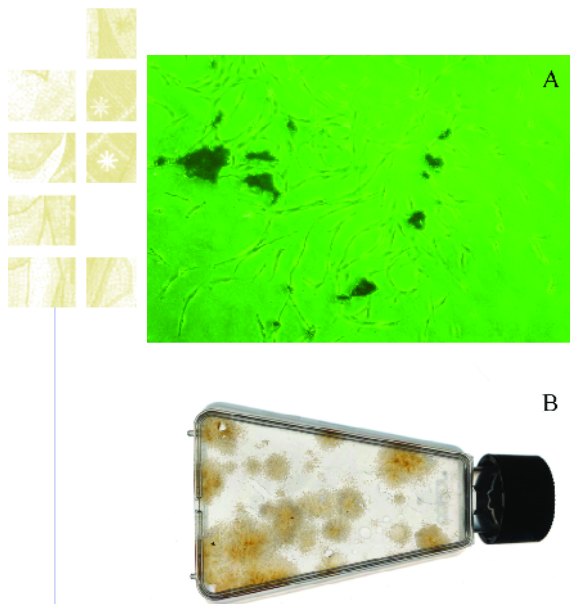


Figura 1 - Aspecto de uma cultura primária de osso alveolar humano.

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

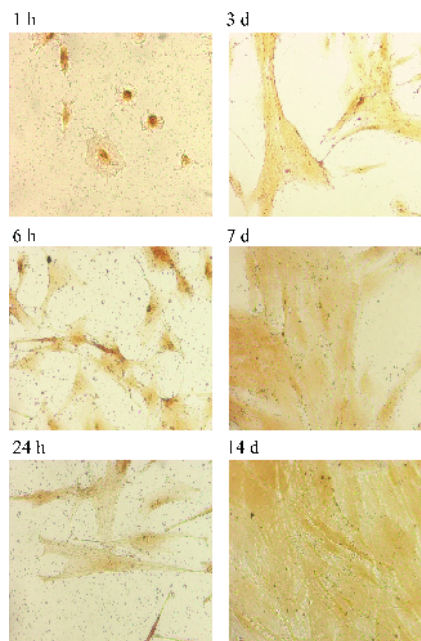


Figura 2 - Comportamento de uma cultura celular de osso alveolar humano (1ª subcultura) durante a adesão ao substrato de cultura (1, 6 e 24 horas) e ao longo do período de incubação (3, 7 e 14 dias). Microfotografias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x.

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

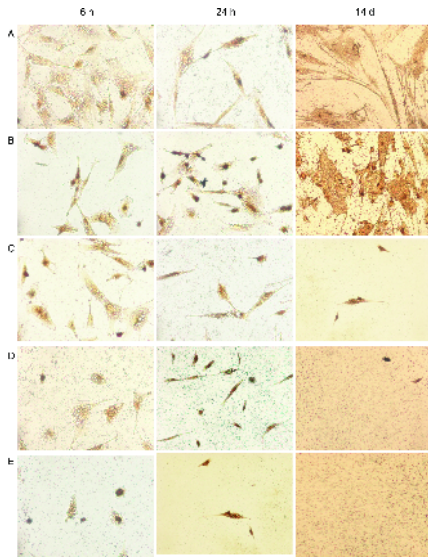


Figura 3 - Efeito da nicotina em culturas celulares de osso alveolar humano – exposição durante todo o período de cultura (dia 0 ao dia 14). Microfoto-grafias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x; 6 horas, 24 horas e 14 dias. A - 0,2 mg/ml; B - 0,3 mg/ml;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

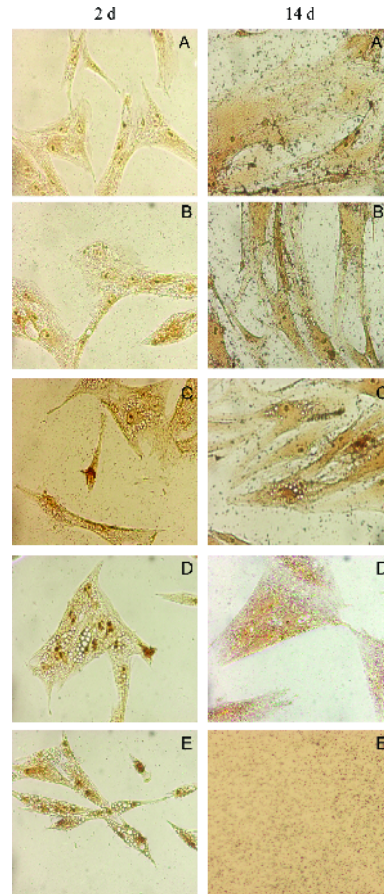
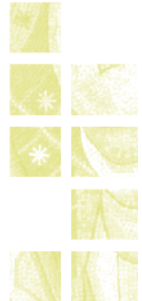
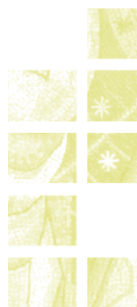


Figura 4 - Efeito da nicotina em culturas celulares de osso alveolar humano – exposição após o processo de adesão celular (dia 1 ao dia 14). Microfoto-grafias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina, 200x; 2 dias (24 horas de exposição) e 14 dias. A - 0,2mg/ml; B -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



Pereira MLL et al



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 confluyente 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 coloração 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.

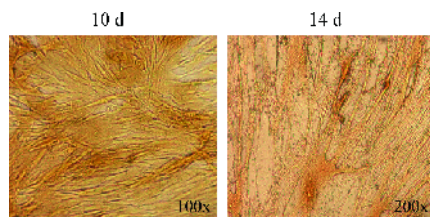


Figura 5 - Efeito da nicotina - 0,5 mg/ml - em culturas celulares de osso alveolar humano - exposição após a fase de confluência (dia 10 ao dia 14). Microfotografias de culturas coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina; 10 dias (antes da exposição) e 14 dias (4 dias de exposição).

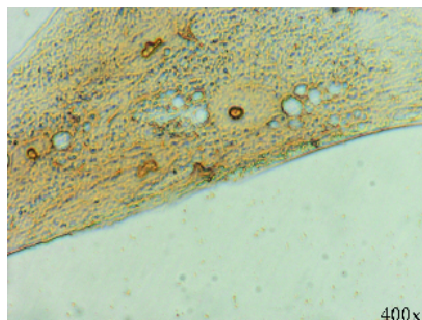


Figura 6 - Pormenor da morfologia de uma célula de osso alveolar humano exposta a 0,5 mg/ml de nicotina após o processo de adesão (dia 1 ao dia 5). Microfotografia de uma cultura corada histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina; 5 dias (4 dias de exposição).

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⁽³⁰⁾. A nicotina é uma substância lipofílica e, como tal, é absorvida através da mucosa oral, exercendo vários efeitos a nível sistémico⁽¹⁾. 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⁽³²⁻³⁹⁾. 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)⁽⁴⁰⁾ e processos pós-cirúrgicos que possibilitam a acessibilidade ao tecido ósseo, o que se verifica após uma extracção dentária^(23,31) e, também, quando da colocação de implantes⁽⁴¹⁾. 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⁽⁴²⁾.

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⁽¹⁹⁻²²⁾.

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⁽¹⁸⁾. 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⁽⁴³⁾. 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⁽⁴⁴⁾.

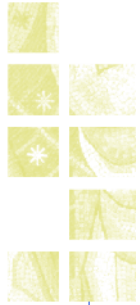
As células ósseas são células aderentes e, assim, a adesão ao substrato (in vivo, uma superfície óssea pré-existente; in vitro, a superfície de cultura) constitui um pré-requisito para a proliferação e diferenciação normais^(44,45). Durante este processo observa-se a reorganização do citoesqueleto, estrutura 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^(46,47). 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⁽⁴⁸⁾. Na fase de crescimento activo, as células têm uma elevada actividade metabólica, sendo muito susceptíveis ao efeito de substâncias activas⁽¹⁸⁾. 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⁽⁴⁴⁾. 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⁽¹⁸⁾.

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⁽⁴⁸⁾. 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^(33,34,49), macrófagos⁽⁵⁰⁾ e células osteoblásticas provenientes de calvária de embrião de pinto⁽¹⁹⁾. 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⁽¹⁹⁾. 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⁽⁴⁹⁾. 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⁽³⁴⁾. 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^(14,38).

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.

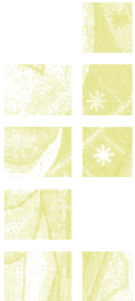
AGRADECIMENTOS

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

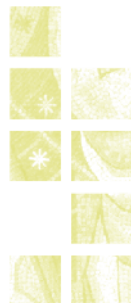
O trabalho experimental foi efectuado no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

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, MacCarey 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, Santacroce 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 integrin 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.



PUBLICAÇÃO II

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

Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária
e Cirurgia Maxilofacial 2006; Volume 47: 79-90

INVESTIGAÇÃO

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⁽⁴⁻⁶⁾ 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⁽⁶⁾. 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, noutra 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 mascaradores 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 mascaradores 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

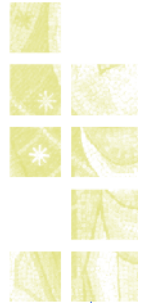
As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de osso alveolar humano resultante de procedimentos cirúrgicos na cavidade oral. A cultura primária foi obtida pela técnica de explante⁽³⁷⁾. O osso alveolar foi cortado em pequenos fragmentos que foram cultivados em frascos de 25 cm² 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⁽³⁸⁾, 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

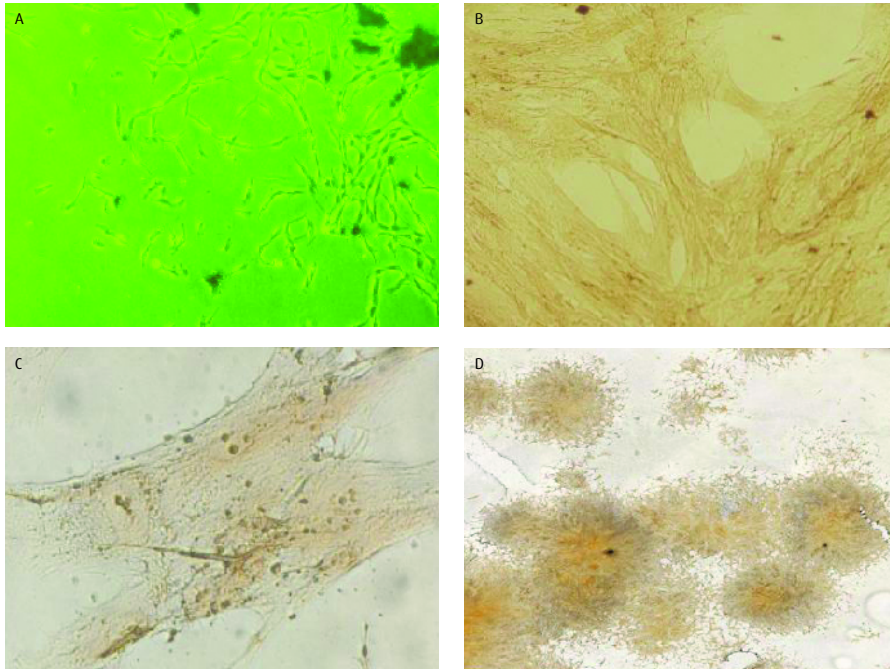


Figura 1 - Aspecto morfológico de uma cultura primária de osso alveolar humano. Células em cultura (ausência de coloração): A - cultura com 15 dias (40x). Culturas coradas para presença de fosfatase alcalina: B - 15 dias (100x); C - 15 dias (200x); D - 28 dias (aspecto macroscópico).

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.

Pereira MLL et al

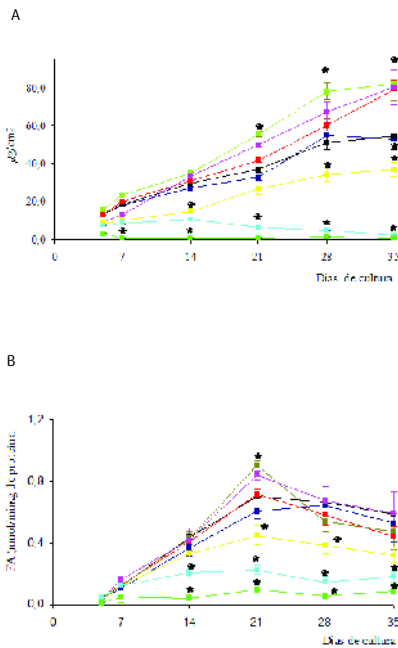
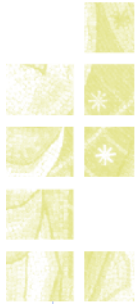


Figura 2 - Efeito da nicotina no conteúdo em proteína total (A) e actividade de fosfatase alcalina (B) de culturas celulares de osso alveolar humano. Situação controlo (●). Presença de nicotina: 0,05 (■); 0,1 (▲); 0,2 (◆); 0,3 (■); 0,4 (●); 0,5 (■) e 1 (■) mg/ml. *Significativamente diferente da situação 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 2ª e 3ª 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 3ª semana de cultura e os valores máximos foram observados por volta do dia 21. A partir da 4ª 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 (reação da Alizarina vermelha, AV) e de depósitos de fosfato (reação 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.

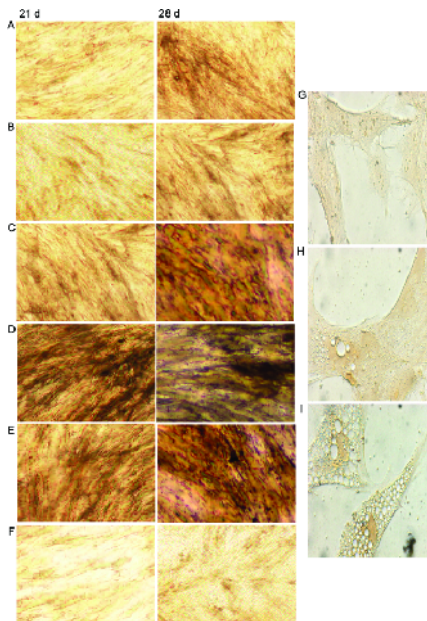


Figura 3 - Aspecto de culturas celulares de osso alveolar humano coradas histoquimicamente para a presença da fosfatase alcalina. A-F) Culturas com 21 e 28 dias, 40x. Cultura controlo (A) e culturas expostas a 0,05 (B), 0,1 (C), 0,2 (D), 0,3 (E) e 0,4 (F) mg/ml de nicotina. G-I) Culturas com 7 dias,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

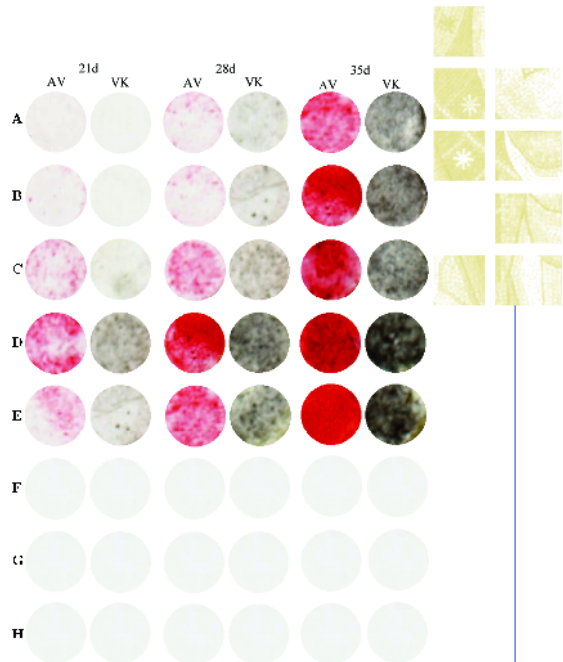


Figura 4 - Efeito da nicotina na capacidade de formação de uma matriz mineralizada em culturas de osso alveolar humano. Aspecto macroscópico de culturas celulares com 21, 28 e 35 dias, coradas histoquimicamente para a visualização de depósitos de cálcio (AV - Alizarina vermelha) e depósitos de fosfato (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.

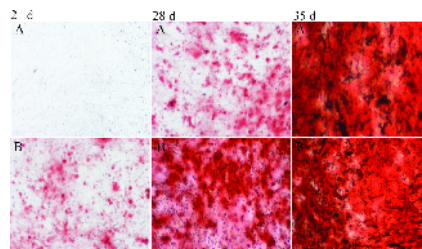
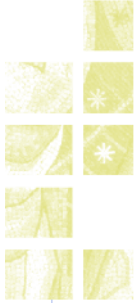


Figura 5 - Aspecto microscópico de culturas celulares de osso alveolar humano com 21, 28 e 35 dias, coradas histoquimicamente para a presença de depósitos de cálcio (reação de Alizarina vermelha). Culturas controlo (A) e culturas expostas a 0,2 mg/ml de nicotina (B).

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^(9,133). 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⁽⁴⁹⁾.

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⁽⁷¹⁾. 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)⁽⁹⁹⁾. 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

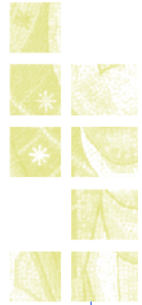
semelhante ao observado na proliferação celular. Assim, verificou-se um efeito positivo na actividade da enzima para concentrações de 0,05 a 0,3 mg/ml, com tendência para se observar os níveis máximos mais precocemente que na situação controlo (por volta do dia 21). De acordo com este padrão de síntese 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⁽⁴⁵⁾. 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⁽⁴⁹⁾. 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)⁽⁴⁹⁾. 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



Pereira MLL *et al*



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

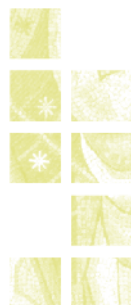
Este trabalho foi financiado pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e pelo Conselho de Prevenção do Tabagismo, no âmbito de um protocolo de investigação entre as duas instituições.

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



Pereira MLL et al



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 T J, eds. *Hanbook 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

PUBLICAÇÃO III

Proliferação e diferenciação de células osteoblásticas de medula óssea humana na presença de níveis sanguíneos e salivares de nicotina

Arquivos de Medicina 2007; 21 (1): 3-14

Tabagismo e Diferenciação Óssea: Efeito de Níveis Sanguíneos e Salivares de Nicotina no Comportamento de Células Osteoblásticas de Medula Óssea Humana. Estudo *in vitro*.

Maria de Lurdes Pereira*, João da Costa Carvalho*, Fernando Martins Peres*, Manuel Gutierrez†, Maria Helena Fernandes*

*Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto;

†Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Os hábitos tabágicos constituem um factor de risco para patologias crónicas que envolvem o tecido ósseo como a osteoporose e a perda óssea alveolar associada à doença periodontal. O processo de formação óssea envolve a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos e a formação de uma matrix colagenosa mineralizada. Assim, o objectivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento de células osteoblásticas provenientes de medula óssea humana na presença de concentrações de nicotina representativas dos níveis sanguíneos e salivares presentes nos indivíduos com hábitos tabágicos.

As culturas celulares foram mantidas durante 28 dias em condições experimentais que favorecem a diferenciação do fenótipo osteoblástico e cultivadas na ausência (situação controlo) e na presença de nicotina (10 ng/ml - 1 mg/ml). A exposição a 10 ng/ml (concentração representativa dos níveis plasmáticos) não afectou significativamente a proliferação e actividade funcional. A presença de concentrações superiores (0,01 - 1 mg/ml, representativas dos níveis salivares) influenciou o comportamento celular, de modo dependente da dose. As culturas expostas a 0,01 - 0,2 mg/ml apresentaram estimulação da proliferação celular e da actividade de fosfatase alcalina, associada a uma antecipação do processo de mineralização da matriz extracelular. A exposição a 0,3 mg/ml causou um efeito inibitório inicial, seguido de recuperação dos parâmetros de crescimento e função. Na presença de concentrações superiores, observaram-se efeitos negativos no comportamento celular durante todo o período de incubação; as culturas apresentaram uma diminuição do número de células aderentes, níveis de fosfatase alcalina baixos e extensa vacuolização citoplasmática.

Os resultados sugerem a possibilidade de modulação local da actividade osteoblástica pela nicotina, a nível da cavidade oral.

Palavras-chave: nicotina; culturas celulares de medula óssea humana; proliferação celular; diferenciação celular.

ARQUIVOS DE MEDICINA, 21(1):3-14

INTRODUÇÃO

O tabagismo constitui um factor de risco em patologias crónicas que envolvem o tecido ósseo como a osteoporose (1) e a perda óssea alveolar associada à doença periodontal (2-4).

A osteoporose é uma doença sistémica que se acompanha de diminuição da densidade mineral óssea, fragilidade óssea e risco aumentado de fracturas (1). A associação da osteoporose com os hábitos tabágicos está descrita tanto nos homens como nas mulheres e parece afectar todas as faixas etárias, estando disponíveis na literatura estudos que documentam o efeito negativo no conteúdo mineral (5-8). Há também uma grande variedade de estudos que evidenciam os efeitos nefastos do

tabagismo a nível da perda óssea alveolar associada com a doença periodontal. Destacam-se alguns estudos prospectivos de longa duração, nomeadamente efectuados ao longo de 10 anos (9,10) e de vinte anos (11), que concluíram que os fumadores apresentavam aumento de prevalência de doença periodontal e de perda de osso alveolar. Também, relacionado com os efeitos crónicos do tabagismo no tecido ósseo oral, está descrito que os fumadores apresentam um risco acrescido de incidência de osso tipo IV (12), morbidade em enxertos ósseos (13) e falência na osteointegração de implantes (12,14).

O mecanismo pelo qual o tabagismo influencia o tecido ósseo é complexo e não está completamente esclarecido. O fumo do tabaco contém mais de 4000 compostos, muitos dos quais são rapidamente absorvidos

e apresentam actividade biológica nos vários tecidos e órgãos. A nicotina existe em quantidade apreciável no fumo do tabaco e tem sido a substância mais estudada na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos nefastos do tabagismo a nível do tecido ósseo. É rapidamente absorvida e tem uma distribuição ampla no organismo devido ao seu carácter lipofílico (15), encontrando-se presente no plasma em concentrações que variam entre 4 e 75 ng/ml (16). A nicotina apresenta uma ampla gama de acções farmacológicas, sendo a vasoconstrição o efeito mais característico (15). A diminuição do fluxo sanguíneo tem repercussões a nível geral e local e influencia de modo mais significativo os processos biológicos com maior actividade metabólica. Assim, estão descritos efeitos negativos da nicotina a nível da resposta imunitária (17,18) e na angiogénese e revascularização (19,20), aspectos que podem afectar de modo indirecto a actividade metabólica a nível do microambiente ósseo. Há vários estudos *in vitro* que mostram que a nicotina/extractos do fumo de tabaco afectam o comportamento de células sanguíneas (17,18), células epiteliais (21), fibroblastos gengivais e periodontais (21-23) e células ósseas (24-29).

A nível da cavidade oral, os componentes do fumo do tabaco podem também provocar um efeito local nas células e estruturas orais. Este aspecto assume particular importância tendo em consideração que, nos fluidos orais, a nicotina atinge concentrações muito mais elevadas que as observadas no plasma. Assim, no fluido crevicular, os níveis podem atingir 5961 ng/ml (30) e na saliva variam entre 96 ng/ml e 1,6 mg/ml (23). Deste modo, o epitélio oral está sujeito a um efeito citotóxico directo devido à exposição imediata à nicotina e outros componentes do fumo do tabaco presentes na fase gasosa e na saliva. O aumento da fragilidade do epitélio oral facilita a difusão destas substâncias para os tecidos periodontais subjacentes, nomeadamente a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar. Relativamente a este aspecto, é interessante referir que o efeito citotóxico local parece ser o principal responsável pela deterioração da saúde periodontal que se observa nos fumadores e que se manifesta por mobilidade dentária e perda óssea alveolar (2,3). De salientar, ainda, que este efeito directo pode tornar-se progressivamente mais significativo à medida que aumenta a gravidade das lesões periodontais devido à maior facilidade de contacto dos fluidos orais com os tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar.

O tecido ósseo possui uma elevada actividade metabólica, sendo deste modo muito sensível às características do meio circundante, nomeadamente a presença de substâncias exógenas bioactivas. O processo de formação óssea envolve o recrutamento e migração de pré-osteoblastos, a sua diferenciação em osteoblastos, e a formação de uma matriz óssea mineralizada. O presente trabalho tem como objectivo a caracterização *in vitro* do efeito da nicotina no processo de diferenciação de células de linhagem osteoblástica provenientes de medula óssea humana. O comportamento celular foi estudado na presença de uma gama de concentrações

de nicotina representativa dos níveis presentes no plasma e saliva de consumidores de tabaco e avaliado relativamente à morfologia, proliferação, conteúdo em proteína total, actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, o evento que reflecte a diferenciação completa do fenótipo osteoblástico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados na manutenção e caracterização das culturas celulares foram da marca Sigma (St. Louis), e Gibco BRL (Nova Zelândia). O material descartável utilizado foi da marca Costar (USA).

Os reagentes utilizados apresentaram um grau de pureza superior a 98%.

Obtenção e manutenção das culturas celulares

As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de medula óssea humana obtida de procedimentos cirúrgicos ortopédicos. Este material biológico, que de outra forma seria desperdiçado, foi recolhido após consentimento informado do paciente e autorização para a realização do estudo.

Os pacientes tinham idades compreendidas entre os 30 e 45 anos, e não apresentavam qualquer patologia ou efectuavam terapêuticas relacionadas com o metabolismo ósseo. A medula óssea foi cultivada em α -Minimal Essential Medium (α -MEM), contendo 10% soro bovino fetal, ácido ascórbico (50 μ g/ml), penicilina-estreptomicina (100 IU/ml e 10.000 μ g/ml, respectivamente) e anfotericina B (2,5 μ g/ml). As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida de 95% de ar e 5% de CO₂, e o meio de cultura foi renovado duas vezes por semana.

A cultura primária foi mantida até próximo da confluência (10 a 15 dias). As células aderentes foram libertadas enzimaticamente e a suspensão celular foi cultivada (10⁴ células/cm²), durante 28 dias, na ausência (culturas controlo) e na presença de nicotina - 10 ng/ml a 1 mg/ml (0,00006 mM a 6 mM). A nicotina, (-)-Nicotine [-]-1 metil-2-3-pirrolidina, foi adicionada após se verificar o processo de adesão celular (culturas de 24 horas) e esteve presente durante todo o tempo de cultura, sendo renovada em cada mudança de meio (3 vezes por semana). As condições experimentais foram semelhantes às descritas para a cultura primária, mas o meio de cultura foi suplementado com β -glicerofosfato de sódio (10 mM) e dexametasona (10 nM). As culturas controlo e as culturas expostas à nicotina foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21 e 28 para avaliação da proliferação celular e actividade funcional.

Morfologia celular

As células em cultura foram observadas diariamente por microscopia de contraste de fase. Após fixação, foram submetidas a marcação fluorescente dos filamentos

de actina e dos núcleos e observadas por microscopia confocal (Laser Scanning Confocal Microscope Leica SP2 AOBSE - Leica Microsystems, Germany). Este método utiliza um scan pontual emitido por um laser e focado pela objectiva. A detecção dos pontos de luz é realizada por um tubo fotomultiplicador que, através de um sistema computadorizado, é responsável pela formação da imagem.

Proliferação e viabilidade celular. Conteúdo em proteína total

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o MTT (0,5 mg/ml, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), com a formação de cristais de cor púrpura que se acumulam no citoplasma. Após dissolução com DMSO (dimetilsulfóxido), a absorbância (A) da solução foi determinada a 600 nm. O conteúdo em proteína total foi avaliado pelo método de Lowry (31), após remoção do meio de cultura, lavagem com tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e tratamento da camada celular com 0,1 M de NaOH.

Síntese de fosfatase alcalina

A actividade da fosfatase alcalina foi determinada em lisados da camada celular, pela hidrólise do *p*-nitrofenil-fosfato e determinação espectrofotométrica do *p*-nitrofenol formado ($\lambda = 405$ nm). A actividade enzimática foi expressa em nmol de substrato metabolizado por minuto e por μg de proteína (nmol/min/ μg proteína), deste modo, normalizada em termos de proliferação celular.

A presença de fosfatase alcalina nas culturas celulares fixadas foi visualizada por coloração histoquímica. O método utilizado baseou-se na hidrólise do naftil fosfato de sódio pela fosfatase alcalina e precipitação do fosfato libertado por reacção com um composto apropriado ("Fast Blue RR salt"). A reacção positiva foi identificada por uma coloração que variou entre o amarelo acastanhado e o preto, dependendo da actividade da enzima.

Mineralização da matriz extracelular

A formação de uma matriz extracelular mineralizada foi avaliada de modo indirecto através da variação dos níveis de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura ao longo do período de incubação e, ainda, pela identificação histoquímica de depósitos de fosfato (método de von Kossa (32)) e observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento.

Concentração de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura. O fósforo e o cálcio ionizados foram determinados por métodos colorimétricos, após tratamento do meio de cultura com ácido tricloroacético a 20% para precipitar o fósforo e o cálcio ligados às proteínas e aos lípidos. Os resultados foram expressos em mmol por litro de meio (mmol/L).

Método de von Kossa. Em culturas fixadas, o fosfato

de cálcio presente na matriz extracelular origina fosfato de prata, na presença de nitrato de prata a 1%. O fosfato de prata é, seguidamente, reduzido pela radiação ultravioleta, libertando-se prata metálica que é visível pelo aparecimento de depósitos negros na matriz.

Microscopia electrónica de varrimento. Após fixação, as culturas celulares foram desidratadas com álcool etílico de graduação crescente, submetidas a secagem utilizando o sistema de ponto crítico de CO_2 , cobertas com um filme de ouro e observadas num microscópio electrónico de varrimento (Jeol JSM 6301F9, Japão). Este método utiliza o "varrimento" de um feixe de electrões sobre a amostra originando imagens da superfície, por emissão de electrões a partir da amostra. A associação com um espectrofotómetro de raios X permite efectuar uma análise química da amostra.

Análise estatística

Foram efectuadas quatro experiências independentes, sendo as culturas celulares estabelecidas a partir de material biológico proveniente de pacientes diferentes. 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. Em cada experiência, foram efectuadas 6 réplicas nos ensaios quantitativos e três réplicas nos ensaios qualitativos. Apresentam-se os resultados de uma experiência considerada representativa.

Os resultados bioquímicos são apresentados como média \pm desvio padrão. As médias obtidas nas várias experiências foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA) não se observando diferenças significativas entre as experiências realizadas. Em cada experiência, as diferenças observadas entre as culturas controlo e as culturas expostas à nicotina foram determinadas pelo método de Bonferroni e o nível de significância adoptado foi de 95%.

RESULTADOS

Efeito da nicotina na morfologia celular

As células de medula óssea em cultura apresentaram um aspecto alongado com prolongamentos citoplasmáticos, núcleo proeminente (com nucléolos evidentes) e membrana celular rica em fosfatase alcalina. Observou-se uma elevada taxa de proliferação celular, com a ocupação da superfície de cultura após cerca de uma semana. O efeito mais característico da nicotina na morfologia celular foi a presença de vacuolização citoplasmática e aumento do tamanho celular para concentrações superiores a 0,2 mg/ml. Este efeito foi evidente nas culturas expostas a 0,3 mg/ml durante a 1ª semana, mas diminuiu significativamente para tempos de incubação mais longos. No entanto, na presença de níveis mais elevados, a vacuolização citoplasmática foi permanente e dependente da dose. A exposição a 0,5 e 1 mg/ml resultou num efeito citotóxico

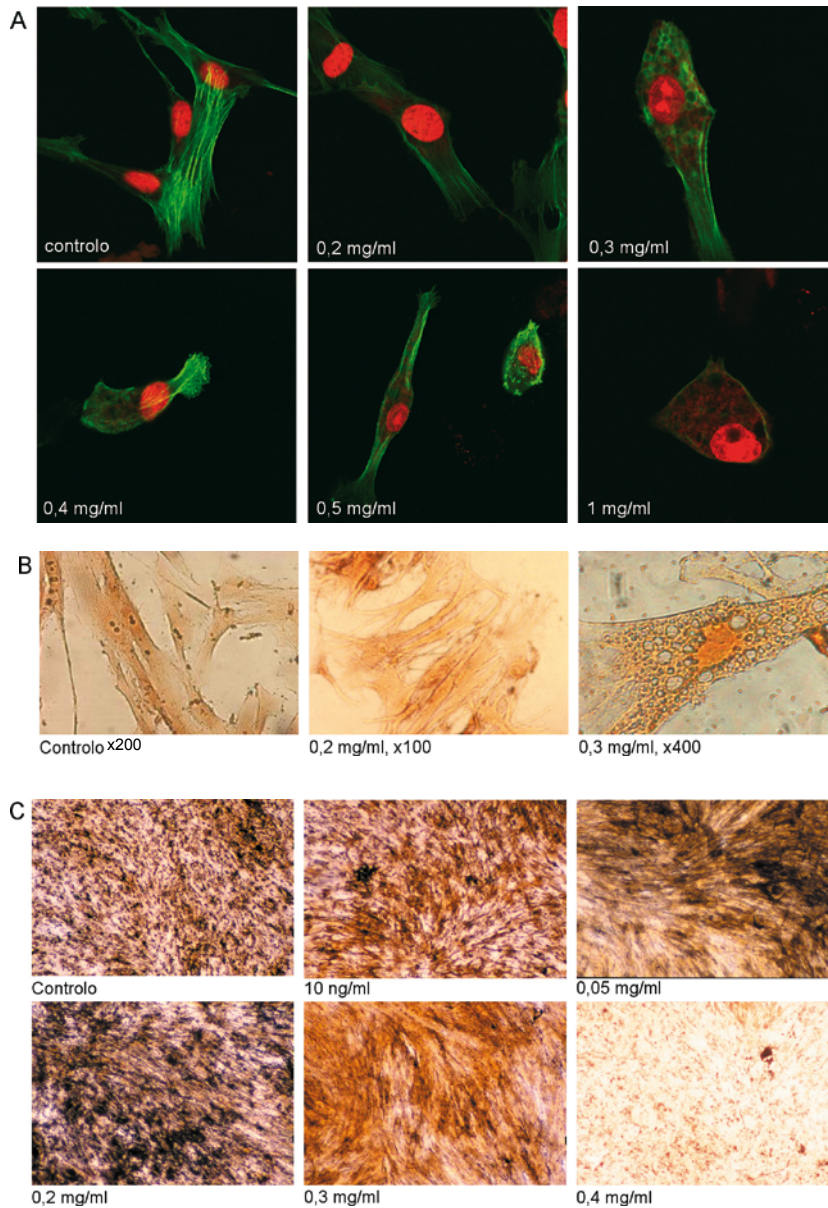


Fig. 1 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1 mg/ml) na morfologia de células osteoblásticas de medula óssea humana.

A - Marcação fluorescente do citoesqueleto e núcleos. Microscopia confocal, 3 dias, x800.

B - Coloração histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia óptica, 3 dias.

C - Coloração histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia óptica, 14 dias, x40.

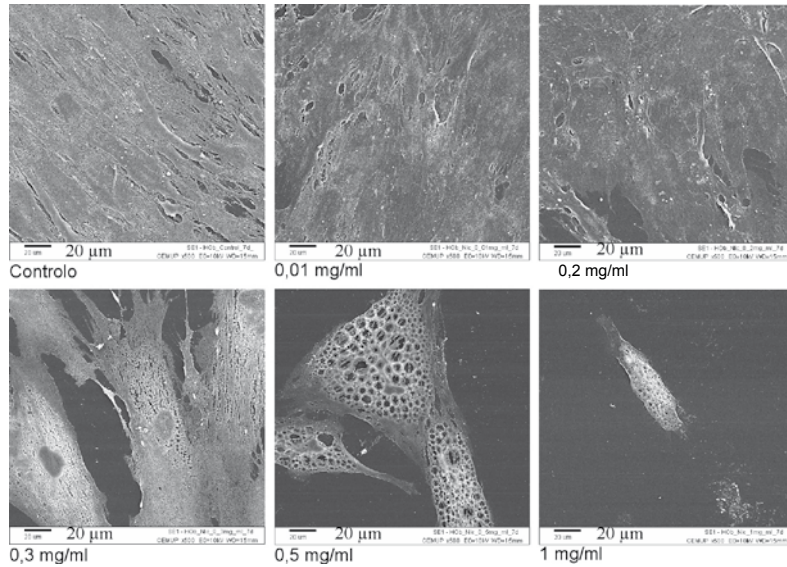


Fig. 2 - Efeito da nicotina (0,01 - 1 mg/ml) na morfologia de células osteoblásticas de medula óssea humana. Microscopia electrónica de varrimento, 7 dias.

muito significativo que se traduziu por uma morfologia muito alterada, com vacuolização e retração do citoplasma, arredondamento e destacamento da superfície de cultura, seguido de morte celular. As Figs. 1 e 2 são representativas do comportamento descrito.

Efeito da nicotina na proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina

As células de medula óssea proliferaram de forma gradual ao longo de todo o tempo de cultura. A exposição à nicotina traduziu-se por ausência de efeitos significativos na gama 10 ng/ml a 0,05 mg/ml, estimulação na presença

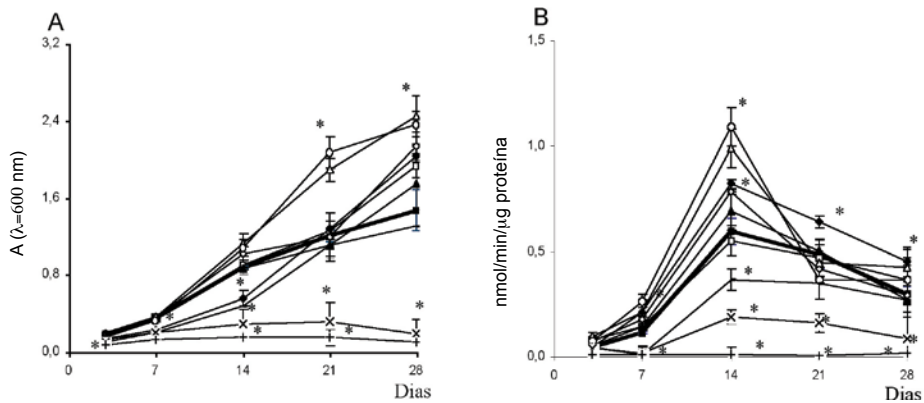


Fig. 3 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1mg/ml) na proliferação/viabilidade celular (A, ensaio do MTT) e actividade de fosfatase alcalina (B) de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana.

Culturas controlo (■). Culturas expostas à nicotina: 10 ng/ml (□), 0,01 mg/ml (▲), 0,05 mg/ml (◊), 0,1 mg/ml (△), 0,2 mg/ml (o), 0,3 mg/ml (◆), 0,4 mg/ml (-), 0,5 mg/ml (x) e 1 mg/ml (+).

*Significativamente diferente da situação de controlo.

de 0,1 e 0,2 mg/ml, efeito inibitório inicial seguido de recuperação durante a exposição a 0,3 e 0,4 mg/ml e diminuição significativa do número de células em cultura após tratamento com 0,5 e 1 mg/ml. Estes resultados mostram-se na Fig. 3A. O conteúdo em proteína total seguiu um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT, providenciando o mesmo tipo de informação.

As culturas controlo apresentaram níveis de fosfatase alcalina relativamente baixos durante a 1ª semana, mas a actividade enzimática aumentou significativamente durante a 2ª semana, observando-se o valor máximo na proximidade do dia 14. Seguidamente, verificou-se uma diminuição significativa dos níveis enzimáticos. A exposição a concentrações de nicotina de 0,01 a 0,3 mg/ml resultou num aumento significativo da actividade de fosfatase alcalina. A presença de níveis superiores (0,4 a 1 mg/ml) causou um efeito inibitório dependente da dose. A Fig. 3B mostra os resultados descritos.

A coloração histoquímica das culturas (Fig. 1C) mostrou que as células osteoblásticas apresentaram um padrão de crescimento característico, com a formação de áreas de maior densidade celular que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação e coraram mais intensamente para a presença de fosfatase alcalina. A exposição à nicotina resultou num comportamento semelhante ao descrito relativamente à avaliação bioquímica da actividade enzimática.

Efeito da nicotina na mineralização da matriz

Concentração de fósforo ionizado (Pi) e cálcio ionizado (Cai) no meio de cultura

O Pi e o Cai presentes no meio de cultura (aproximadamente 2 e 1,8 mmol/L, respectivamente) têm origem em compostos de fosfato e cálcio presentes no α -MEM e no soro bovino fetal. Além disso, o β -glicerofosfato adicionado ao meio (10 mmol/L) é uma fonte de Pi, após ter sido hidrolisado pela fosfatase alcalina presente nas culturas celulares. O consumo de Pi e Cai a partir do meio de cultura reflecte o processo de mineralização, nomeadamente a formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular. Neste trabalho, os níveis de Pi e Cai determinados não são cumulativos, pois o meio de cultura foi totalmente substituído em cada mudança de meio. Deste modo, reflectem alterações observadas em intervalos de 2 - 3 dias ao longo do tempo de cultura, providenciando informação sobre a taxa de deposição mineral.

As culturas controlo apresentaram um aumento significativo dos níveis de Pi durante a 2ª semana de cultura, comportamento que reflecte a actividade elevada de fosfatase alcalina nesta fase. Na proximidade do dia 14, observou-se uma diminuição da concentração de Pi. Os níveis de Cai mantiveram-se aproximadamente constantes durante as duas primeiras semanas, mas diminuíram significativamente durante a 3ª semana. Estes resultados sugerem que o processo de deposição

de fosfato de cálcio se iniciou na proximidade do dia 14 e ocorreu a uma taxa elevada. A nicotina, em concentrações $\leq 0,3$ mg/ml, causou um aumento dos níveis máximos de Pi, particularmente na presença de 0,1 e 0,2 mg/ml; este comportamento é previsível tendo em atenção a estimulação da actividade da fosfatase alcalina nestas situações. O padrão de variação dos níveis de Pi e Cai sugere uma deposição mineral mais precoce nas culturas expostas a concentrações $\leq 0,2$ mg/ml. Níveis superiores causaram um efeito inibitório que se reflectiu por uma taxa de deposição mineral muito baixa nas culturas expostas a 0,3 mg/ml e ausência de mineralização na presença de níveis superiores. Estes resultados são apresentados na Fig. 4A.

Coloração histoquímica e microscopia electrónica de varrimento

As culturas controlo apresentaram uma reacção histoquímica positiva para a presença de depósitos de fosfato a partir do dia 14, e a intensidade de coloração aumentou significativamente para tempos mais longos (dias 21 e 28). Na presença de nicotina, 10 ng/ml a 0,2 mg/ml, observou-se um padrão semelhante mas a intensidade de coloração foi superior, particularmente nas culturas expostas a 0,1 e 0,2 mg/ml. As culturas tratadas com 0,3 mg/ml apresentaram uma reacção levemente positiva no dia 21 e a deposição mineral aumentou seguidamente de forma gradual. Na presença de concentrações superiores, 0,4 a 1 mg/ml, as reacções histoquímicas foram negativas. A Fig. 4B mostra o aspecto das culturas no dia 21. A comparação das Figs. 1C e 4B permite concluir que a deposição mineral está intimamente associada com as zonas que apresentam maior densidade celular e actividade de fosfatase alcalina mais elevada.

A observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento permitiu a confirmação dos resultados descritos (Fig. 5). No dia 14, as culturas controlo mostraram a presença de estruturas globulares mineralizadas em estreita associação com a camada celular, particularmente com a parte fibrosa. Na presença de nicotina, na gama de concentrações de 10 ng/ml a 0,2 mg/ml, observou-se maior abundância de estruturas mineralizadas. Esta diferença esbateu-se para tempos de incubação mais longos (dias 21 e 28). As culturas expostas a 0,3 mg/ml apresentaram, no dia 14, alguns depósitos minerais que aumentaram ligeiramente de tamanho durante o restante período de incubação. Na presença de concentrações mais elevadas, não se verificou qualquer deposição mineral. A Fig. 6A mostra um pormenor das estruturas mineralizadas observadas nas culturas controlo e na presença de 0,3 mg/ml de nicotina. A análise destas formações por difracção de raios X (Fig. 6B) revelou uma composição química rica em cálcio e fósforo.

DISCUSSÃO

A medula óssea é um tecido rico em precursores

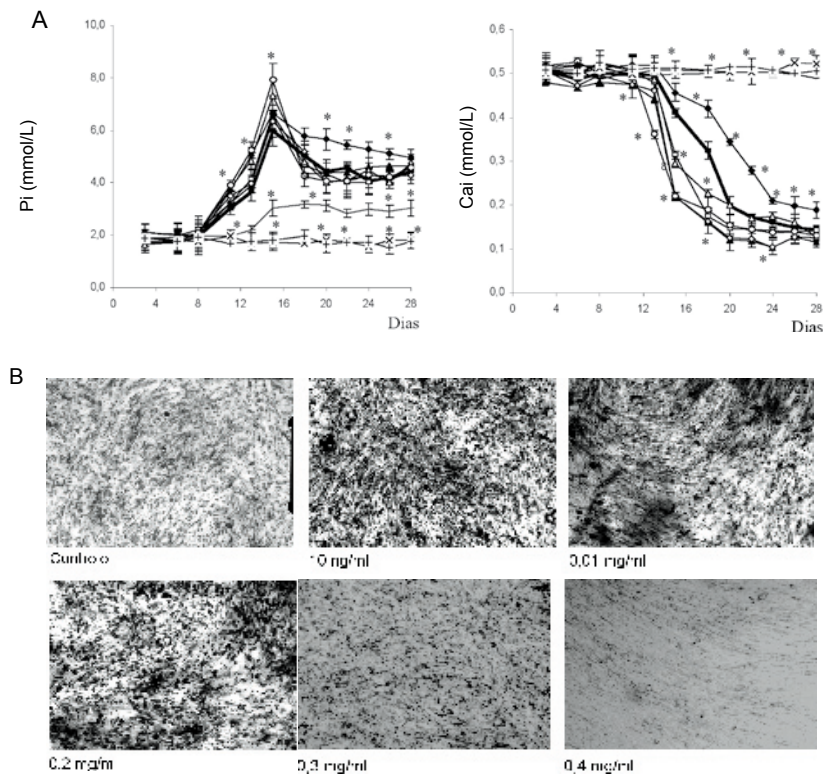


Fig. 4 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1mg/ml) na capacidade de formação de uma matriz mineralizada em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana.

A - Conteúdo de fósforo ionizado (Pi) e cálcio ionizado (Cai) no meio de cultura ao longo do período de incubação. Culturas controlo (■). Culturas expostas à nicotina: 10 ng/ml (□), 0,01 mg/ml (▲), 0,05 mg/ml (◊), 0,1 mg/ml (Δ), 0,2 mg/ml (o), 0,3 mg/ml (◆), 0,4 mg/ml (-), 0,5 mg/ml (x) e 1 mg/ml (+).

*Significativamente diferente da situação de controlo.

B - Aspecto microscópico das culturas celulares coradas histoquimicamente para a presença de depósitos de fosfato (reação de von Kossa), 21 dias x40.

osteoblásticos (33) e, no presente trabalho, as culturas celulares foram efectuadas na presença de ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona, condições que favorecem a proliferação e a diferenciação de células de linhagem osteoblástica (34,35). Os resultados descritos mostraram que as culturas celulares apresentaram uma proliferação gradual, que se acompanhou da produção de matriz extracelular abundante, aumento significativo da actividade de fosfatase alcalina durante a 2ª semana e formação de uma matriz mineralizada para tempos de incubação mais longos (essencialmente, durante a 3ª semana). Este comportamento sugere um processo de diferenciação progressivo, que é representativo do de-

envolvimento do fenótipo osteoblástico (34). O efeito da nicotina foi estudado na 1ª subcultura, devido à diminuição progressiva da expressão dos parâmetros osteoblásticos com a subcultura sucessiva (35).

A exposição de células osteoblásticas humanas a concentrações plasmáticas de nicotina (10 ng/ml) não provocou alterações significativas no comportamento celular, embora se tenha observado tendência para antecipação do processo de mineralização. A presença de níveis salivares \leq 0,2 mg/ml resultou num efeito de estimulação, que se reflectiu num aumento significativo da proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina, e início mais precoce da mineralização da matriz. Em concentrações

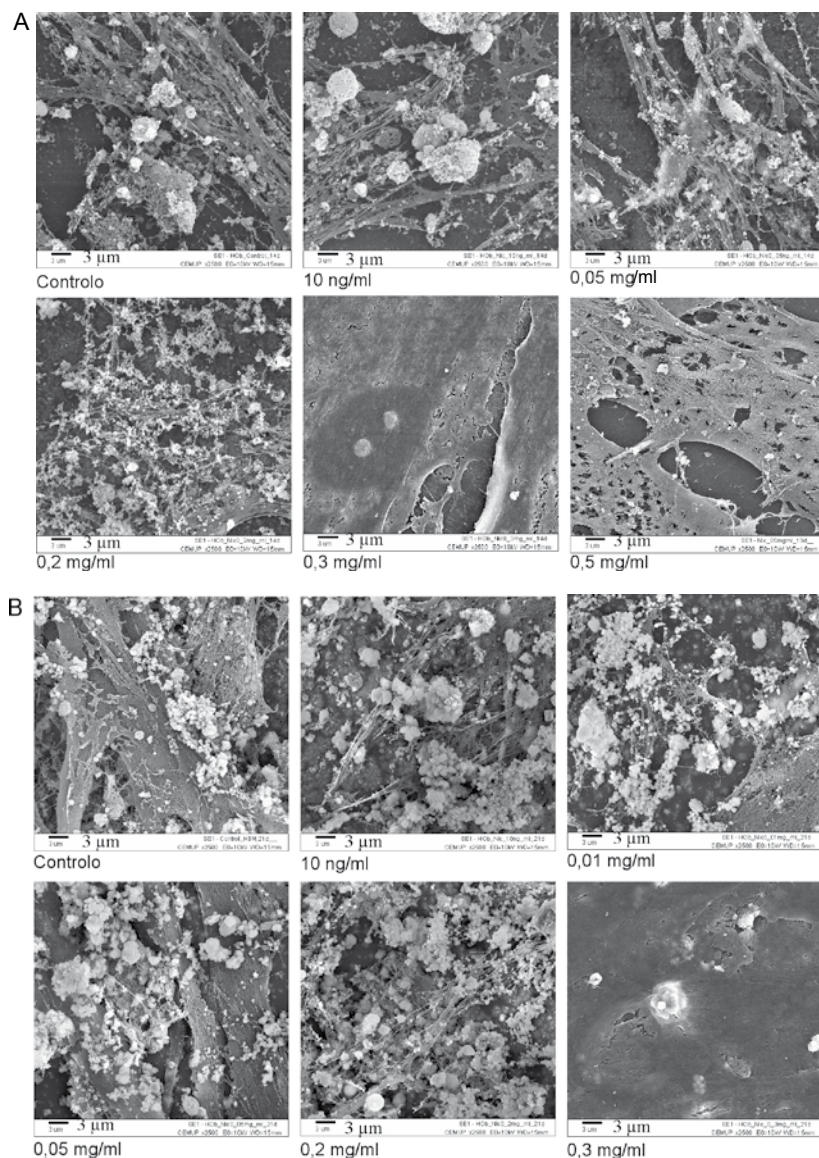


Fig. 5 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 0,5 mg/ml) na mineralização da matriz extracelular em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana. Microscopia electrónica de varrimento, 14 (A) e 21 (B) dias.

superiores, a nicotina provocou um efeito inibitório, que foi ligeiro na presença de 0,3 mg/ml (diminuição inicial da taxa de crescimento celular e deposição mineral lenta), mas significativo nas culturas expostas a níveis superiores. Na presença de 0,5 e 1 mg/ml, observou-se uma

diminuição acentuada do número de células em cultura e extensa vacuolização citoplasmática que se manteve durante todo o tempo de cultura. A nicotina é uma base fraca e o carácter lipofílico da forma não ionizada permite uma travessia fácil das membranas celulares. Acumula-

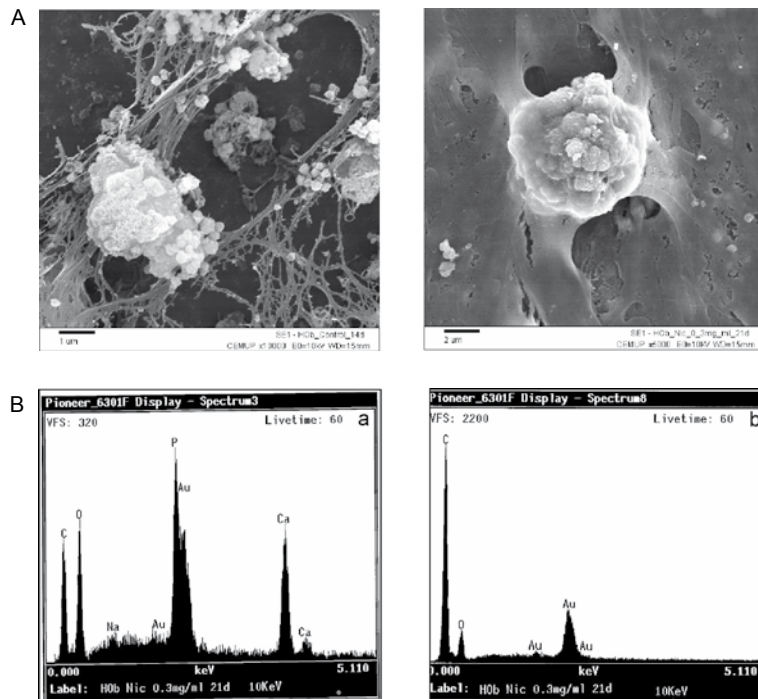


Fig. 6 - A - Pormenor do aspecto das estruturas mineralizadas observadas nas culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana na situação controlo (14 dias) e na presença de 0,3 mg/ml de nicotina (21 dias). Microscopia electrónica de varrimento.

B - Espectro de raios X representativo das estruturas mineralizadas (a) e da camada celular não mineralizada (b).

se nos lisossomas, devido ao ambiente ácido destes organelos; este processo acompanha-se da entrada de água, convertendo os lisossomas em vacúolos. O comportamento descrito é característico de substâncias básicas e foi observado por vários autores em diferentes tipos celulares (22,36,37). Chamson e col (36) sugeriram que a acumulação de nicotina nos lisossomas pode funcionar como um mecanismo protector contra os efeitos desta substância.

A proliferação das células osteoblásticas está funcionalmente associada com a síntese de uma matriz extracelular colagenosa e a sua acumulação e maturação, essenciais para o processo de mineralização, contribuem para a interrupção da proliferação celular (38). Na presença de iões fosfato (no presente trabalho, provenientes da hidrólise do β -glicerofosfato pela fosfatase alcalina), a mineralização ocorre quando se observa uma relação apropriada entre a composição e quantidade da matriz e a sua maturação (39,40). A presença de níveis elevados de fosfatase alcalina parece ser necessária para iniciar o processo de mineralização, pois providencia um enriquecimento local de fosfato inorgânico para a nucleação dos cristais de hidroxiapatite (39,40). Subsequentemente, verifica-se

a repressão da expressão da enzima, e o aumento da deposição mineral constitui um processo físico-químico que depende da disponibilidade dos iões intervenientes (39,40). O comportamento das culturas controlo observado neste trabalho está de acordo com este modelo, como é evidenciado pela ocorrência de deposição mineral nas zonas da cultura celular que apresentam reacção histoquímica mais intensa para a fosfatase alcalina e, ainda, diminuição significativa da actividade da enzima após o início do processo de mineralização. Os resultados observados na presença de nicotina sugerem que o efeito desta substância na proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina parece influenciar o início do processo de mineralização. Nas culturas expostas a níveis de nicotina $\leq 0,2$ mg/ml, o efeito de estimulação do crescimento celular foi acompanhado por um início mais precoce da deposição mineral. Este facto pode estar relacionado com uma maior taxa de acumulação de matriz extracelular, devido ao maior número de células viáveis e funcionais presentes em cultura. Também, a presença de níveis aumentados de fosfatase alcalina que se observou nesta situação providenciou uma maior disponibilidade de fosfato inorgânico, factor essencial

para o início do processo de mineralização. Durante a exposição a 0,3 mg/ml, o efeito inibitório que se verificou nas duas primeiras semanas resultou, muito provavelmente, num atraso na produção e acumulação de matriz, aspecto que pode ter contribuído para um processo de mineralização mais tardio. Na presença de 0,4 mg/ml, a diminuição na proliferação celular e o efeito inibitório na actividade de fosfatase alcalina podem explicar a ausência de mineralização da matriz.

O efeito da nicotina em células osteoblásticas tem sido pouco estudado. Resumem-se, seguidamente, os resultados descritos na literatura (24-26, 28,29). Fang e col (24) observaram um efeito inibitório na proliferação celular e estimulação da actividade de fosfatase alcalina, em culturas celulares de osteosarcoma de rato (UMR106-01) expostas a níveis de nicotina de 0,17 ng/ml a 0,17 mg/ml. Inversamente, a exposição de células derivadas de calvária de embrião de galinha à nicotina (0,05 a 0,6 mg/ml), provocou estimulação da proliferação celular e diminuição da actividade de fosfatase alcalina (25). Yahura e col (26) compararam o efeito da nicotina (0,01 a 0,25 mg/ml) em duas linhas celulares, ROB-C26 e MC3T3-E1, expostas por um período de 12 dias. As células ROB-C26 responderam com uma estimulação da actividade de fosfatase alcalina e aumento da deposição de cálcio. No entanto, nas células MC3T3-E1 observou-se diminuição da actividade de fosfatase alcalina e inibição da capacidade de formação de áreas mineralizadas em culturas expostas a 0,2 mg/ml. Walker e col, em culturas de células de osso trabecular humano expostas à nicotina, observaram estimulação da proliferação para níveis inferiores a 0,2 mg/ml e inibição na presença de concentrações mais elevadas (28). Na linha celular derivada de osteosarcoma humano Saos-2, a exposição a 0,001 M de nicotina causou uma diminuição na expressão de colagénio tipo I, fosfatase alcalina e osteopontina e, ainda, um efeito inibitório na deposição de cálcio (29). De salientar que os trabalhos descritos utilizam vários modelos celulares e condições de exposição diversas, designadamente no que diz respeito ao tempo e tipo de exposição, gama de concentrações, fase da cultura em que a exposição ocorre e parâmetros celulares avaliados. Estes aspectos explicam, pelo menos parcialmente, a diversidade de resultados descritos relativamente ao efeito da nicotina no comportamento celular e dificultam a comparação dos vários estudos.

Os mecanismos moleculares envolvidos no efeito da nicotina na proliferação e actividade funcional de células osteoblásticas não estão esclarecidos e têm sido pouco estudados. É interessante referir que Walker e col (28) mostraram que o efeito de estimulação da proliferação de células osteoblásticas derivadas de osso trabecular humano observado na presença de 0,1 a 1 µM de nicotina é acompanhado por um aumento na expressão do gene *c-fos* (responsável, juntamente com o gene *c-jun*, pela

expressão do factor de transcrição AP-1). Estes autores mostraram ainda a presença da subunidade $\alpha 4$ dos receptores nicotínicos e sugeriram o envolvimento destes receptores no efeito da nicotina, ao mostrar que o aumento da proliferação celular é inibido de modo dependente da dose pela D-tubocurarina, um antagonista dos receptores nicotínicos. Estes receptores estão directamente acoplados a canais de cálcio e a sua estimulação resulta na entrada de iões cálcio para a célula. Assim, alguns autores têm sugerido, de forma indirecta, o envolvimento deste ião na acção da nicotina (28). O ião cálcio parece ter um papel importante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo, nomeadamente o acoplamento entre a formação óssea e a reabsorção óssea (41). Há também estudos que mostram que as células osteoblásticas respondem ao ião cálcio de modo dependente do tempo e da dose, em termos de proliferação celular e expressão de marcadores de diferenciação (42).

Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que a exposição de células osteoblásticas de medula óssea humana a 10 ng/ml de nicotina, concentração representativa dos níveis plasmáticos do fumador médio, não provocou alterações significativas na proliferação e actividade funcional. No entanto, a presença de níveis superiores, 0,01 mg -1 mg/ml, na gama dos presentes na saliva dos utilizadores de tabaco, afectou o comportamento celular, de modo dependente da dose. Estes resultados sugerem a possibilidade de modulação local da actividade osteoblástica pela nicotina a nível da cavidade oral.

Agradecimentos:

Trabalho financiado pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e Conselho de Prevenção do Tabagismo. As amostras para observação por microscopia electronica de varrimento foram preparadas pelo Sr. Emanuel Monteiro

REFERÊNCIAS

- 1 - Kleerekoper M, Avioli L. Evaluation and treatment of Postmenopausal Osteoporosis. In: Favus MJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Raven Press. 1993. pp. 223-9.
- 2 - 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.
- 3 - Schuller AA, Holst D. An "S-shaped" relationship between smoking duration and alveolar bone loss: generating a hypothesis. *J Clin Periodontol* 2001; 72:1164-71.
- 4 - Heitz-Mayfield LJA. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:196-209.

- 5 - Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of major effect. *BMJ* 1997;315:841-6.
- 6 - Valimaki MJ, Kärkkäinen M, Lamberg-Allardt C, Laitinen K, Alhava E, Heikkinen J. Exercise, smoking, and calcium intake during adolescent and early adulthood as determinants of peak bone mass. *BMJ* 1994;309:230-5.
- 7 - Benson BW, Shulman JD. Inclusion of tobacco exposure as a predictive factor for decreased bone mineral content. *Nicotine and Tobacco Research* 2005;7:719-24.
- 8 - Gerdhem P, Obrant KJ. Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry and Ultrasound. *Osteoporos Int* 2002; 13:932-6.
- 9 - Bergström J. Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long term observation and a hypothesis. *Journal of Clin Periodontol* 2004;4:260-6.
- 10 - Paulander J, Wennstrom JL, Axelsson P, Lindh J. Some risk factors for periodontal bone loss in 50-year-old individuals. A 10-year cohort study. *J Clin Periodontol* 2004;7:489-96.
- 11 - Jansson L, Lavstedt S, Zimmerman M. Prediction of marginal bone loss and tooth loss - a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol* 2002;8:672-8.
- 12 - Bain CA, Moy PK. The influence of smoking on bone quality and implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:123.
- 13 - Hollinger OJ, Schmitt JM, Buck D, Hwang K. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294-301.
- 14 - Esposito M, Hirsch J, Lehholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721-64.
- 15 - Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Ann Rev Med* 1986;37:21-32.
- 16 - Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *BMJ* 1976;1:1043-6.
- 17 - Mariggiò MA, Guida L, Laforgia A, Santacroce 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.
- 18 - Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 1995;66:1047-55.
- 19 - Daftari KT, Whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, Mac-Carey BE, Hutton CW. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994;19:904-11.
- 20 - 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.
- 21 - Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndaye A, Jolkovsky DL, Webber RJ et al. Choline acetyltransferase acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 2000;79:939-49.
- 22 - Alpar B, Leyhausen G, Sapotnick A, Günay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingival fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998;2:40-6.
- 23 - 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.
- 24 - 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.
- 25 - 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.
- 26 - 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.
- 27 - Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H, Reed E, Rennard SI. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in mono-layer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med* 2001;137:208-19.
- 28 - 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.
- 29 - Tanaka H, Tanabe N, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M, Masao M et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sciences* 2005;77:2273-84.
- 30 - Cuff MJ, 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.
- 31 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-7.
- 32 - Gayle M. Bone. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone; 2002. pp.293.
- 33 - Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63-76.
- 34 - Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*. Academic Press; 1996. pp.69-86.
- 35 - Coelho MJ, Trigo Cabral A, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and DMEM. *Biomaterials* 2000;21:1087-94.
- 36 - 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.
- 37 - 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.
- 38 - Lynch M, Stein J, Stein G, Lian J. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35-44.
- 39 - Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol 107. Springer-Verlag. 1993. pp.267-98.
- 40 - Bellows CG, Aubin JE, Heersch JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphates. *Bone and Min* 1991;14:27-40.

- 41 - Bikle DD. Regulation of bone mineral homeostasis: an integrated view. In: Favus MJ, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Raven Press; 1993. pp.76-80.
- 42 - Dvorak M, Siddiqua A, Ward D, Carter D, Dallas S, Nemeth E. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calcitropic hormones. PNAS 2004;101:5140-5.

Correspondência:

Maria Helena Fernandes
Lab. Farmacologia e Biocompatibilidade
Celular
Faculdade de Medicina Dentária, UP
Rua Dr. Manuel Pereira da Silva
4200-393 Porto

e-mail: mhfernandes@fmd.up.pt

PUBLICAÇÃO IV

Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine

Clin. Oral Impl. Res. 2008; 19: 582-589

Maria Lurdes Pereira
 João Costa Carvalho
 Fernando Peres
 Manuel Gutierrez
 Maria Helena Fernandes

Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine

Authors' affiliation:

Maria Lurdes Pereira, João Costa Carvalho, Fernando Peres, Maria Helena Fernandes, Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, Portugal
 Manuel Gutierrez, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Hospital de São João, Porto, Portugal

Correspondence to:

Maria Helena Fernandes
 Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
 Rua Dr. Manuel Pereira da Silva
 4200-393 Porto
 Portugal
 Tel.: + 351 220 901 100
 Fax: + 351 220 901 101
 e-mail: mhfermandes@fmd.up.pt

Key words: differentiation, human osteoblastic cells, nicotine, plasma-sprayed titanium implants, proliferation

Abstract

Objectives: The aim of this work was to analyse the behaviour of human bone marrow osteoblastic cells cultured on the surface of routinely used plasma-sprayed titanium implants in the presence of plasmatic and salivary nicotine levels reported in smokers.

Material and methods: Human bone marrow cells (first subculture) were seeded on titanium implants and cultured for 35 days in α -minimal essential medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate and 10 nM dexamethasone. Seeded implants were exposed to nicotine, 10–1 mg/ml, from days 1 to 35, and characterized for cell morphology, viability/proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity and matrix mineralization.

Results: Low levels of nicotine, 10 and 50 ng/ml, representative of the plasma concentrations reported in smokers, did not cause significant effects in the cell behaviour, although a small induction in cell growth and functional activity appeared to occur. Higher nicotine levels, 0.01–1 mg/ml, within those attained in saliva through tobacco use, caused evident dose-dependent effects in osteoblastic cell behaviour, i.e., a stimulatory effect in cell growth, ALP activity and matrix mineralization, at concentrations up to 0.2 mg/ml, and a deleterious effect at higher levels.

Conclusions: Considering the high tissue diffusion potential of nicotine, the results suggest the possibility of a direct modulation of the osteoblast activity as a contributing factor to the overall effect of nicotine in the bone microenvironment around dental implants.

Osseointegrated titanium implants have been increasingly used in the treatment of total and partial edentulism with high long-term success rates (Boioli et al. 2001). Implant failure is the result of multifactorial processes and several studies have shown that smoking can be associated with higher failure rates and spontaneous implant exposure (Esposito et al. 1998; Chuang et al. 2002). Jones & Triplett (1992) first reported the relationship between smoking and impaired wound healing in the oral cavity and the loss of

endosseous implants. Bain & Moy (1993) found, in a study of 540 patients who received 2194 Brånemark implants, that smoking was the most significant factor implicated in implant failure. De Brun & Collaert (1994) presented similar conclusions in a group of 117 patients. Lambert et al. (2000), in a longitudinal clinical study, reported increased implant failures in smokers. In addition, in the oral cavity, tobacco smoke is associated with impaired bone healing after surgical treatment (Meechan et al. 1988), reduced bone height

Date:

Accepted 5 August 2007

To cite this article:

Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine.
Clin. Oral Impl. Res. 19, 2008; 582–589
 doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01515.x

(Bolin et al. 1993), increased rate of bone loss and poor bone quality (Holm 1994; Carlsson et al. 2000; Rivera-Hidalgo 2003), and higher incidence of peri-implantitis (Haas et al. 1996), all contributing to the higher rates of implant failures among smokers than non-smokers (Esposito et al. 1998; Chuang et al. 2002). Studies in animal models, performed to understand and document such impaired outcomes, also showed a negative influence of tobacco smoke on bone healing around implants (Nociti et al. 2002; César-Neto et al. 2003, 2005).

Nicotine is a major component of tobacco smoke and is present in the plasma and saliva of tobacco consumers, with reported levels ranging from 4 to 73 ng/ml and 96 ng/ml to 1.6 mg/ml, respectively (Russel et al. 1980; Gritz et al. 1981; Hoffmann & Adams 1981; Hill et al. 1983). Nicotine is also found in the crevicular fluid, with levels being several times higher than those present in the plasma (Ryder et al. 1998), and can also be detected on the root surface of periodontally diseased teeth (Cuff et al. 1989). Nicotine appears to play a significant role in the negative effects of tobacco smoke in the bone tissue, and a variety of studies on animal bone wound models showed that nicotine administration has evident deleterious effects in bone regeneration (Daftari et al. 1994; Silcox et al. 1995; Hollinger et al. 1999; Pinto et al. 2002). The classical effect of nicotine is peripheral vasoconstriction with resulting tissue ischaemia, decreased oxygen tension and reduction of a potential osteoblast progenitor cell pool (Benowitz 1986; Yildiz 2004), effects that contribute to impaired tissue repair potential at the bone/implant interface. Also, according to some *in vitro* studies, nicotine appears to influence the growth and differentiation of osteoblastic cells in several bone cell culture systems performed in standard tissue culture plates (Fang et al. 1991; Ramp et al. 1991; Yuhara et al. 1999; Walker et al. 2001; Tanaka et al. 2005; Kamar et al. 2006; Katono et al. 2006). Therefore, the aim of this work was to analyse the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells seeded on routinely used screw-type plasma-sprayed titanium implants and evaluate the effect of nicotine on cell behaviour. To the best of our knowledge,

there are no reported studies regarding the biological performance of titanium implants in the presence of nicotine. In the present work, seeded implants were exposed continuously to nicotine in a concentration range representative of the one found in the plasma and saliva of tobacco users. Cell behaviour was analysed for cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity and matrix mineralization.

Material and methods

Implant surface characterization

Commercially available Straumann® (Basel, Switzerland) screw-shaped titanium implants, 8 mm in length, were used in this study. The implant surface was a titanium plasma spray (TPS) surface, i.e., a titanium implant was coated with high-purity titanium powder. TPS implants were used as supplied by the manufacturer, with all packing being removed under aseptic conditions.

Cell culture

Human bone marrow was obtained from four patients (aged from 25–40 years) undergoing orthopaedic corrective surgery procedures of the hip. Informed consent to use this biological material, which would otherwise be discarded, was obtained. Bone marrow was cultured in α -MEM containing 10% foetal bovine serum, penicillin–streptomycin (100 IU/ml and 10 mg/ml, respectively), 2.5 μ g/ml fungizone and 50 μ g/ml ascorbic acid. Incubation was performed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C, and the medium was changed twice a week. At 70–80% confluence, adherent cells were enzymatically released (0.04% trypsin in 0.25% EDTA solution) and 500 μ l of the cell suspension, at a density of 10⁴ cells/cm², was poured on the surface of each screw-type TPS titanium implant placed in 48-well culture plates in a defined position, and pre-incubated with complete culture medium for 3 h. A preliminary assessment of the seeded implants, at day 1, by scanning electron microscopy (SEM), showed that the cells were homogeneously distributed on the surface of the implant that was in contact with the cell suspension. Although the cell-seeding process did not allow an even attachment of the cells on

the cylindrical surface of the implant, SEM observation showed that after 2 weeks the surface was totally covered by a cell layer.

Upon seeding, cells were allowed to attach for 24 h. At this stage, the culture medium was changed to a medium supplemented with β -glycerophosphate (10 mM) and dexamethasone (10 nM). Seeded implants were cultured for 35 days in the absence (control cultures) and in the presence of nicotine [(–) nicotine] [(–)-1-methyl-2-3-pyrrolidine] [Sigma N-3876 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany)] – 10 and 50 ng/ml (0.06 and 0.3 μ M) and 0.01–1 mg/ml (0.06–6 mM). Cultures were exposed from days 1 to 35 and nicotine, in the culture medium, was renewed at each medium change, three times a week. Control and nicotine-exposed seeded implants were characterized at days 3, 7, 14, 21, 28 and 35 for cell morphology, proliferation and function.

Cell viability/proliferation

MTT assay – reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to a purple formazan product by viable cells – was used to estimate cell viability/proliferation. Seeded implants were transferred to clean wells and incubated with 0.5 mg/ml of MTT for the last 4 h of the culture period tested; the medium was then decanted, formazan salts were dissolved with dimethylsulphoxide and the absorbance (A) was determined at $\lambda = 600$ nm on a microplate reader.

ALP activity and total protein content

Seeded implants were washed twice with phosphate-buffered solution (PBS) and stored at –20°C until the end of the experiment. For ALP evaluation, the cell layer on the implant surface was lysed with 0.1% Triton in water for 5–10 min and enzyme activity was assayed in the lysate by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate in alkaline buffer solution, pH 10.3 and colorimetric determination of the product (*p*-nitrophenol) at 405 nm. Hydrolysis was performed for 30 min at 37°C. ALP activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol produced per minute per microgram of protein (nmol/min/ μ g protein). Protein content was determined according to the method of Lowry in cell lysates obtained by treatment of the seeded implants with 0.1 M NaOH for 1 h; bovine albumin was used as a standard.

Pereira et al. . Effect of nicotine on osteoblastic cells cultured on titanium implants

SEM assay

Seeded materials were washed twice with PBS, fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.14 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) for 10 min, dehydrated in graded alcohols (70%, 80%, 2 × 90% and 99.8%), critical-point dried, sputter-coated with gold and analysed in a JEOL JMS 630 1F scanning electron microscope equipped with an X-ray energy-dispersive spectroscopy voyager XRMA system [Noram Instruments, Tokyo, Japan].

Statistical analysis

Four independent experiments were performed. Cultures were established from different patients and the pattern of cell behaviour regarding the dose effects of nicotine on bone marrow cells was similar in the four experiments, presenting a coefficient of variation of 20–50%. Data from a representative experiment are shown. Each point represents the mean ± standard deviation of three replicates. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA). The statistical differences between control and nicotine-treated cultures were determined by the Bonferroni method. *P*-values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Cell morphology

Bone marrow cells were able to adhere and spread on the implant surface. Attached cells presented a spread – polygonal shape with cytoplasmic extensions adapting to the surface crevices and irregularities. Cells proliferated throughout the incubation time, with extensive cell-to-cell contact, and formed a flattened sheet adapting to the implant topography, after 2–3 weeks. Continuous exposure to nicotine induced dose-dependent vacuolation of the cytoplasm. This effect was more pronounced at early incubation times and was transient in the cultures exposed to levels up to 0.2–0.3 mg/ml. In the presence of higher concentrations, the cells became highly vacuolated, retracted and showed a tendency to detach from the implant surface; materials treated with 0.4–1 mg/ml nicotine showed a dose- and time-dependent decrease in the number of attached cells. Figures 1 and 2 show the SEM appearance of the seeded implants at days 7 and 28, respectively.

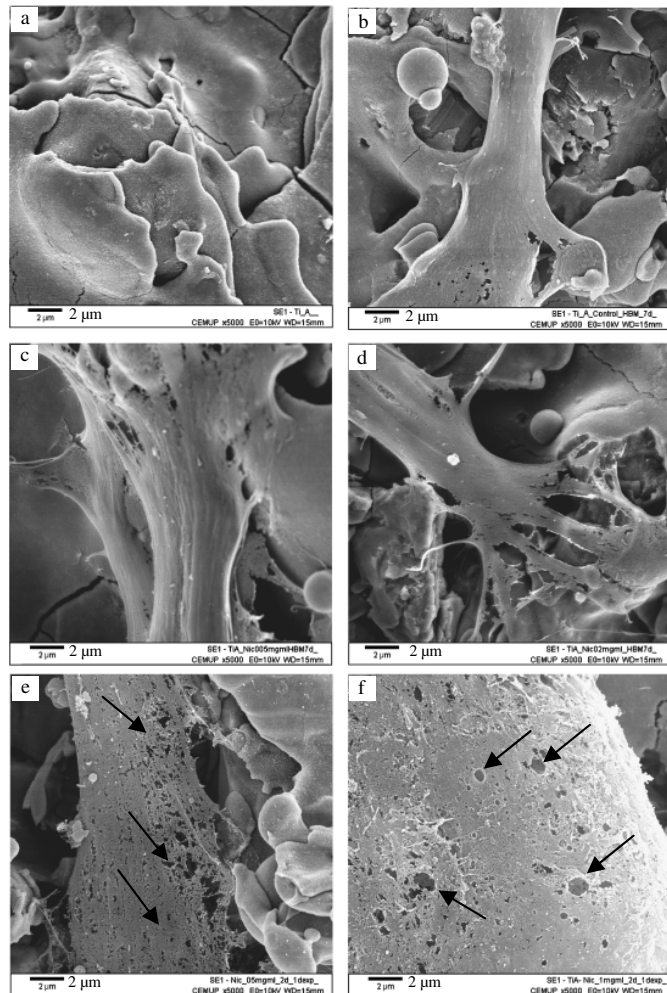


Fig. 1. Scanning electron microscopy appearance of plasma-sprayed titanium implants before cell seeding (a) and after being cultured with human bone marrow osteoblastic cells for 7 days (b–f). Control cultures (b, absence of nicotine) and cultures exposed to 0.05 (c), 0.2 (d), 0.5 (e) and 1 (f) mg/ml nicotine. As compared with control (b), cells exposed to 0.5 (e) and 1 (f) mg/ml nicotine presented a highly vacuolated cytoplasm (black arrows).

Cell viability/proliferation and ALP activity

Bone marrow cells grown in control conditions proliferated gradually throughout the culture time, with a higher growth rate during the first 3 weeks (Fig. 3a). Exposure to 10 and 50 ng/ml of nicotine (plasmatic concentrations) increased the MTT reduction values, with statistical significance at day 21 (Fig. 3a). Exposure to salivary levels up to 0.2 mg/ml caused a dose-dependent increase of MTT reduction, indicative of

stimulation on cell proliferation (Fig. 3b). Values at day 21 were 31%, 66% and 81% higher than those of control cultures, respectively, in the implants treated with 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml. A small inhibitory effect occurred in the presence of 0.3 mg/ml nicotine (22.4% at day 21) but, in the last week, MTT reduction was similar to that found in control-seeded implants. Higher nicotine levels caused a dose-dependent decrease in cell growth; at

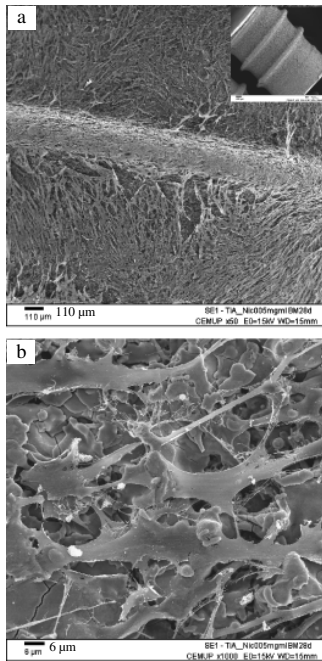


Fig. 2. Scanning electron microscopy appearance of plasma-sprayed titanium implants seeded with human bone marrow osteoblastic cells and cultured for 28 days in the presence of 0.05 mg/ml nicotine. Cells proliferated to form a cell layer covering the implant surface (a, low magnification; inset, scale bar = 280 µm) and presented an elongated morphology with cytoplasmic extensions, cell-to-cell contact and adaptation to the surface topography (b, high magnification). This pattern of cell behaviour was similar in control-seeded implants and those exposed to nicotine levels up to 0.2 mg/ml.

day 21, cultures treated with 0.4–1 mg/ml presented reductions of 51–89% in the MTT assay, as compared with control cultures.

ALP activity measured in control-seeded implants was low during the first 2 weeks but increased significantly during the third week, and maximum values were observed around day 21. The presence of 10 and 50 ng/ml nicotine (Fig. 3c) resulted in a small stimulation from the second week onwards, although not statistically significant. Dose-dependent induction in enzyme activity was found during the second and third weeks in the cultures treated with salivary levels of nicotine up to 0.2 mg/ml; peak levels, found at day 21, increased from 0.62 ± 0.063 in control cultures to

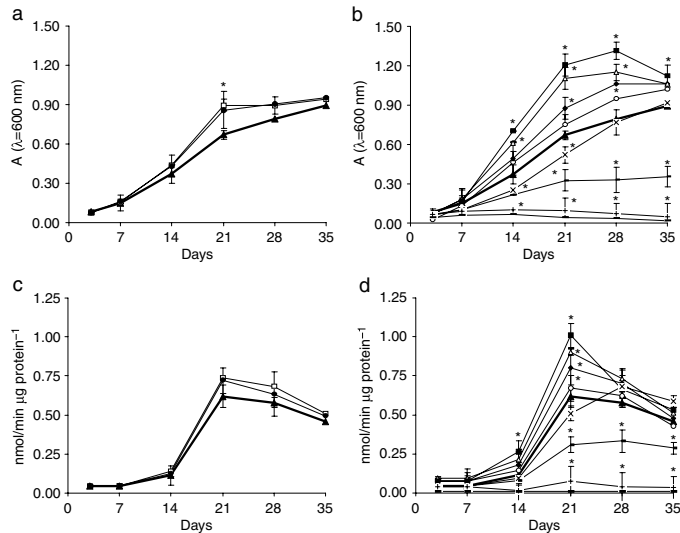


Fig. 3. Cell viability/proliferation (a, b) and alkaline phosphatase activity (c, d) of human bone marrow osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants for 35 days. (a, c) Control cultures (▲); cultures exposed to nicotine: 10 (□) and 50 (●) ng/ml, representative of plasmatic levels. (b and d) Control cultures (▲); cultures exposed to nicotine: 0.01 (○), 0.05 (◆), 0.1 (Δ), 0.2 (■), 0.3 (×), 0.4 (—), 0.5 (+) and 1 (–) mg/ml, representative of salivary levels. *Significantly different from control cultures.

1.01 ± 0.066 in the presence of 0.2 mg/ml (a 62% increase, Fig. 3d). Exposure to 0.3 mg/ml nicotine caused an inhibitory effect in ALP activity, reflected by slightly lower levels during the first 3 weeks; peak levels were observed a few days later, at day 28, and were similar to those of control cultures (Fig. 3d). Higher nicotine concentrations, 0.4–1 mg/ml, resulted in decreased ability to synthesize ALP (Fig. 3d).

Matrix mineralization (SEM observation)

Matrix mineralization was assessed by SEM observation and X-ray microanalyses of the cell layer.

Bone marrow cells seeded on the titanium implants were able to form a mineralized extracellular matrix after 3 weeks of culture, as evidenced by the presence of calcium phosphate deposits in close association with the cell layer, in 28-day cultures (Fig. 4). Based on visual observation, a trend for an increase in the extent of mineralization was apparent in the presence of 0.05–0.2 mg/ml (Fig. 4c and d). Cultures exposed to 0.3 mg/ml nicotine showed delayed mineralization, i.e., the presence of mineralized deposits was very discrete at day 28 (Fig. 4e) but evident at day 35 (not

shown). X-ray microanalyses of the mineral deposits showed the presence of calcium and phosphorus peaks (Fig. 4f). Implants treated with 0.4 mg/ml nicotine presented some cell growth, but no signs of mineralized structures (not shown). At higher concentrations, very few cells remained attached to the implant surface at day 28 (not shown).

Discussion

This work analyses the effect of nicotine in the proliferation and functional activity of human bone marrow osteoblastic cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants. The concentration range of nicotine used (10 ng/ml to 1 mg/ml) is representative of that reported in the plasma (4–73 ng/ml) and saliva (96 ng/ml to 1.6 mg/ml) of tobacco users (Russell et al. 1980; Critz et al. 1981; Hoffmann & Adams 1981; Hill et al. 1983).

Bone marrow stroma is a heterogeneous mixture of cells including uncommitted mesenchymal stem cells able to differentiate in several cell lineages. Primary cultures were obtained by culturing the bone

Pereira et al. Effect of nicotine on osteoblastic cells cultured on titanium implants

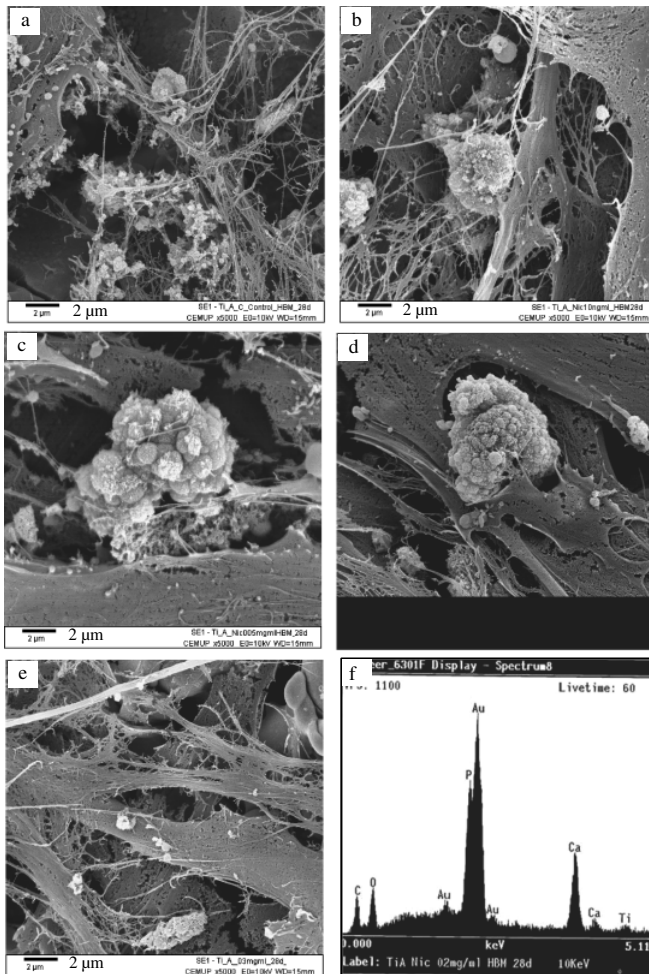


Fig. 4. Scanning electron microscopy appearance of plasma-sprayed titanium implants seeded with human bone marrow osteoblastic cells and cultured for 28 days in the absence (a, control cultures) and in the presence of 10 ng/ml (b) and 0.05 (c), 0.2 (d) and 0.3 (e) mg/ml nicotine. (f) Energy-dispersive spectroscopy (EDS) spectrum (EDS) of the matrix-associated mineralized deposits present in cultures exposed to 0.2 mg/ml nicotine, showing the presence of Ca and P peaks. Similar EDS spectra were obtained in control cultures and those exposed to nicotine levels up to 0.3 mg/ml. As compared with control cultures (a), the extent of matrix mineralization was higher in cultures exposed to 0.05 and 0.2 mg/ml nicotine (c and d) and lower in those treated with 0.3 mg/ml nicotine (e).

marrow suspension in α -MEM supplemented with 10% SBF, and the selection of mesenchymal cells was based on their ability to adhere to the surface of the culture plate. The majority of non-adherent cells such as erythrocytes and cells from haematopoietic lineage were removed during the course of routine change of the

medium. Implants were seeded with first passage cells and cultured for 35 days in the presence of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone. It is known that under these culture conditions, uncommitted bone marrow mesenchymal cells express many osteogenic parameters (Maniatopoulos et al. 1988; Granthos et al.

2003) and these supplements have been routinely used to favour the development of the osteoblast phenotype in several cell culture systems (Stein & Lian 1995; Maniatopoulos et al. 1988; Coelho & Fernandes 2000; Jørgensen et al. 2004). In the present work, bone marrow cells adhered to the implant surface and proliferated with a high growth rate forming a mineralized matrix following maximal ALP activity. This behaviour is in agreement with that reported for the differentiation of osteoblastic cells in culture (Stein & Lian 1995) and mimics the cellular events occurring at the implant surface following *in vivo* implantation in the bone tissue (Davies 1998).

Exposure of the seeded implants to nicotine caused a characteristic dose-dependent vacuolation of the cytoplasm that was particularly evident at concentrations higher than 0.2 mg/ml. This morphologic event was previously observed in mouse macrophages (Ohkuma & Poole 1981) and osteoblasts from chick embryo calvariae (Ramp et al. 1991), and appears to be a general effect observed with weak organic bases, such as nicotine (Ohkuma & Poole 1981). These compounds are known to accumulate in lysosomes by membrane permeation and trapping by protonation, as the base concentration within the lysosomes increases, water enters osmotically and these structures swell into large vacuoles (Ohkuma & Poole 1981). In the present work, this event was more pronounced at early incubation times and tended to be attenuated with culture time, except at high (> 0.3 mg/ml) nicotine levels, in which cultures remained vacuolated during the entire culture time. It has been suggested that trapping of nicotine in the lysosomes may function as a protective mechanism, as it prevents the interaction of nicotine with the cytoplasmic cellular structures (Ohkuma & Poole 1981).

Nicotine caused a dose-dependent effect on cell viability/growth and functional activity. A significant increase in cell growth rate was evident at levels up to 0.2 mg/ml. Also, an induction in ALP activity and increased extent of matrix mineralization occurred in this concentration range, particularly in the presence of 0.05–0.2 mg/ml nicotine. Exposure to 0.3 mg/ml caused a small initial inhibitory effect but cells were still able to recover, although with later ALP maximal levels and delayed

mineralization. Results observed in nicotine-exposed implants (as well as in controls) suggest that ALP activity and matrix mineralization appeared to be closely related. ALP has long been associated with biological mineralization, and the high enzyme activity at sites of mineralizable matrices increases the local phosphate concentrations (in the experimental conditions used, by hydrolyzing β -glycerophosphate), providing the chemical conditions for the onset of matrix mineralization (Bellows et al. 1992; Anderson & Morris 1993). On SEM observation, mineralization was intimately associated with the fibrillar cell layer (as evident in Fig. 4, particularly Fig. 4a) and appeared to be closely related with the pattern of ALP activity. The onset of mineral deposition followed maximal ALP activity (i.e., occurring later in cultures exposed to 0.3 mg/ml) and cultures presenting higher ALP levels also showed an increased extent of matrix mineralization (i.e., cultures treated with 0.05–0.2 mg/ml nicotine, as compared with control). These observations strongly suggest a cell-mediated mineralization process occurring both in control and in nicotine-exposed seeded implants. Nicotine levels ≥ 0.4 mg/ml caused evident dose-dependent cytotoxic effects with decreased cell growth and cell-to-cell contact, low-ALP activity and the absence of mineral deposition, and, ultimately, detachment from the implant surface and cell death (0.5 and 1 mg/ml).

Previous studies, performed in standard tissue culture plates, also showed osteoblastic cell responses to nicotine. Rat osteosarcoma cells, UMR 106-01, presented decreased cell proliferation after treatment with nicotine levels $> 1 \mu\text{M}$ (Fang et al. 1991), whereas osteoblastic cells from embryonic chick calvariae exposed to 0.05–0.6 mg/ml nicotine showed an increase in tritiated thymidine incorporation and a decrease in collagen synthesis and ALP activity (Ramp et al. 1991). ROB-C26 and MC3T3-E1 cells treated with 0.06–1.5 mM nicotine responded with an increase in ALP activity and calcium deposition or a decrease in both parameters, respectively (Yuhara et al. 1999). In human trabecular bone-derived cells exposed to a wide range of nicotine concentrations, 0.1 pM to 10 mM, results showed that low levels of nicotine (0.1–1 μM) increased cell proliferation, which was associated

with induction of the expression of *c-fos* genes, whereas high levels caused inhibitory effects (Walker et al. 2001). Osteoblast-like Saos-2 cells exposed to 10^{-3} M nicotine showed decreased expression of type I collagen, osteopontin, ALP activity and mineralized nodule formation (Tanaka et al. 2005) and another study reported increased expression of metalloproteinases, tissue-type plasminogen activator and *c-fos* genes (Katono et al. 2006). In mouse osteoblastic cells, Kamar et al. (2006) showed that nicotine induced (at 1 μM) or inhibited (at 1 mM) proliferation, and increased secretion of IL-6 and TNF- α in selected conditions. The same authors reported a similar trend in human osteoblastic cells, but the effect of nicotine (2×10^{-8} – 6×10^{-4} M) was donor dependent. As is evident, these studies showed a variety of dose-dependent patterns that might reflect differences in the experimental conditions used, related to the osteoblastic model (culture conditions, species, stage of cell differentiation), nicotine exposure (continuous/intermittent, concentration range) and/or analytical methodology. In this way, comparison of the osteoblastic response to nicotine is difficult and the mechanism involved remains unclear. However, Walker et al. (2001) found that D-tubocurarine, a nicotinic receptor antagonist, inhibited nicotine-induced responses in human trabecular bone-derived cells. Katono et al. (2006) showed a similar result in Saos-2 cells and further reported an increase in the expression of the α_7 nicotinic receptor. Others suggested, by indirect evidence, that changes in the intracellular levels of Ca^{2+} ions, following binding of nicotine to its receptor and subsequent activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels, may modulate, at least in part, the effects of nicotine on bone metabolism (Yuhara et al. 1999).

The results of the present study showed that the behaviour of human osteoblastic cells seeded on plasma-sprayed titanium implants was affected by the continuous exposure to nicotine, with deleterious effects at levels ≥ 0.3 mg/ml. Low levels (10 and 50 ng/ml), representative of the nicotine plasma concentrations reported in smokers, did not cause significant effects in the cell behaviour, although with a trend for a small positive effect. Salivary levels up to 0.2 mg/ml appeared to promote

the growth and differentiation of osteoblastic cells. These are apparently conflicting results, considering the well-established association of cigarette smoking and increased rates of implant failures. Tobacco smoke contains a large variety of bioactive compounds (Hatzinikolaou et al. 2006), and the deleterious effects occurring at the bone/implant interface are most probably the result of a multitude of direct and indirect systemic and local effects on bone metabolism, further associated with the possibility of complex interactions. Nicotine itself is known to affect the behaviour of several cell and tissue systems by different mechanisms (Yildiz 2004). Of relevance, is the intense vasoconstrictor action observed with low concentrations (Daftari et al. 1994), with evident direct and indirect deleterious effects on bone metabolism (Hollinger 1999). However, it is interesting to note that studies investigating the influence of nicotine administration in the osseointegration of titanium implants in animal models did not find significant effects in bone healing around the implants in the conditions used (Nociti et al. 2002; Stefani et al. 2002; César-Neto et al. 2003; Balatsouka et al. 2005a, 2005b), suggesting a minor role of potential systemic adverse effects. On the other hand, some clinical studies strongly suggest that local exposure of the peri-implant tissues to tobacco smoke is the main factor leading to an overall greater failure rate in smokers (Haas et al. 1996; Lambert et al. 2000). Considering the high tissue diffusion potential of nicotine (Benowitz 1986) and the permeability features of the gingival implant epithelium (Ikeda et al. 2002), the present results suggest the possibility of a direct modulation of osteoblast activity as a contributing factor to the overall effect of nicotine in the bone microenvironment around dental implants.

Acknowledgements: This work was supported by Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP) and Conselho de Prevenção do Tabagismo. The plasma-sprayed implants were kindly provided by Straumann. The technical assistance of Mr Emanuel Monteiro in the preparation of samples for SEM observation is acknowledged.

Pereira et al. Effect of nicotine on osteoblastic cells cultured on titanium implants

References

- Anderson, H.C. & Morris, D.C. (1993) Mineralization. In: Mundy, J.R. & Martin, T.J., eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 107, 267. Berlin: Springer-Verlag.
- Bain, C.A. & Moy, P.K. (1993) The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 8: 609–615.
- Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005a) The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. An experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 16: 268–276.
- Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005b) The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 16: 389–395.
- Bellows, C.G., Heersche, J.N.M. & Aubin, J.E. (1992) Inorganic phosphate added exogenously or released from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid *in vitro*. *Bone and Mineral* 17: 15–29.
- Benowitz, N.L. (1986) Clinical pharmacology of nicotine. *Annual Review of Medicine* 37: 21–32.
- Boioli, L.T., Penaud, J. & Miller, N. (2001) A meta-analytic, quantitative assessment of osseointegration establishment and evolution of submerged and non submerged endosseous titanium oral implants. *Clinical Oral Implants Research* 12: 579–588.
- Bolin, A., Eklund, G., Frithiof, L. & Lavstedt, S. (1993) The effect of changed smoking habits on marginal alveolar bone loss. *Swedish Dental Journal* 17: 211–216.
- Carlsson, G.E., Torsten, J. & Lindquist, L.W. (2000) Long term marginal periimplant bone loss in edentulous patients. *International Journal of Prosthodontics* 13: 295–302.
- César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A. & Nociti, F.H.J. (2005) Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histological study in rats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 20: 713–719.
- César-Neto, J.B., Duarte, P.M., Sallum, E.A., Barbieri, D., Moreno, H.J. & Nociti, F.H.J. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology* 74: 1445–1459.
- Chuang, S.K., Wei, L.Y., Douglass, C.W. & Dodson, T.B. (2002) Risk factors for dental implant failure: a strategy for the analysis of clustered failure-time observations. *Journal of Dentistry Research* 81: 572–577.
- Coelho, M.J. & Fernandes, M.H. (2000) Human bone cells cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexametasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21: 1095–1102.
- Cuff, M.J.A., MacQuade, M.J., Scheidt, M.J., Sutherland, D.E. & Van Dyke, T.E. (1989) The presence of nicotine on the root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *Journal of Periodontology* 60: 564–569.
- Daftari, K.T., Whitesides, T.E., Heller, J.G., Goodrich, A.C., Maccarey, B.E. & Hutton, C.W. (1994) Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 19: 904–911.
- Davies, J.E. (1998) Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics* 11: 391–401.
- De Brun, H. & Collaert, B. (1994) The effect of smoking on early implant failure. *Clinical Oral Implants Research* 5: 260–264.
- Esposito, M., Hirsch, J., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998) Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (I). Success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Science* 106: 527–551.
- Fang, M.A., Frost, P.J., Iida-Klein, A. & Hahn, T.J. (1991) Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 12: 283–286.
- Granthos, S., Zannettino, A.C., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A. & Simmos, P.J. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science* 116: 1827–1835.
- Gritz, E.R., Baer-Weiss, V., Benowitz, N.L., Van Vunakis, H. & Jarvik, M.E. (1981) Plasma nicotine and cotinine concentrations in habitual smokeless tobacco users. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 30: 201–209.
- Haas, R., Haimböck, W., Mailath, G. & Watzek, G. (1996) The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *Journal of Prosthetic Dentistry* 76: 592–597.
- Hatzinikolaou, D.G., Lagesson, V., Stavridou, A.J., Pouli, A.E., Lagesson-Andrasko, L. & Stavrides, J.C. (2006) Analysis of the gas phase of cigarette smoke by gas chromatography coupled with UV-diode array detection. *Analytical Chemistry* 78: 4509–4516.
- Hill, P., Haley, N.J. & Wynder, E.L. (1983) Cigarette smoking: carboxyhemoglobin, plasma nicotine, cotinine and thiocyanate vs self reported smoking data and cardiovascular disease. *Journal of Chronic Diseases* 36: 439–449.
- Hoffmann, D. & Adams, J.D. (1981) Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Research* 41: 4305–4308.
- Hollinger, O.J., Schmitt, J.M., Hwang, K. & Buck, D. (1999) Impact of nicotine on bone healing. *Journal of Biomedical Materials Research* 45: 294–301.
- Holm, G. (1994) Smoking as an additional risk for tooth loss. *Journal of Periodontology* 65: 996–1001.
- Ikeda, H., Shiraiwa, M., Yamaza, T., Yoshinari, M., Kido, M., Ayukawa, Y., Inoue, T., Koyano, K. & Tanaka, T. (2002) Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. *Clinical Oral Implants Research* 13: 243–251.
- Jones, J.K. & Triplett, R.G. (1992) The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 50: 237–239.
- Jørgensen, N.R., Henriksen, Z., Sørensen, O.H. & Civitelli, R. (2004) Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an *in vitro* model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids* 69: 219–226.
- Kamar, A.R., El-Ghobar, N., Marzec, N., Margaroni III, J.E. & Dziak, R. (2006) Nicotine induced proliferation and cytochrome release in osteoblastic cells. *International Journal of Molecular Medicine* 17: 121–127.
- Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Yamanaka, K., Oka, H., Motohashi, M. & Maeno, M. (2006) Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38: 874–882.
- Lambert, P.M., Morris, H.F. & Ochi, S. (2000) The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Annals of Periodontology* 5: 79–89.
- Maniopoulos, C., Sodek, J. & Melcher, A. (1988) Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Research* 254: 317–330.
- Meechan, J.G., Macgregor, I.D., Rogers, S.N., Hobson, R.S., Bate, J.P. & Dennison, M. (1988) The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 26: 402–409.
- Nociti, F.H.J., César-Neto, J.B., Carvalho, M.D., Sallum, A.W. & Sallum, E.A. (2002) Interdental cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *Journal of Periodontology* 73: 982–987.
- Ohkuma, S. & Poole, B. (1981) Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *Journal of Cell Biology* 90: 656–664.
- Pinto, J.R., Bosco, A.F., Okamoto, T., Guerra, J.B. & Piza, I.G. (2002) Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Brazilian Dental Journal* 13: 3–9.
- Ramp, W.K., Lenz, L.G. & Galvin, R.J. (1991) Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine* 197: 36–43.
- Rivera-Hidalgo, F. (2003) Smoking and periodontal disease. *Periodontology* 2000 32: 50–58.
- Russel, M.A., Jarvis, M., Iyer, R. & Feyerabend, C. (1980) Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *British Medical Journal* 280: 972–976.
- Ryder, M.I., Fujitak, R., Lebus, R.S., Mahbous, M., Faia, B., Muhaimin, D., Hamada, M. & Hyun, W. (1998) Alterations of neutrophil L-selection and

Pereira et al . Effect of nicotine on osteoblastic cells cultured on titanium implants

- CD18 expression by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Journal of Periodontology Research* **33**: 359-369.
- Silcox, D., Daftari, D.K., Bodden, M.K., Shiman-dale, J., Hutton, C.W. & Whitesides, T.E. (1995) The effect of nicotine on spine fusion. *Spine* **20**: 1594-1553.
- Stefani, M.C., Filho, G.R., Sallum, E.A., Toledo, S. & Sallum, A.W. (2002) Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *Journal of Perio-dontology* **73**: 206-212.
- Stein, G.S. & Lian, J.B. (1995) Molecular mechanisms mediated proliferation- differentiation inter-relationships during progressive development of the osteoblast phenotype: update. *Endocrinology Reviews* **4**: 290-297.
- Tanaka, H., Tanabe, N., Suzuki, N., Shoji, M., Torigoe, H., Sugaya, A., Motohashi, M. & Maeno, M. (2005) Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Science* **77**: 2273-2284.
- Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B.M. & El Hay, A.J. (2001) Nicotinic regulation of *c-fos* and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* **28**: 603-608.
- Yildiz, D. (2004) Nicotine its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* **43**: 619-632.
- Yuhara, S., Kasagi, S., Inoue, A., Otsuka, E., Hirose, S. & Hagiwara, H. (1999) Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *European Journal of Pharmacology* **383**: 387-393.

PUBLICAÇÃO V

Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants

Journal of Biomedical Research – Part A 2008. doi: 10.1002/jbm.a.31873

Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants

M. L. Pereira, J. C. Carvalho, F. Peres, M. H. Fernandes

Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, Portugal

Received 21 December 2006; revised 25 June 2007; accepted 23 August 2007

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.31873

Abstract: Smoking has an established negative impact in the clinical outcome of dental implants. This work analyses the response of human osteoblastic cells to nicotine, at the surface of plasma-sprayed commercial titanium implants. Human bone marrow (HBM) and Saos-2 cells, seeded on the surface of titanium implants and cultured in experimental conditions favoring osteoblastic differentiation, were exposed continuously to nicotine (0.0001 to 0.5 mg mL⁻¹) and characterized for cell proliferation and function. Exposure of HBM cells resulted in increased cell proliferation, higher alkaline phosphatase (ALP) activity, and earlier onset of matrix mineralization at levels up to 0.2 mg mL⁻¹, an initial inhibitory effect in cell growth and functional activity followed by a recovery in the presence of 0.3 mg mL⁻¹ and a dose-dependent deleterious effect at higher

levels. By contrast, exposure to nicotine did not affect cell proliferation of Saos-2 cells at levels up to 0.2 mg mL⁻¹, and caused only a small positive effect in ALP activity in the presence of 0.05 and 0.1 mg mL⁻¹; however, matrix mineralization by Saos-2 cells also occurred earlier in the cultures exposed to levels of nicotine up to 0.1 mg mL⁻¹. Higher concentrations caused dose-dependent inhibitory effects. Considering the high diffusion potential of nicotine, results suggest a local role of nicotine in modulating bone formation events at the implant surface. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 00A: 000–000, 2008

Key words: plasma-sprayed titanium implants; nicotine; human bone marrow cells; Saos-2 cells; *in vitro* matrix mineralization

INTRODUCTION

Osseointegration of dental implants, essential for long term-clinical success, involves the direct anchorage of the implant by the formation of bone without the growth of fibrous tissue at the bone-implant interface, and represents a dynamic process both during its establishment and its maintenance.^{1–6} Although the reported success rate of titanium implants is high, failure does occur, and smoking is one of the factors often associated to implant failure.^{7–16} Also, several studies in animal models analyzed, by histological methods, the effects of tobacco smoke/nicotine on the interface bone/implant,^{17–22}

and showed that intermittent cigarette smoke inhalation may result in lower bone-to-implant contact and less bone area within the threads,^{17,19,20} with nicotine contributing, at least in part, in the cancellous bone response.¹⁹

Tobacco contains a large number of potentially toxic substances and nicotine, a major active component of the particulate phase of tobacco smoke²³ appears to play a significant role in the adverse effects of tobacco in the bone tissue, including the healing process.^{19,24,25} Nicotine is absorbed from the lung and oral mucosal membranes,²³ and plasma concentrations attain values of 4–75 ng mL⁻¹.^{26–29} It is also found in crevicular fluid, with reported levels of 5961 ng mL⁻¹.³⁰ In saliva, levels of nicotine are significantly higher, 96 ng mL⁻¹ to 1.6 mg mL⁻¹.^{31,32}

The implant osseointegration and maintenance require the recruitment of osteoblast precursor cells, their anchorage, attachment, adhesion, spreading, proliferation, and differentiation into secretory osteoblasts with the production of a calcified extracellular matrix at the implant surface.^{1,3,4} These cellular

Correspondence to: M. H. Fernandes; e-mail: mhrf@portugalmail.pt

Contract grant sponsor: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP), Conselho de Prevenção do Tabagismo

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

events are highly sensitive to the local microenvironment and both systemic and local effects of nicotine/tobacco components have been associated with negative effects in the bone tissue.^{33,34} Regarding this, the importance of the local exposure of peri-implant tissues as the main factor leading to an overall greater failure rate in smokers was strongly suggested by the study of Lambert et al. involving more than 2900 endosseous dental implants in more than 800 patients at 32 centers.¹⁵ Also, Haas and Haimböck,¹³ in a retrospective study, concluded that local factors seem to be responsible for the higher incidence of peri-implantitis in smokers. There is no available data regarding the nicotine diffusion through the gingival peri-implant epithelium and the levels attained in the subjacent tissues. However, experimental studies showed that the oral mucosa can be highly permeable to nicotine³⁵ and the junctional peri-implant epithelium, although structurally and functionally identical to junctional epithelium around natural teeth, presents a high level of permeability to exogenous substances.³⁶ Considering the high levels of nicotine attained in the crevicular fluid and saliva of tobacco users³⁰⁻³² and the high lipophilic and diffusible character of this substance,²³ the presence of significant levels of nicotine at the bone/implant interface might be hypothesized.

Although several *in vivo* animal studies have investigated the effects of tobacco smoke/nicotine on bone response to titanium implants,¹⁷⁻²² little is known regarding the cellular events taking place at the implant surface. Therefore, the aim of the present study was to analyze the proliferation/differentiation response of human osteoblastic cells to plasma and salivary levels of nicotine, at the surface of plasma-sprayed titanium implants. A special focus is put on the effect of nicotine in the formation of a mineralized cell layer, as bone formation at the implant surface is the event leading to osseointegration and subsequent maintenance. To address this, two *in vitro* systems were used—human bone marrow (HBM) cell cultures, which present a representative osteoblastic proliferation/differentiation behavior in appropriate experimental conditions,³⁷ and the human osteosarcoma cell line Saos-2, which undergoes promptly mineralization in the presence of a source of phosphate ions.^{38,39}

MATERIALS AND METHODS

Implant surface characterization

Straumann[®] screw shaped titanium implants, 8 mm length, were used in this study. The implants displayed a titanium plasma-sprayed (TPS) surface, that is, the tita-

nium implant was coated with a high purity titanium powder.

Implants seeded with HBM cells

HBM was obtained from three healthy patients undergoing orthopedic surgery procedures. Informed consent to use this biological material, that would be otherwise discarded, was obtained. Bone marrow was cultured in α -minimal essential medium (α -MEM) containing 10% fetal bovine serum, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin, 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fungizone, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ascorbic acid. Incubation was performed in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air, at 37°C, and the medium was changed twice a week. At 70–80% confluence, adherent cells were enzymatically released (0.04% trypsin in 0.25% EDTA) and the cell suspension was used in the experiments.

TPS implants were used as supplied by the manufacturer. All packing was removed under aseptic conditions. Each implant was placed in a well of a 48-well plate, in a defined position, and 500 μL of the cell suspension (5×10^4 cells mL^{-1}) was poured on its surface. Cells were allowed to attach for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Being the implant surface cylindrical, it was not possible to know the number of cells seeded on each implant. However, a preliminary assessment of the seeded implants, at day 1, by scanning electron microscopy (SEM) and a MTT reduction assay showed that the cells were homogeneously distributed on the surface of the implant that contacted with the cell suspension and no significant variation was observed in the number of attached viable cells. Seeded implants were cultured for 28 days in the absence (control cultures) and in the presence of nicotine [(-)Nicotine ([-]-1-Methyl-2-3-pyrrolidone)]—0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.5 mg mL^{-1} (0.0006 to 3 mM)—in a culture medium further supplemented with β -glycerophosphate (10 mM) and dexamethasone (10 nM). Nicotine, in the culture medium, was renewed at each medium change, three times a week. Control and nicotine-exposed seeded implants were characterized at days 3, 7, 14, 21, and 28 for cell viability/proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, and matrix mineralization. Results observed in the presence of 0.001 and 0.05 mg mL^{-1} nicotine were not shown, as they were not relevant in terms of main conclusions regarding the osteoblastic response to nicotine. Cell behavior was similar to that found in the cultures exposed to 0.0001 and 0.01 mg mL^{-1} nicotine, respectively.

Implants seeded with Saos-2 cells

The cell line Saos-2 was cultured in the same experimental conditions as those used in the primary culture of HBM. Cell plating on the implant surface and exposure to nicotine followed the procedure described earlier. In this situation, seeded materials were cultured for 13 days, with the culture medium being supplemented with β -glycerophosphate (10 mM) from day 7 onwards. Control and nicotine-exposed seeded implants were characterized at days 3, 6, 8, 10, and 13 for cell proliferation and differentiation events.

Cell viability/proliferation, total protein content, and ALP activity

Cell viability/proliferation of the seeded implants was determined by the MTT assay that relies on the ability of viable cells to oxidize MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to an insoluble blue formazan product. Seeded implants were incubated with 0.5 mg mL⁻¹ of MTT for the last 4 h of the culture period tested. Then, the implants were transferred to a new plate, the formed formazan salt was dissolved with dimethylsulphoxide, and the absorbance (A) was determined at 600 nm.

Protein content was determined in 0.1M NaOH cell lysates according to the method of Lowry using bovine serum albumin as a standard.

ALP activity was assayed in cell lysates (obtained by the treatment of the seeded implants with 0.1% triton) by the hydrolyses of *p*-nitrophenol phosphate in alkaline buffer solution, pH 10.3, for 30 min, and colorimetric determination of *p*-nitrophenol at 405 nm. Results were expressed in nanomoles of *p*-nitrophenol produced per min per µg of protein (nmol min⁻¹ µgprotein⁻¹).

Matrix mineralization

The presence of calcium phosphate deposits in the cell layer of the seeded implants was inferred from the levels of ionized calcium (Cai) in the culture medium throughout the incubation time and visualized by SEM.

Culture medium from control and nicotine-exposed seeded implants was collected, at each medium change, during the entire culture period, and analyzed for the concentration of Cai using a Sigma Diagnostic Kit (procedure N587). Results were expressed in mmol per litre of medium (mmol L⁻¹). Cai in the medium originates from calcium phosphate compounds present in α-MEM and in fetal bovine serum. Consumption of Cai from the medium reflects the formation of calcium phosphate deposits in the cell layer. In the present work, levels of Cai measured were not cumulative as culture medium was totally replaced at each medium change. Therefore, Cai levels reflected changes occurring in intervals of 2-3 days throughout the culture period, providing quantitative information regarding the rate of the ongoing mineral deposition in the cell layer.

For SEM observation, seeded implants were fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.14 M sodium cacodylate buffer and rinsed with distilled water. Fixed cultures were dehydrated in graded alcohols, critical-point dried, sputter-coated with gold, and analyzed in a Jeol JSM 6301F scanning electron microscope equipped with a X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX) microanalysis capability (Voyager XRMA System, Noran Instruments).

Statistical analysis

Three independent experiments were performed, with the cultures being established from different patients (males aged between 20 and 40 years old). The pattern of cell response regarding the dose-effects of nicotine on osteoblastic cells was similar in the three experiments.

Data from a representative experiment are shown. The biochemical results are presented as mean ± standard deviation of three replicates. Statistical analyses were done by one-way analyses of variance (ANOVA). The statistical differences between control and nicotine-exposed groups were determined by the Bonferroni method; *p* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Implants seeded with HBM cells

Cell viability/proliferation and ALP activity

HBM cells seeded on titanium implants [Fig. 1(A)] showed a close interaction with the irregular surface and the formation of a flattened sheet followed by multilayers at late incubation times, overlaying the microtopography of the implant [Fig. 1(B)]. Cell growth was accompanied by the production of abundant fibrous matrix [Fig. 1(C)]. On the MTT assay [Fig. 2(A)], cells presented a proliferation phase during ~3 weeks (maximum MTT reduction at day 21, *A* = 1.32), entering a senescence process afterwards; ALP activity [Fig. 2(B)] was low at early incubation times but increased significantly during the third week (0.62 nmol min⁻¹ µg protein⁻¹, at day 21). Continuous exposure to nicotine resulted in increased cell growth and ALP activity at levels up to 0.2 mg mL⁻¹ (particularly in the presence of 0.01–0.2 mg mL⁻¹), an initial inhibitory effect followed by a recovery in the cultures treated with 0.3 mg mL⁻¹, and a dose-dependent decrease at higher levels [Figs. 2(A,B)]. On SEM observation, dose-dependent vacuolation of the cytoplasm was evident at levels ≥ 0.3 mg mL⁻¹ (Fig. 3). This effect was noted from the beginning of the exposure but tended to disappear in the presence of the lower levels (0.3 mg mL⁻¹).

Matrix mineralization

In the control seeded implants, Cai levels in the culture medium [Fig. 4(A)] remained constant until approximately day 20, decreasing significantly afterwards. Nicotine caused an earlier onset of mineral deposition, at levels up to 0.2 mg mL⁻¹. This effect was dose-dependent and statistically significant in the cultures exposed to 0.01–0.2 mg mL⁻¹. Exposure to 0.3 mg mL⁻¹ resulted in a slight delay in the onset of calcium deposition and, in the presence of higher levels, Cai concentration remained constant. On SEM observation (Fig. 5), at day 21, formation of globular mineralized deposits was discrete in control cultures, evident in those treated with 0.2 mg mL⁻¹ and absent in the presence of 0.3 mg mL⁻¹. At day

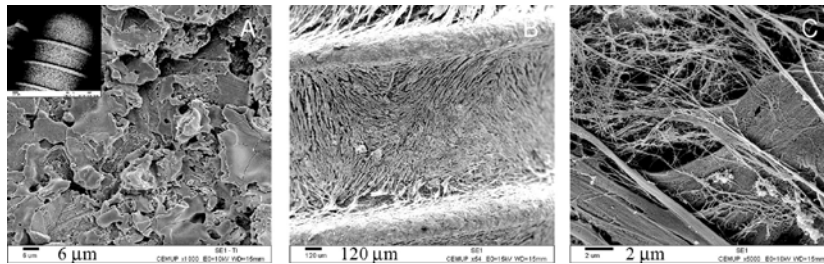


Figure 1. Representative appearance of the surface of plasma sprayed titanium implants in the absence of cells (A) and colonized with HBM cells at day 21 (B and C). The implant surface was completely covered with a cell layer (B) presenting an abundant fibrillar matrix (C, high magnification).

28, mineral deposition was present in the three situations, but the density was clearly lower in the cultures exposed to 0.3 mg mL^{-1} . The deposits showed the presence of Ca and P peaks on X-ray microanalysis and were closely associated with the cell layer. At days 21 and 28, cultures treated with 0.5 mg mL^{-1} nicotine showed only few cells with a highly vacuolated cytoplasm (not shown).

Implants seeded with Saos-2 cells

Cell viability/proliferation and ALP activity

Saos-2 cells presented a low proliferation rate, Fig. 2(C), (maximum MTT reduction at day 8, $A = 0.46$) but high levels of ALP [Fig. 2(D), maximal levels of $3.96 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{gprotein}^{-1}$, at day 10]. Continuous

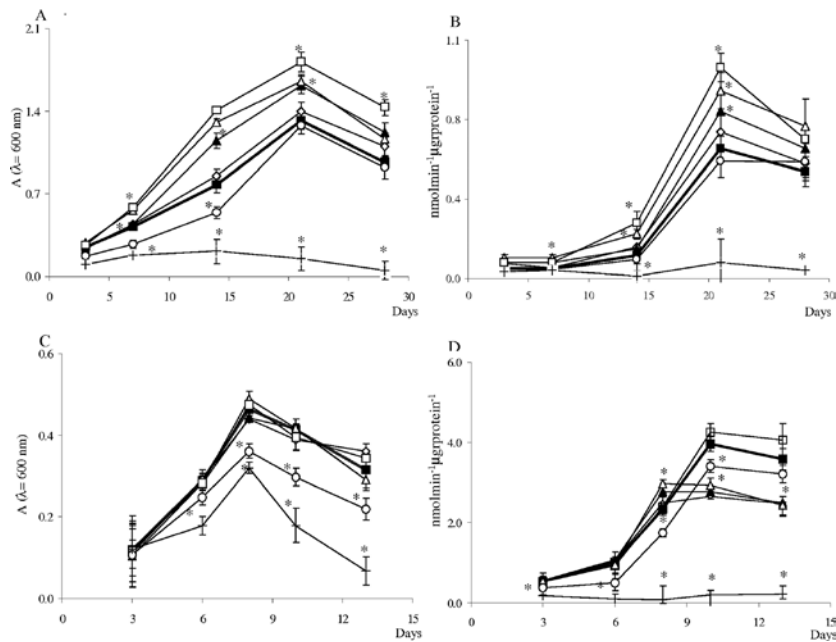


Figure 2. Effect of nicotine in the cell viability/proliferation (A and C) and ALP activity (B and D) of human osteoblastic cells cultured on titanium implants for 28 days. A and B: HBM cells; C and D: Saos-2 cells. Control cultures (■). Cultures exposed to nicotine: $0.0001 \text{ mg mL}^{-1}$ (◇), 0.01 mg mL^{-1} (▲), 0.1 mg mL^{-1} (△), 0.2 mg mL^{-1} (□), 0.3 mg mL^{-1} (○), and 0.5 mg mL^{-1} (+). *Significantly different from control cultures.

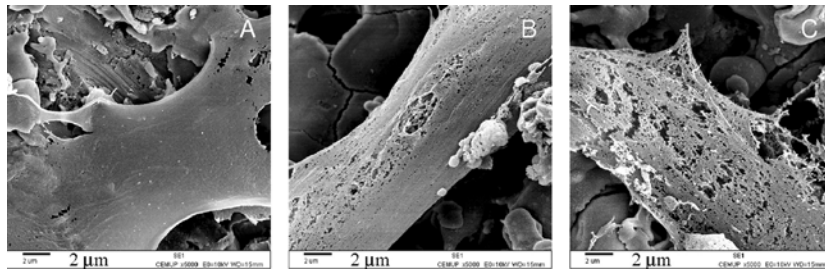


Figure 3. Effect of nicotine in the morphologic appearance of HBM cells cultured on titanium implants for 7 days. Control cultures (A). Cultures exposed to 0.3 (B) and 0.5 (C) mg mL^{-1} nicotine. Nicotine caused a dose-dependent vacuolation of the cytoplasm.

exposure to nicotine did not result in any apparent effect in cell proliferation at levels up to 0.2 mg mL^{-1} [Fig. 2(C)], and caused a dose-dependent inhibition

at higher concentrations; however, cell growth was still significant in the presence of 0.5 mg mL^{-1} (30% inhibition, compared to control). Low nicotine levels, up to 0.1 mg mL^{-1} , caused a slight positive effect in ALP activity at day 8; in addition, compared to control, maximal levels, although lower, were attained earlier (around day 8), and decreased afterwards. Cultures exposed to 0.2 mg mL^{-1} were similar to control, but the presence of 0.3 mg mL^{-1} resulted in decreased ALP activity and maximal values being attained later, between days 10 and 13. At higher nicotine levels, ALP was practically absent. As in HBM cells, vacuolation of the cytoplasm was observed in the presence of 0.5 mg mL^{-1} nicotine (not shown).

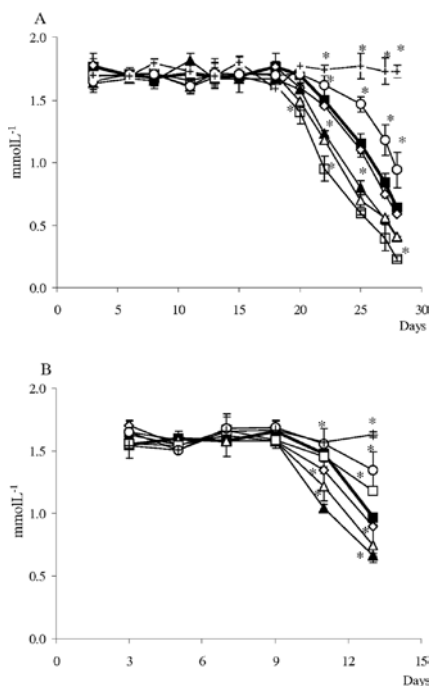


Figure 4. Levels of ionized calcium (Cai) measured in the culture medium from control and nicotine exposed-cultures throughout the culture time. A: HBM cells; B: Saos-2 cells. Control cultures (■). Cultures exposed to nicotine: 0.0001 mg mL^{-1} (◇), 0.01 mg mL^{-1} (▲), 0.1 mg mL^{-1} (△), 0.2 mg mL^{-1} (□), 0.3 mg mL^{-1} (○), and 0.5 mg mL^{-1} (+). *Significantly different from control cultures.

Matrix mineralization

In control seeded implants, Cai levels in the medium [Fig. 4(B)] began to decrease around day 11. Cultures exposed to nicotine up to 0.1 mg mL^{-1} showed an earlier onset of calcium deposition, around day 9. By contrast, the presence of 0.2 and 0.3 mg mL^{-1} resulted in a negative effect, reflected by a slower rate of calcium deposition. Cai levels regarding the cultures treated with 0.5 mg mL^{-1} did not change during the culture period. SEM observation at days 11 and 13 (Fig. 6) showed that, compared to control, abundance of calcium phosphate deposits was higher in the cultures exposed to 0.01–0.1 mg mL^{-1} and lower in those treated with 0.2 and 0.3 mg mL^{-1} . Mineral deposits were not observed in the presence of higher nicotine levels (not shown).

DISCUSSION

The success of dental implants depends on the efficient and stable interaction between bone cells and the biomaterial. In the rehabilitation of partial edentulous patients, the relevant cellular elements come

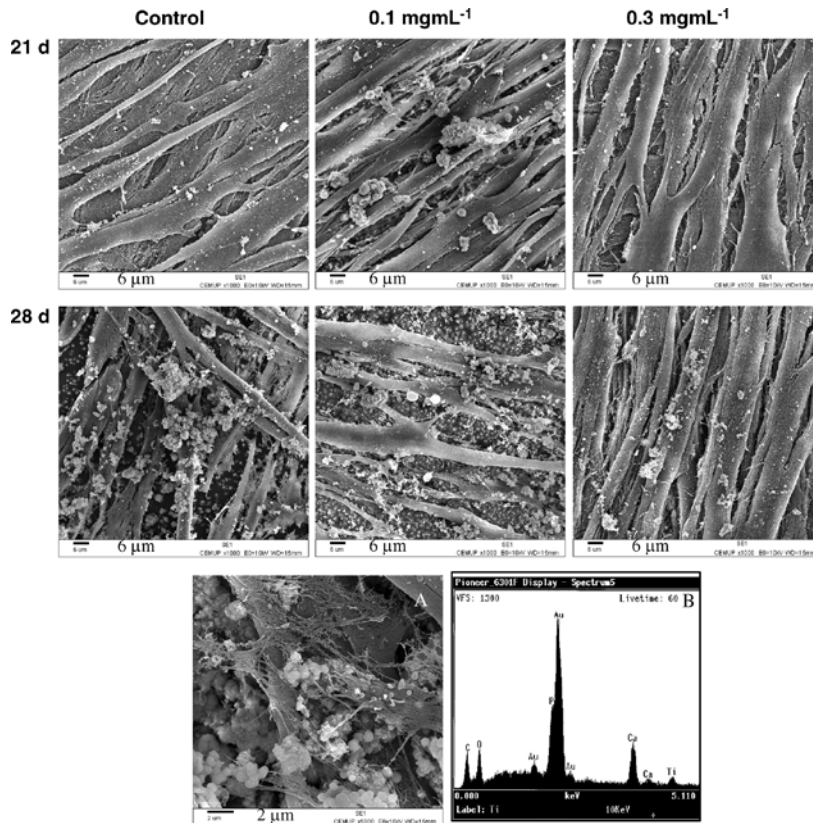


Figure 5. Effect of nicotine in the matrix mineralization by HBM cells cultured on titanium implants. SEM photographs. A: High magnification appearance of the mineralized cell layer at day 28 (cultures exposed to 0.1 mg mL^{-1}), showing mineralized globular structures in close association with the cell layer. B: representative X-ray spectrum of the mineralized structures. As compared to control, abundance of mineralized calcium phosphate deposits was higher in the implants exposed to 0.1 mg mL^{-1} and lower in those treated with 0.3 mg mL^{-1} .

mostly from the adjacent alveolar bone, whereas in long-term edentulous patients, bone marrow is the main source of these cells as implants are placed in the basal bone of the edentulous jaws. In culture, HBM and alveolar bone cells express a similar proliferation/differentiation sequence and, at appropriate experimental conditions, both represent useful models of the osteoblastic phenotype.^{37,40,41} The present work describes the effect of nicotine in the behavior of HBM and Saos-2 osteoblastic cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants. The concentration range tested, representative of the plasma and salivary levels of nicotine attained in the tobacco users, took in account that both systemic and local (resulting from rapid tissue diffusion in

the oral cavity) effects appear to play a role in the negative impact of tobacco components on the osseointegration/maintenance of dental implants.^{13,15}

HBM cells growing in the presence of ascorbic acid, β -glycerophosphate, and dexamethasone presented a gradual proliferative phase extending for 3 weeks followed by a senescence process [Fig. 2(A)], a significant increase in ALP activity during the third week [Fig. 2(B)], and the formation of calcium phosphate deposits intimately associated with the cell layer at late incubation times (Figs. 4 and 5). This suggests a progressive differentiation, representative of that established for the development of the osteoblastic phenotype.⁴² Nicotine appears to affect normal osteoblastic cells in a dose-dependent manner,

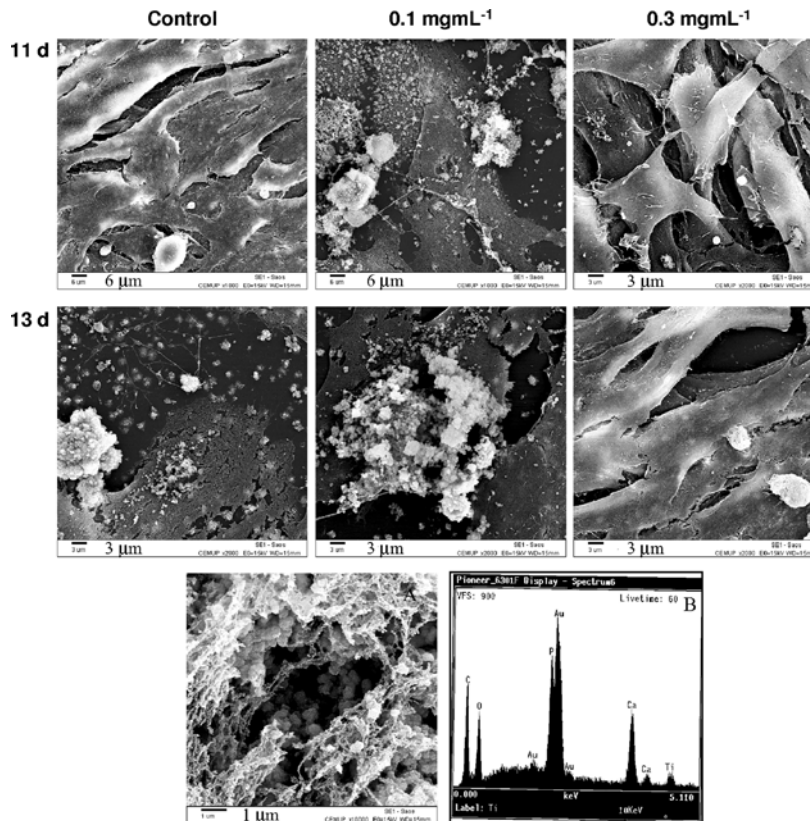


Figure 6. Effect of nicotine in the matrix mineralization by Saos-2 cells cultured on titanium implants. SEM photographs. A: High magnification appearance of the mineralized cell layer at day 13 (cultures exposed to 0.1 mg mL^{-1}), showing mineralized globular structures in close association with the cell layer. B: representative X-ray spectrum of the mineralized structures. As compared to control, mineral deposition was higher in the seeded implants exposed to 0.1 mg mL^{-1} and lower in those treated with 0.3 mg mL^{-1} .

that is, stimulatory effects in the cell proliferation and ALP activity associated with an earlier onset of matrix mineralization with levels up to 0.2 mg mL^{-1} , and deleterious effects at higher concentrations.

Saos-2 cells showed a poorly proliferative population [Fig. 2(C)] that expressed high ALP activity since the beginning of the incubation [Fig. 2(D)] and formation of a mineralized cell layer (Fig. 6) soon after the addition of a source of phosphate ions (β -glycerophosphate, at day 7), in line with that reported for this culture system.^{38,39} This behavior is representative of a late differentiated osteoblastic population, which probably explains the results observed in the presence of nicotine levels up to 0.1 mg mL^{-1} , that is, lack of effect on cell proliferation but responsiveness

of the mineralization process, with an evident earlier onset of mineral deposition. Higher levels resulted in dose-dependent negative effects.

Nicotine caused a dose-dependent vacuolation of the cytoplasm at concentrations higher than 0.2 mg mL^{-1} , a process previously observed in mouse macrophages⁴³ and osteoblasts from chick embryo calvariae.⁴⁴ Weak organic bases, such as nicotine, are known to accumulate in lysosomes by membrane permeation and trapping by protonation⁴⁵; as the base concentration within the lysosomes increases, water enters osmotically and these structures swell into large vacuoles.

Data regarding the implants seeded with HBM cells suggest that the pattern of *in vitro* osteogenesis

observed in the presence of nicotine might be related, at least partially, with the dose-dependent effects in cell proliferation and ALP activity. It is known that proliferation of osteoblastic cells is functionally related to the synthesis of an appropriate collagenous matrix which is essential to osteoblastic differentiation,⁴² as suggested by several studies showing that an increase in the amount of the collagenous matrix is associated with a higher ALP production.^{42,46} This enzyme plays an important role in the mineralization of the collagenous bone matrix by providing the increased local phosphate concentration required for the initiation of hydroxyapatite nucleation and crystallization, being subsequently down-regulated.⁴⁷ In the present work, results suggest that the anticipation of mineral deposition by HBM cells resulting from exposure to 0.01–0.2 mg mL⁻¹ nicotine might be associated with the positive effect on cell proliferation, with expected increase in the amount of the extracellular matrix produced. However, results observed in the implants seeded with Saos-2 cells showed earlier mineral deposition upon exposure to 0.01–0.1 mg mL⁻¹ nicotine, in the absence of apparent effects on cell growth rate, suggesting an effect in the functional activity. Also, cell behavior observed in the presence of 0.5 mg mL⁻¹ nicotine, that is, only a 30% inhibition in the cell proliferation but synthesis of negligible levels of ALP, is also suggestive of an altered cell function.

The few studies reported in the literature regarding the influence of nicotine on *in vitro* mineralization come from culturing osteoblastic cells on standard tissue culture plates.^{48,49} Yuhara et al.⁴⁸ reported that nicotine, 0.06 to 1.5 mM (0.01 to 0.25 mg mL⁻¹), stimulated ALP activity and the rate of calcium deposition by ROB-C26 cells, in a dose-dependent manner, but both parameters decreased in MC3T3-E1 cells that have been exposed to the same nicotine levels. In Saos-2 cells exposed to 10⁻³M (0.17 µg mL⁻¹) nicotine, the appearance of mineralized nodules was delayed and the intensity of alizarin red staining was clearly less than in control cells⁴⁹; this inhibitory effect followed decreased expression of collagen type I, ALP activity and osteopontin.⁴⁹ The great variability of results regarding osteoblastic response to nicotine^{44,48–54} reflects differences in the experimental conditions, related to the cell culture model (animal/human cells, culture conditions, stage of cell differentiation) and the nicotine exposure (continuous/intermittent, concentration range). The present work showed that a cell system expressing a normal proliferation/differentiation behavior, that is, HBM cells, has the advantage of providing information along the osteoblastic differentiation pathway, compared to that observed with the osteosarcoma cell line Saos-2, allowing mainly the study of late differentiation events.

In an attempt to clarify the mechanism involved in the cell response to nicotine, Walker et al.⁵¹ showed that nicotine increases *c-fos* transcript expression in human trabecular bone-derived osteoblasts at levels (0.1–1 µM) that caused increased cell proliferation. In addition, this study demonstrated the presence of the nicotinic receptor subunit α4 and, also, that D-tubocurarine, a nicotinic receptor antagonist, inhibited nicotine-induced cell proliferation.⁵¹ Increased expression of *c-fos* genes and α-7 nicotinic receptor was also reported in Saos-2 cells exposed to 10⁻³M nicotine.⁵⁴ It was speculated that changes in the intracellular levels of Ca²⁺ ions, following binding of nicotine to its receptor and subsequent activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels, may modulate, at least in part, the effects of nicotine on bone metabolism.⁵¹ Related to this, it was reported that a voltage-dependent Ca²⁺ channel antagonist increased ALP activity of mouse osteoblastic cells.⁵⁵ Also it is known that osteoblastic cells respond to calcium in a time and concentration manner, regarding proliferation and expression of several markers.^{56,57} These observations suggest that osteoblasts response to nicotine might be mediated, at least partially, by changes in cellular levels of calcium ion.

In conclusion, nicotine caused a dose-dependent effect on matrix mineralization by HBM and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants, reflected by an earlier onset of cell-mediated calcium phosphate deposition at levels up to 0.1–0.2 mg mL⁻¹, and deleterious effects (delayed and absence of mineral deposition) at higher concentrations. Modulation of *in vitro* osteogenesis by nicotine was observed in the presence of relatively high levels, in the range of those present in saliva of tobacco users. Although saliva does not contact directly with the bone/implant interface, the probability of significant tissue diffusion of tobacco components is strongly suggested by the clinical studies of Lambert et al.¹⁵ and Haas and Haimböck¹³ clearly correlating implant failure with a continued local deleterious effect. Nicotine is a small and lipophilic molecule²³ and considering the permeability features of the gingival implant epithelium^{35,36} the possibility of a local role of nicotine in modulating bone formation events at the implant surface might be hypothesized.

The plasma-sprayed titanium implants were kindly provided by Straumann.

References

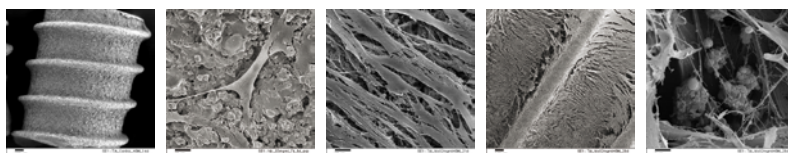
1. Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J. Osseointegration: Historic background and current concepts. In: Lindh J, Karring T, Niklaus PL, editors. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p 809–820.

2. Block SM, Achong MR. Osseointegration. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen EP, Waite PD, editors. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2nd ed. London: BC Decker; 2004. p 189–203.
3. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Biomed Mater Res* 1994;39:77–85.
4. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311–2321.
5. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindh J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:251–262.
6. Leonardi D, Garg AK, Pecora GE. Osseointegration of rough acid-etched titanium implants: 5-year follow-up of 100 mini-matic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;14:384–391.
7. Duyck J, Naert I. Failure of oral implants: Aetiology, symptoms and influencing factors. *Clin Oral Invest* 1997;2:102–114.
8. Esposito M, Hirsch J, Lehholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721–764.
9. Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106:527–551.
10. Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fugisawa, K Yamuchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on osseointegrated implant: A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:473–478.
11. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:609–615.
12. De Brun H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994;5:260–264.
13. Haas R, Haimböck W. The relationship of smoking on peri-implant tissue: A retrospective study. *J Prosthet Dent* 1996;76:592–596.
14. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: A 10-year follow-up study. *J Dent Res* 1997;76:1667–1674.
15. 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.
16. Ekfeldt A, Christiansson U, Ericksson T, Linden U, Lunqvist S, Rundcrantz T, Johansson LA, Nilner K, Bilstrom C. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:462–467.
17. Nociti FHJ, Neto CJB, Carvalho MD, Sallum AW, Sallum EA. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002;73:982–987.
18. Stefani MC, Filho GR, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: A histometric study in rabbits. *J Periodontol* 2002;73:206–212.
19. César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003;74:1445–1459.
20. César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: A histological study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:713–719.
21. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:389–395.
22. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. An experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005; 268–276.
23. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 1986;37:21–32.
24. Hollinger OJ, Schmitt JM, Buck D, Hwang K. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294–301.
25. Silcox D, Daftari KT, Boden MK, Shimandle JH, Hutton WC, Whitsides TE Jr. The effect of nicotine on spine fusion. *Spine* 1995;20:1549–1553.
26. Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *BMJ* 1976;1:1043–1046.
27. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *BMJ* 1980;280:972–976.
28. 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.
29. 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.
30. Cuff MJ, 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. Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981;41:4305–4308.
32. 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.
33. Balatsouka D, Gotfredsen K, Sorensen L, Lindh CH, Berglundh T. Effect of systemic administration of nicotine on healing in osseous defects. An experimental study in rabbits. Part II. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:488–494.
34. 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.
35. Squier CA. Penetration of nicotine and nitrosornicotine across porcine oral mucosa. *J Appl Toxicol* 1986;6:123–128.
36. Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido M, Ayukawa Y, Inoue T, Koyano K, Tanaka T. Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:243–251.
37. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cells cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid, β -Glycerophosphate and dexamethasone on osteoblast differentiation. *Biomaterials* 2000;21:1095–1102.
38. McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone* 1995;16:415–426.
39. Ahmad M, McCarthy M, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant material. *Biomaterials* 1999;20:211–220.
40. Coelho MJ, Trigo Cabral A, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: Osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and DMEM. *Biomaterials* 2000;21:1087–1094.
41. Fernandes HR, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mater Sci: Mater Med* 1997;8:61–65.
42. Stein G, Lian J. Molecular mechanisms mediated proliferation—Differentiation interrelationships during progressive

- development of the osteoblast phenotype: Update. *End Rev* 1995;4:290-297.
43. Ohkuma S, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J Cell Biol* 1981;90:656-664.
 44. 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.
 45. De Duve C, De Barsey T, Trouvet A, Tulkens P, Van Hoof F. Commentary: Lysosomotropic drugs. *Biochem Pharmacol* 1974;23:2495-2531.
 46. Lynch M, Stein J, Stein G, Lian J. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35-44.
 47. Bellows CG, Aubin JE, Heersch JNM. 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.
 48. 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.
 49. Tanaka H, Tanabe N, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M, Maero M. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sci* 2005;77:2273-2284.
 50. 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.
 51. 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.
 52. Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma* 2005;19:17-22.
 53. Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone III JE, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 2006;17:121-127.
 54. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Yamanaka K, Oka H, Motohashi M, Maeno M. Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 2006;38:874-872.
 55. Kosaka N, Uchü M. Effect of benidipine hydrochloride, a dihydropyridine-type calcium antagonist, on the function of mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 1998;62:554-556.
 56. Eklon-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, Pointillart A. Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro. *Cell Tissue Res* 1998;292:163-171.
 57. Dvorak M, Siddiqua A, Ward D, Howard DC Carter, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calcitropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5140-5145.

CAPÍTULO III

EFEITO CUMULATIVO DA NICOTINA, ACROLEINA E ACETALDEIDO NO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS CULTIVADAS EM IMPLANTES DE TITÂNIO



PUBLICAÇÃO I

**Exposure of osteogenic-induced bone marrow cells cultured on
plasma-sprayed titanium implants to the simultaneous effects of nicotine,
acrolein and acetaldehyde**

Submetido para publicação ao *International Journal of Maxilofacial Implants*

Title:

Exposure of osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants to the simultaneous effects of nicotine, acrolein and acetaldehyde

Authors:

M.L. Pereira, J.C. Carvalho, F. Peres, M.H. Fernandes

Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, Portugal

Correspondence to:

M.H. Fernandes

Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto

Rua Dr Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, Portugal

Tel: +351 220 901 100

Fax: +351 220 901 101

e-mail: mhfernandes@fmd.up.pt

Abstract

Objectives. To evaluate the potential interaction/contribution of inductive and deleterious effects of tobacco compounds on human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants exposed to combinations of nicotine, acrolein and acetaldehyde. Cell response was assessed as proliferation and function.

Material and Methods. Titanium implants, seeded with human bone marrow derived cells (first subculture), were cultured in osteogenic-inducing conditions for 28 days in the absence (control) and in the presence of tobacco compounds to access (i) the dose-dependent profile of acrolein (0.01 – 0.12 mM) and acetaldehyde (0.1 – 6 mM) and (ii) the effect of the simultaneous exposure to combinations of nicotine, acrolein and acetaldehyde. In the later experiments, seeded implants were exposed to (i) nicotine 1.2 mM, known to have inductive effects on cell behaviour, with acrolein, acetaldehyde, or both, at IC₅₀ and (ii) nicotine 2.4 mM, reported to elicit deleterious effects on cell behaviour, with acrolein, acetaldehyde, or both, at IC₅₀.

Results. Acrolein and acetaldehyde caused dose-dependent inhibitory effects at levels similar and higher than 0.03 and 0.1 mM, respectively; IC₅₀ regarding cell viability/proliferation and alkaline phosphatase was 0.06 mM for acrolein and 0.3 mM for acetaldehyde. Matrix mineralization was prevented at levels higher than 0.03 mM acrolein and 0.1 mM acetaldehyde. Exposure to a combination of nicotine 1.2 mM with acrolein (0.06 mM), acetaldehyde (0.3 mM) or both resulted in a cell behaviour intermediate of that observed in nicotine-treated cultures (induced cell response) and aldehydes-treated cultures (deleterious cell response). On the other hand, exposure to nicotine 2.4 mM with acrolein (0.06 mM), acetaldehyde (0.3 mM) or both caused cumulative cytotoxic responses elicited by the three compounds at these levels.

Conclusion: Results suggest that interactions of tobacco compounds over osteoblasts, cells responsible for bone formation events, might contribute to the overall effects of tobacco use on implant osseointegration and long-time survival.

Keywords: Nicotine; acrolein; acetaldehyde; plasma-sprayed titanium implants; human osteoblastic cells; proliferation and differentiation.

1. Introduction

In the past few years the application of dental implants has constantly increased with low failure rates. Despite being a high success treatment, failures occur and, although factors such as implant type and length, location and bone quality of the receptor affect dental implants performance, tobacco use is considered to be a significant predisposing factor of implant failure and peri-implantitis development.¹⁻³ Accordingly, a variety of clinical studies shows that tobacco use is detrimental to implant success.⁴⁻¹⁰

The mechanism by which tobacco use affects the osseointegration and survival of the implant, i.e. the ability to maintain a proper bone metabolism at the bone/implant interface, is not fully characterized. Cigarette smoke is a complex mixture of over 4000 chemical compounds, and many are likely to have potential toxicities in human tissues including the bone tissue.¹¹ Nicotine is a major component and is present in plasma and saliva of tobacco consumers with levels ranging from 4 to 73 ng/ml (0.024 – 0.44 µM) and 96 ng/ml to 1.6 mg/ml (0.58 µM to 9.6 mM), respectively.^{12,13} Nicotine has a high diffusion potential and is the compound more frequently implicated in the deleterious effects observed in bone regeneration events. In animal studies, nicotine is reported to cause negative effects on bone healing in several conditions,¹⁴⁻¹⁷ most probably by a combination of effects, among others its classical vasoconstrictor action¹⁸ and direct effects on the proliferation and function of bone cells, according to a variety of *in vitro* studies.¹⁹⁻²⁸ Interestingly, several animal studies failed to demonstrate a significant influence of nicotine on bone healing around dental implants.²⁹⁻³² However, in the same animal models, authors showed that cigarette smoke inhalation, normalised to obtain similar nicotine levels, caused impaired healing, suggesting that other bioactive substances might play a role to the overall negative effects on implant performance.^{33,34} Among them, acrolein and acetaldehyde are reactive aldehydes detected in saliva of smokers, attaining concentrations of 5.5 to 38.2 µM and 0.312 to 1.986 mM, respectively.³⁵ These aldehydes are known to be cytotoxic to neutrophils,^{36,37} bronchial epithelial cells,³⁸⁻⁴¹ lymphocytes,⁴² gingival fibroblasts⁴³⁻⁴⁵ and osteoblastic cells.^{46,47}

A variety of clinical studies strongly suggests that the local exposure of the peri-implant tissue to tobacco components has a key contribution to the higher prevalence of implant failure among smokers.^{6,7,9} This might be anticipated considering the high levels of tobacco compounds detected in the oral fluids of smokers^{12,13,35} and several

local factors which potentially favour the presence of these substances at the bone/implant interface. Thus, experimental studies showed that the junctional peri-implant epithelium, although structurally and functionally identical to junctional epithelium around natural teeth, presents a higher level of permeability to exogenous substances.⁴⁸ In addition, tissue diffusion is favoured by the concentration gradient and also the increased cell permeability promoted by cigarette smoke⁴⁹ and nicotine.⁵⁰ Another factor is likely to be the penetration of salivary fluids in the peri-implant mucosa at the level corresponding to the position of the microgap between the fixture and the abutment, namely in implant systems with screw-retained abutments.^{51,52} In the majority of the implant systems, the microgap is positioned at the level of the alveolar bone crest, making the interface bone/implant more susceptible to direct effects of substances present in oral fluids.

In previous studies, we addressed the effect of nicotine, at levels representative to those found in plasma and saliva of tobacco users, in the behaviour of human osteoblastic cells seeded on plasma-sprayed titanium implants.^{27,28} Salivary concentrations up to 1.2 mM promoted cell viability/proliferation and alkaline phosphatase activity and the presence of higher levels resulted in dose-dependent deleterious effects.^{27,28} In addition, a similar profile was observed regarding matrix mineralization, both in human bone marrow and Saos-2 cells.²⁸ Considering the potential number of bioactive compounds that can be found in the oral fluids of smokers^{12,13,35} and the factors mentioned above favouring their presence in the bone/implant environment,⁴⁸⁻⁵² complex interactions on bone cell behaviour might be anticipated. The present work has two main objectives. First, to characterize the dose-dependent profile of acrolein and acetaldehyde on the proliferation and differentiation of human osteoblastic bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants, as this issue was not previously addressed. Second, based on these results, evaluate the effect of the simultaneous exposure of human osteoblastic cells to nicotine, acrolein and acetaldehyde. To accomplish this, cells seeded on plasma-sprayed titanium implants were exposed to a combination of (i) nicotine 1.2 mM, reported to have inductive effects on cell behaviour,^{27,28} with acrolein, acetaldehyde, or both, at IC₅₀ and (ii) nicotine 2.4 mM, found to elicit negative effects on cell behaviour,^{27,28} with acrolein, acetaldehyde, or both, at IC₅₀. Seeded implants were analysed for cell proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), total protein content and matrix mineralization.

2. Materials and Methods

2.1 Implants

Commercially Straumann® screw shaped Titanium implants, 8 mm length, were used in this study. The implant surface was a TPS (titanium plasma spray) surface, i.e. the titanium implant was coated with a high purity titanium powder. TPS implants were used as supplied by the manufacture, with all packing being removed under aseptic conditions.

2.2 Cell cultures

Primary cultures were established from human bone marrow obtained from three healthy male donors submitted to corrective orthopaedic surgery involving the hip joint, with informed consent. Bone marrow suspension was cultured in α -minimal essential medium (α -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin (100 IUmL⁻¹ and 10 mgmL⁻¹, respectively), 2.5 μ gmL⁻¹ fungizone and 50 μ gmL⁻¹ ascorbic acid, and incubated in an humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, at 37 °C. Cultures were maintained until 70 – 80% confluence (10-15 days) and, at this stage, adherent cells were enzymatically released using 0.04% trypsin in 0.25% EDTA. The cell suspension, at a density of 10⁴ cellscm⁻², was poured on the surface of TPS titanium implants, and cells were allowed to attach for 24 h. Following, seeded implants were cultured for 28 days in the absence (control) and in the presence of tobacco compounds, in a medium further supplemented with β -glycerophosphate (10 mM) and dexamethasone (10 nM). Seeded implants were exposed continuously to nicotine [(-) Nicotine ([-]-1-Metyl-2-3- pyrrolidine)] (Sigma N-3876), acrolein (Aldrich 11,022-1) and acetaldehyde (Aldrich 40,278-3), alone or in combination, in the experimental conditions detailed below. Tobacco smoke compounds, in the culture medium, were renewed at each medium change, three times a week.

Control and exposed cultures were characterized at days 7, 14, 21, and 28 for cell viability/proliferation (MTT assay), total protein content, ALP activity and matrix mineralization.

2.2.1 Dose-dependent profile of acrolein and acetaldehyde

Titanium implants seeded with human bone marrow cells were exposed, from day 1 to day 28, to (i) acrolein, 0.01, 0.03, 0.06, 0.08 and 0.12 mM and (ii) acetaldehyde, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 and 6 mM, in the experimental conditions described above. This set of experiments allowed the establishment of the IC₅₀ of these aldehydes regarding cell viability/proliferation and ALP activity.

2.2.2 Simultaneous exposure to nicotine, acrolein and acetaldehyde

Titanium implants seeded with human bone marrow cells were exposed, from day 1 to day 28, to combinations of nicotine, acrolein and acetaldehyde. Nicotine was added to the cultures at 1.2 and 2.4 mM, concentrations reported previously to cause, respectively, inductive and deleterious effects in human osteoblastic cells cultured in similar conditions.^{27,28} Acrolein and acetaldehyde were used at concentrations around IC₅₀ regarding cell viability/proliferation and ALP activity, respectively 0.06 and 0.3 mM, based on the results observed in the study described in the previous section. Two set of experiments were performed:

- simultaneous exposure to inductive and deleterious effects of tobacco compounds, namely (i) nicotine 1.2 mM + acrolein 0.06 mM, (ii) nicotine 1.2 mM + acetaldehyde 0.3 mM, and (iii) nicotine 1.2 mM + acrolein 0.06 mM + acetaldehyde 0.3 mM;
- simultaneous exposure to deleterious effects of tobacco compounds, namely (i) nicotine 2.4 mM + acrolein 0.06 mM, (ii) nicotine 2.4 mM + acetaldehyde 0.3 mM, (iii) acrolein 0.06 mM + acetaldehyde 0.3 mM, and (iv) nicotine 2.4 mM + acrolein 0.06 mM + acetaldehyde 0.3 mM.

In addition to control experiments (absence of tobacco compounds), cell behavior was also assessed in the presence of the isolated compounds, i.e. nicotine 1.2 and 2.4 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM.

2.3 Cell viability/proliferation

MTT assay, based on the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), was used to estimate cell viability/proliferation,

based on metabolic cell activity. Seeded implants were transferred to clean wells and incubated with 0.5 mgmL^{-1} of MTT for the last 4 h of the culture period tested; the medium was then decanted, formazan salts were dissolved with dimetilhylsulphoxide and the absorbance (A) was determined at 600 nm.

2.4 Protein content and ALP activity

Total protein content of the cell layer was evaluated in 0.1 M NaOH cell lysates by the Lowry's method, with bovine serum albumin used as a standard.

ALP activity was assayed in lysates of the cell layer (treatment with 0.1% of Triton) by the hydrolyses of *p*-nitrophenyl phosphate in an alkaline buffer solution, pH 10.3, and colorimetric determination of the product (*p*-nitrophenol) at 405 nm. Hydrolyses was carried out for 30 min at 37 °C. ALP activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol produced per min per microgram of total protein ($\text{nmol}/\text{min}.\mu\text{gprotein}^{-1}$).

2.5 Matrix mineralization

The presence of mineralized deposits in the cell layer growing on the implants was inferred from the consumption of ionized calcium (Cai) throughout the incubation time, as Cai (in association with Pi) is consumed in the formation of calcium phosphate deposits in the extracellular matrix during the mineralization process. Seeded implants were also observed by scanning electron microscopy (SEM) for the detection of mineralized structures associated with the cell layer.

Cai consumption. Culture medium from cultures grown in the absence and in the presence of tobacco compounds was collected at each medium change (every 2-3 days during the culture time) and stored at -20 °C. Analyses of Cai levels were conducted using a Sigma Diagnostic Kit (N-587). Results were expressed in mmol per litre (mmoL^{-1}). The measured Cai levels were not cumulative, reflecting the variation occurring between each medium change (intervals of 2-3 days).

SEM observation. At defined time-test, the cultures were washed twice with PBS, fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.14 M sodium cacodylate buffer for 10 min, and dehydrated in graded alcohols (70, 80, 2 x 90, and 99.8%). After critical-point drying, samples were sputter coated with gold and observed on a Jeol JSM 6310F SEM equipped with an X-ray energy dispersive (EDX) spectroscopy voyager XRMA system (Noran instruments).

2.6 Statistical analysis

Three independent experiments were performed with cultures established from different individuals. In each experiment, three replicates were accomplished. Means and standard deviations of a typical experiment are shown. Statistical analysis was done by one way analyses of variance (ANOVA). The statistical differences between control implants and those exposed to tobacco smoke compounds were determined by the Bonferroni's method. P-values ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Dose-dependent profile of acrolein and acetaldehyde

3.1.1 Cell viability/proliferation

Titanium implants seeded with human bone marrow cells were exposed continuously to acrolein (0.01 to 0.1 mM) and acetaldehyde (0.1 to 6 mM). Results regarding cell viability/proliferation and cell morphology at day 14 are shown in Figure 1.

On the MTT assay, control implants (absence of the aldehydes) showed an increase in cell viability/proliferation during the first three weeks, and a decrease after that; maximal values were attained by day 21. Acrolein (Figure 1A) and acetaldehyde (Figure 1D) caused dose-dependent inhibitory effects at levels similar and higher than 0.03 and 0.1 mM, respectively, with IC_{50} being around 0.06 and 0.3 mM for acrolein and acetaldehyde. In the presence of acrolein 0.12 mM and acetaldehyde 6 mM reduction of the MTT was almost absent.

SEM observation of the control implants (Figure 1G-I) showed that, at day 14, cells adapted to the surface topography and formed a cell layer (Figure 1H), displaying an abundant fibrillar matrix (Figure 1I). Cultures treated with the lower concentrations of the aldehydes (0.01 mM acrolein and 0.1 mM acetaldehyde) presented a similar behaviour (not shown). At higher levels, dose-dependent negative effects were observed with evident alteration of the cell morphology, disruption of cell orientation and presence of cellular debris, as shown in Figure 1B,C and 1E,F, for acrolein and acetaldehyde, in 14-day cultures.

3.1.2 Functional activity

Figure 2 shows the behaviour of the seeded implants regarding osteoblastic function, namely ALP activity, consumption of Cai from the culture medium and SEM observation at day 28 for the search of mineralized deposits in the extracellular matrix.

In control seeded implants, synthesis of ALP occurred mainly during the third week with maximal levels attained by day 21. The dose-dependent effect of acrolein (Figure 2A) and acetaldehyde (Figure 2D) was similar to that found in the MTT assay, i.e. IC₅₀ were around 0.06 and 0.3 mM for acrolein and acetaldehyde, respectively.

Cai levels in control implants (Figure 2 B,E) were approximately constant until day 21 but decreased significantly in the last week of culture, suggesting the formation of calcium-containing mineral deposits in the cell layer. In the aldehydes-treated cultures, Cai levels in the medium decreased in the presence of 0.01 and 0.03 mM acrolein (Figure 2B) and 0.1 mM acetaldehyde (Figure 2E), although with a slower rate compared to control. Higher levels prevent the formation of mineralized deposits, as Cai levels were constant throughout the culture period. SEM observation at day 28 was consistent with the pattern of Cai levels in the medium. At control conditions, seeded implants presented mineralized deposits closely associated with the fibrillar cell layer (Figure 2 G,H), containing Ca and P (Figure 2I). Cultures treated with the lower levels of the aldehydes (acrolein up to 0.03 mM and acetaldehyde 0.1 mM) presented a similar behaviour (not shown). Cultures exposed to acrolein 0.06 mM (Figure 2C) and acetaldehyde 0.3 mM (Figure 2F), the IC₅₀ of the aldehydes regarding cell viability/proliferation and ALP activity, did not show evidence of mineralized structures.

3.2 Simultaneous exposure to nicotine, acrolein and acetaldehyde

3.2.1 Exposure to 1.2 mM nicotine, 0.06 mM acrolein and 0.3 mM acetaldehyde

Figure 3 shows the results regarding the exposure of the seeded implants to nicotine 1.2 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM, isolated or in combination, i.e. MTT assay (A,B), ALP activity (C,D), Cai levels in the medium (E) and SEM observation at day 28 (F-J).

Nicotine 1.2 mM caused an induction in cell viability/proliferation (at day 21, approximately 32%). Exposure to acrolein 0.06 mM or acetaldehyde 0.3 mM resulted in an inhibitory effect, around 50% at day 21. Implants exposed simultaneously to nicotine

1.2 mM + acrolein 0.06 mM or nicotine 1.2 mM + acetaldehyde 0.3 mM presented a behaviour intermediate of that observed in the presence of the isolated compounds, i.e. values of MTT were lower than those observed in nicotine-exposed cultures but higher than those measured in the aldehydes-treated cultures, Figure 3A. However, cultures performed in the presence of nicotine + acrolein presented a slightly better performance compared to those exposed to nicotine + acetaldehyde. Simultaneous exposure to nicotine and the two aldehydes resulted in a low proliferation rate, still slightly higher than that observed in the presence of the two aldehydes, Figure 3B. ALP activity in the implants maintained in the various conditions followed a pattern similar to that observed in the MTT assay, Figure 3C,D.

The pattern of Cai levels throughout the culture time is shown in Figure 3E. Compared to control, cultures treated with nicotine 1.2 mM presented a slightly higher rate of Cai consumption from the medium. Cultures exposed to acrolein 0.06 mM or acetaldehyde 0.3 mM, levels associated with a 50% decrease on cell viability/proliferation and ALP activity, were unable to form calcium deposits (Cai levels were constant throughout the culture medium). Cultures treated with nicotine + acrolein presented a behaviour similar to that of control cultures, whereas those exposed to nicotine + acetaldehyde showed a significantly lower, and delayed, decrease in Cai levels. Implants treated simultaneously with nicotine and the two aldehydes presented constant Cai levels throughout the culture time. Accordingly, SEM observation, Figure 3F-J, showed mineralized deposits on control cultures and cultures treated with nicotine, nicotine + acrolein or nicotine + acetaldehyde (very discrete in this situation).

3.2.2 Exposure to 2.4 mM nicotine, 0.06 mM acrolein and 0.3 mM acetaldehyde

Seeded implants were exposed to the isolated or the combined effects of nicotine 2.4 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM. Figure 4 shows the results regarding the MTT assay (A,B), ALP activity (C,D) Cai levels in the culture medium (F) and SEM observation at day 28 (F-J).

Compared to control, exposure of the implants to 2.4 mM nicotine resulted in a significant inhibition on cell viability/proliferation and ALP activity, with 56% and 70% reduction at day 21, respectively. The aldehydes, 0.06 mM acrolein or 0.3 mM acetaldehyde, caused a 50% inhibition on these parameters. In the three experimental situations, Cai levels were constant throughout the culture time and no mineralized

deposits were evident on SEM observation. Treatment with a combination of the two aldehydes or a combination of nicotine and one of the aldehydes resulted in decreased values on the MTT assay and ALP activity, compared to those observed in the presence of the single compounds. Simultaneous exposure to nicotine and the two aldehydes further enhanced the deleterious effects on cell behaviour. At late incubation times, only few cells, presenting a disrupted morphology, remained on the implant surface, as observed by SEM.

4. Discussion

In the present work, plasma-sprayed titanium implants seeded with first passage human bone marrow cells were cultured in osteogenic-inducing conditions, i.e. in the presence of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone.⁵³ Cultures were able to exhibit the entire sequence of the osteoblastic differentiation pathway, including the synthesis of high levels of ALP and the formation of a mineralized extracellular matrix, as observed before in this culture system.⁵⁴ The observed behaviour might be considered representative of that occurring *in vivo* in which adhesion of osteoblastic cells on the implant surface and their subsequent proliferation and differentiation is responsible for implant osseointegration.⁵⁵ Thus, this culture system was used to analyse the dose-dependent profile of acrolein and acetaldehyde on osteoblastic cell behaviour. Additionally, the combined effects of nicotine, acrolein and acetaldehyde on cell growth and function were also evaluated.

Titanium implants seeded with osteoblastic bone marrow cells were exposed continuously to acrolein 0.01 – 0.12 mM or acetaldehyde 0.1 – 6 mM. Acrolein 0.03 mM, concentration that is reached in the saliva of heavy smokers (upper limit of 0.038 mM³⁵), caused an impairment in cell viability/proliferation (15%, at day 21) and ALP activity (34%, at day 21), and IC₅₀ for these parameters was around 0.06 mM. Acetaldehyde exhibited dose-dependent deleterious effects within the salivary concentrations measured in moderate and heavy smokers (0.312 – 1.986 mM³⁵); IC₅₀ was around 0.3 mM and levels between 1 and 3 mM caused significant inhibitory effects (around 80%, in cell viability/proliferation and ALP activity, at day 21). In addition, the two aldehydes induced significant alterations on cell morphology. These observations are in line with previous cytotoxicity studies in gingival fibroblasts

reporting that acrolein (0.01 mM – 0.1 mM) and acetaldehyde (0.1 mM – 10 mM) caused inhibitory effects on cell proliferation in a dose-dependent manner⁴³ and morphological alterations such as disassembly and/or disruption of microtubules and vimentin associated filaments, decreased cell size and changes in cell shape,^{44,45} suggesting that the cytoskeleton, a key structure controlling cell behaviour,⁵⁶ is an important cellular target for these compounds. Also, in primary cultures of murine and human bone marrow cells exposed to acetaldehyde (0.018 to 11 mM), a dose-dependent decrease of fibroblast colony-forming units (CFU-F) was observed suggesting a negative effect on the commitment of mesenchymal marrow progenitors to the osteoblastic phenotype.⁴⁷ In the same study, exposure to acetaldehyde impaired cell proliferation in confluent MG-63 and HOBIT cultures.⁴⁷ In addition, Hurley et al⁴⁶ reported decreased osteoblastic activity in fetal bone organ cultures exposed to acetaldehyde (1.8 to 18 mM), namely osteocalcin, collagen type I and ALP activity.

We reported recently that the behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants was significantly affected by the continuous exposure to plasmatic and salivary levels of nicotine.^{27,28} Considering the possibility of complex interactions regarding tobacco compounds at the bone/implant environment, seeded implants were exposed to the simultaneous effects of nicotine, acrolein and acetaldehyde. Nicotine was added to the cultures at 1.2 and 2.4 mM, concentrations reported previously to cause, respectively, inductive and deleterious effects in human osteoblastic cells cultured in similar conditions.^{27,28} Acrolein and acetaldehyde were used at concentrations around IC₅₀ regarding cell viability/proliferation and ALP activity, respectively 0.06 and 0.3 mM, based on the dose-profile experiments also performed in this study.

In the first set of experiments, cultures were exposed to a combination of nicotine 1.2 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM. As expected, nicotine 1.2 mM caused an inductive effect on cell viability and functional activity, in line with previous work.^{27,28} Exposure to nicotine + acrolein or nicotine + acetaldehyde resulted in a poorer performance, however, better than that observed in the presence of each aldehyde. At these conditions, i.e. the two aldehydes being used at IC₅₀, the combination of nicotine + acrolein appeared to exhibit lower toxicity than that associated with nicotine + acetaldehyde. Comparatively, cultures treated with nicotine + acrolein presented a higher proliferation rate, ALP activity and extent of matrix mineralization. In a more complex system, namely the combination of nicotine +

acrolein + acetaldehyde, cell behaviour was greatly affected, with evident influence of the cumulative negative effects caused by the two aldehydes. However, still, MTT values and ALP activity were slightly higher compared to those observed in the presence of acrolein + acetaldehyde, suggesting a contribution of the positive effect elicited by nicotine. These experiments clearly suggest an interaction/contribution of inductive and deleterious effects to the cell response observed during simultaneous exposure to several tobacco compounds.

In the other set of experiments, cell behaviour was analysed in the presence of a combination of nicotine 2.4 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM. Exposure to nicotine 2.4 mM caused a significant decrease on cell viability/proliferation and ALP activity, as observed previously.^{27,28} Cultures treated with nicotine + acrolein or nicotine + acetaldehyde showed a decrease on these parameters. Also, the presence of acrolein + acetaldehyde resulted in lower cell performance compared to that occurring in the presence of each aldehyde. Exposure to the three compounds simultaneously caused a further deterioration of the cell response. In this situation, only few cells, with an altered morphology, remained attached to the implant surface. These observations suggest addition/enhancement of contributing negative effects to the cell response.

The mechanisms involved in the deleterious effects of tobacco compounds in bone metabolism, including bone cell response occurring at the bone/implant interface, are not completely understood. Studies on osteoblastic cell cultures performed in standard tissue culture plates, regarding the dose-effect of nicotine, showed both positive and negative effects on cell growth and functional activity, pointing out several pathways including altered expression of c-fos genes,²² changes in the synthesis of type I collagen, osteopontin and ALP activity,²³ increased and decreased mineralized bone formation,²³ increased expression of cytokines such as IL-6 and TNF- α ²⁴ and metalloproteinases.²⁵ In titanium implants seeded with human osteoblastic cells, nicotine modulated cell proliferation, ALP activity and matrix mineralization in a dose-dependent manner.^{27,28} Involvement of nicotinic receptors appears to play a role in some of these effects.²² On the other hand, acrolein and acetaldehyde are electrophilic compounds and react rapidly with cellular nucleophiles, especially thiols. Important targets include guanine in DNA and cysteine, lysine, histidine and arginine residues in critical regions of nuclear factors, proteases and other proteins, which may result in mutations and altered gene transcription.⁵⁷ Also, these aldehydes rapidly bind and deplete glutathione, as reported in epithelial cells treated with acrolein (25 μ M, 30 min)

and acetaldehyde (1 – 100 mM, 1 h).^{38,39,41} Glutathione is a tripeptide with an important role in protecting cells from oxidants and electrophiles regulating the intracellular levels of reactive oxygen species.⁵⁷ Also, it has a key role in maintaining the cellular thiol redox statues and appears to be a major factor controlling apoptosis.⁵⁷ The depletion of glutathione leads to an accumulation of free radicals,^{38,39,41} affects a wide range of redox-regulated transcription factors and proteins and might render the cells more vulnerable to the effects of cytotoxic electrophilic compounds.⁵⁷

Implant osseointegration and long-time survival are complex and dynamic processes requiring appropriate bone cell activities at the bone/implant interface. Considering the potential number of bioactive compounds that readily dissolves in the oral fluids of smokers and the factors mentioned before,⁴⁸⁻⁵² the presence of tobacco compounds at the bone/implant interface, arising from a local exposure, appears to be a strong possibility and complex interactions regarding cell behaviour might be anticipated. To the best of our knowledge, this is the first report regarding the exposure of osteoblastic cells to a combination of tobacco compounds. Results clearly suggest an interaction/contribution of inductive and deleterious effects to the cell response observed during the exposure to more than one compound, at levels reported to occur in saliva of tobacco users. It should be mentioned that clear differences exist between the *in vitro* conditions used and the eventual *in vivo* exposure at the bone/implant interface. Seeded implants were continuously exposed to fixed concentrations of the tobacco compounds, whereas *in vivo* exposure arising from a local effect is intermittent and, also, with rapidly changing levels because of the salivary clearance, therefore resulting most probably in a lower cytotoxicity. However, in spite of the absence of data regarding the concentration of tobacco compounds attained in the implant environment, the results of the present study suggest that interactions of tobacco compounds over osteoblasts, cells responsible for bone formation events, might contribute to the overall effects of tobacco use on implant osseointegration and long-time survival.

Acknowledgments

This work was supported by Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP). The plasma-sprayed titanium implants were kindly provided by Straumann. Technical assistance of Mr Emanuel Monteiro in the preparation of the samples for SEM observation is acknowledged.

References

1. Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (I). Success criteria and epidemiology. *Euro J Oral Sci* 1998; 106:527-551.
2. Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa M, Yamanchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:473-478.
3. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systemic review and meta-analyses. *J Clin Periodontol* 2007; 34:523-544.
4. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8:609-615.
5. De Brun H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5:260-264.
6. Haas R, Haimböck W. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent* 1996; 76:592-596.
7. 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.
8. DeLuca S, Habsha E, Zarb G. The effect of smoking on osseointegrated dental implants. Part I: implant survival. *Int J Prosthodont* 2006; 19:491-498.
9. Alsaadi G, Quriyem M, van Steenbergh D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. *J Clin Periodontol* 2007; 34:610-617.
10. Sánchez-Perez A, Moya-Villaescusa MJ, Caffesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *J Periodontol* 2007; 78:351-359.
11. Supervía A, Nogués X, Enjuanes A, Vila J, Mellibovsky L, Serrano S et al. Effect of smoking and smoking cessation on bone mass, bone remodeling, vitamin D, PTH and sex hormones. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:234-241.
12. Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J* 1976; 1:1043-1046.
13. Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981; 41:4305-4308.

14. Hollinger O.J., Schmitt JM, Buck D, Hwang K. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:294-301.
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. Silcox D, Daftari KT, Bodden MK, Shimandale J, Hutton CW, Whitesides TE. The effect of nicotine on spine fusion. *Spine* 1995; 20:1594-1553.
17. Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Barbieri D, Moreno HJ, Nociti FG. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration. A histological study in dogs. *J Periodontol* 2004; 75:565-571.
18. Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 2004; 43:619-632.
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. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Tanaka H, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sci* 2005; 77:2273-2284.
24. Kamar AR, El-Ghobar N, Marzec N, Margarone III JE, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 2006; 17:121-127.
25. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Yamanaka K, Oka H et al. Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochim et Biophys Sin* 2006; 38:874-882.
26. Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing

- macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci* 2006; 78:1733-1740.
27. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. *Clin Oral Impl Res* 2008; 19:582-589.
 28. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH. Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants. *J Biomed Mater Res A* 2008; in press.
 29. Stefani MC, Filho GR, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol* 2002; 73:206-212.
 30. Nociti FHJ, Stefani MC, Sallum EA, Duarte PM, Sallum AW. Nicotine and bone density around titanium implants: A histometric study in rabbits. *Implant Dent* 2002; 11:176-182.
 31. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. An experimental study in rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:268-276.
 32. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:389-395.
 33. Nociti FHJ, Neto CJB, Carvalho MD, Sallum AW, Sallum EA. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002; 73:982-987.
 34. Nociti FHJ, César-Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: A histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:347-352.
 35. Annovazzi L, Cattaneo V, Perani E, Zanone C, Rota C, Pecora F et al. High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: methodological challenges for the determination of biologically relevant low-aliphatic aldehydes in human saliva. *Electrophoresis* 2004; 25:1255-1263.
 36. Finkelstein EI, Nardini M, van der Vliet A. Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L732-L739.

37. Finkelstein EI, Ruben J, Koot W, Hristova M, van der Vliet A. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the α,β -unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:L1019-L1028.
38. Grafström RC, Dypbukt MJ, Willey JC. Pathobiological effects of acrolein in cultured human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 1988; 48:1717-1721.
39. Grafström RC, Dypbukt MJ, Atzori L, Sundqvist K, Nielsen I, Curren DR et al. Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis* 1994; 15:985-990.
40. Wang H, Liu X, Umino T, Sköld CM, Zhu Y, Kohyama T et al. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair process. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:772-779.
41. Nardini M, Finkelstein EI, Reddy S, Valacchi G, traber M, Cross CE et al. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Toxicology* 2002; 170:173-185.
42. Lambert C, McCue J, Portas M, Ouyang Y, Li J, Rosano TG et al. Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:916-922.
43. Cattaneo V, Cetta G, Vezzoni F, Gallanti A, Boratto R, Poggi P. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 2000; 71:425-432.
44. Rota MT, Poggi P, Boratto R. Human Gingival Fibroblast Cytoskeleton is a target for volatile smoke components. *J Periodontol* 2001; 72:709-713.
45. Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodont Res* 2002; 37:230-235.
46. Hurley MM, Martin DL, Kream BE, Raisz LG. Effects of ethanol and acetaldehyde on collagen synthesis, prostaglandin release and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Bone* 1990; 11:47-51.
47. Giuliani N, Girasole G, Vescovi PP, Passeri G, Pedrazzoni M. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1999; 23:381-385.

48. Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido MA, Ayukawa Y et al. Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. *Clin Oral Impl Res* 2001; 13:243-251.
49. Nagy J, Demaster EG, Wittmann I, Shultz P, RaijL. Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. *Endothelium* 1997;5:251-263.
50. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:80-85.
51. Piattelli A, Scarano A, Paoloantonio M, Assenza B, Leghissa GC, Di Boaventura G et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. *J Periodontol* 2001; 72:1146-1150.
52. Nascimento C, Barbosa RES, Issa JPM, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37:177-180.
53. Jørgensen NR, Henriksen Z, Sørensen OH, Civitelli R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids* 2004; 69:219-226.
54. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cells cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -Glicerophosphate and dexamehasone on osteoblast differentiation. *Biomaterials* 2000; 21:1095-1102.
55. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; 67:932-949.
56. Cooper MG, Hausman RE. The cytoeskeleton and cell movement. In: Cooper MG, editor. *The cell: a molecular approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 2007: 473-526.
57. Stevens J, Maier CS. Acrolein: Sources, metabolism and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:7-25.

Figure 1

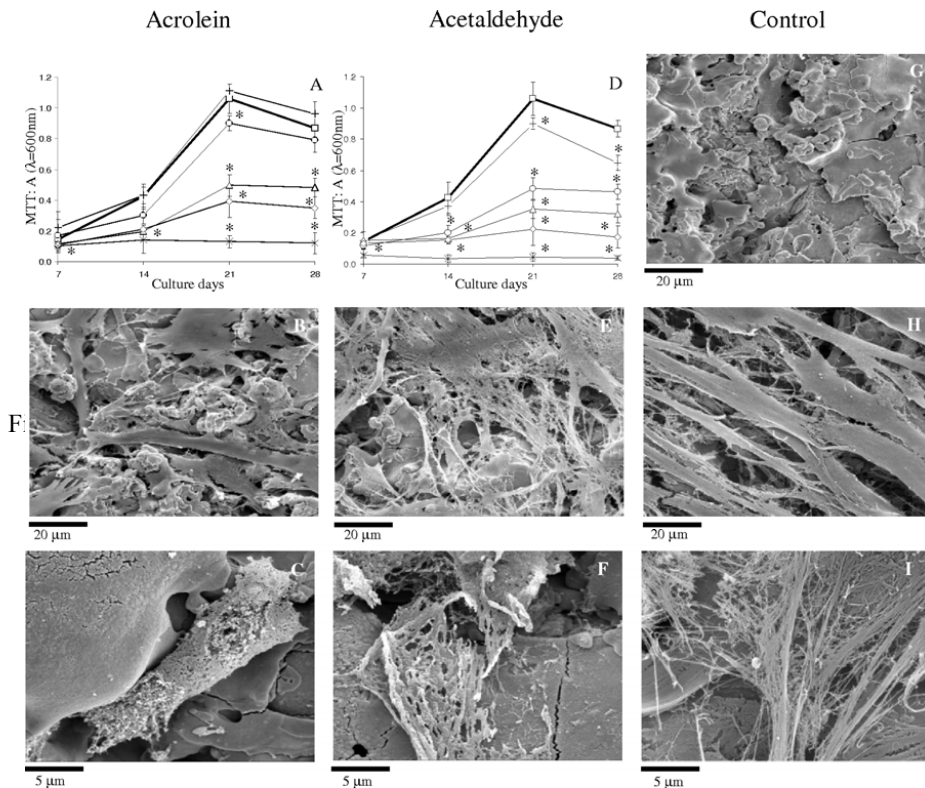


Figure 1. Exposure of plasma-sprayed titanium implants seeded with human osteoblastic cells to acrolein and acetaldehyde: cell viability/proliferation (MTT assay) and SEM observation at day 14. Acrolein: Cell viability/proliferation (A) and SEM appearance of cultures exposed to 0.06 mM (B) and 0.12 mM (C). Acetaldehyde: Cell viability/proliferation (D) and SEM appearance of cultures exposed to 0.3 mM (E) and 3 mM (F). Control: SEM appearance of the implant surface before cell seeding (G) and seeded implants (H, I).

A: Control (□); cultures exposed to acrolein 0.01 mM (+), 0.03 mM (○), 0.06 mM (Δ), 0.08 mM (◇) and 0.12 mM (x). D: Control (□); cultures exposed to acetaldehyde 0.1 mM (+), 0.3 mM (○), 1 mM (Δ), 3 mM (◇) and 6 mM (x). *Significantly different from control.

Figure 2

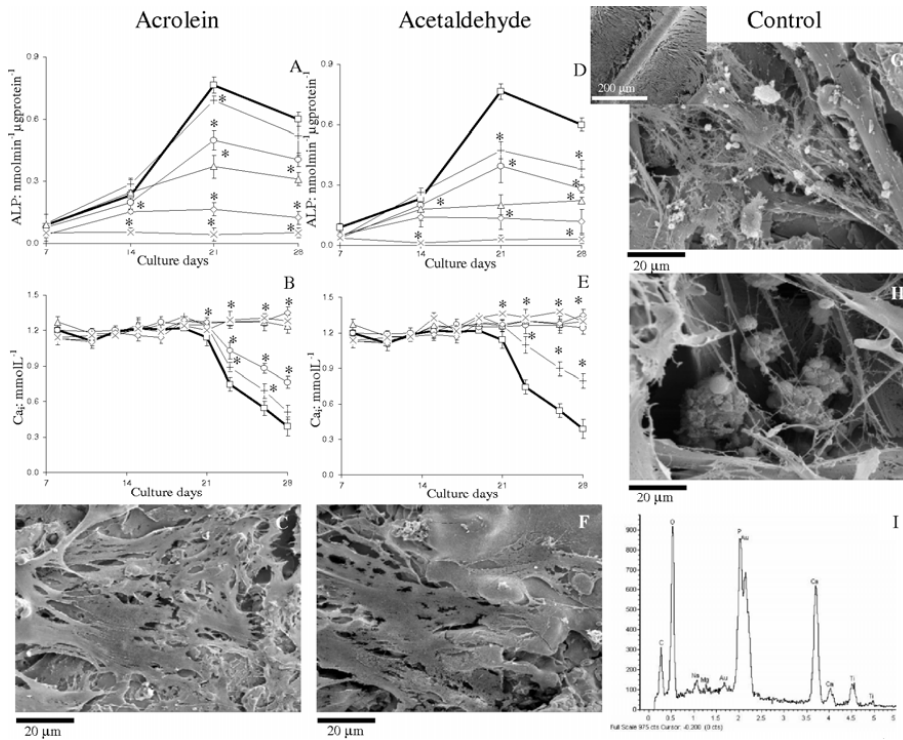


Figure 2. Exposure of plasma-sprayed titanium implants seeded with human osteoblastic cells to acrolein and acetaldehyde: ALP activity, Ca_i levels in the culture medium and SEM observation at day 28. Acrolein: ALP activity (A) Ca_i levels (B) and SEM appearance of cultures exposed to 0.06 mM (C, absence of mineralized deposits). Acetaldehyde: ALP activity (D), Ca_i levels (E) and SEM appearance of cultures exposed to 0.3 mM (F, absence of mineralized deposits). Control: SEM appearance of the seeded implants (G, presence of mineralized deposits; inset, general appearance of the cell layer on the implant surface), detail of the mineralized structures (H) and X-ray spectrum of the mineralized deposits (I).

A, B: Control (\square); cultures exposed to acrolein 0.01 mM (+), 0.03 mM (\circ), 0.06 mM (Δ), 0.08 mM (\diamond) and 0.12 mM (\times). D, E: Control (\square); cultures exposed to acetaldehyde 0.1 mM (+), 0.3 mM (\circ), 1 mM (Δ), 3 mM (\diamond) and 6 mM (\times). *Significantly different from control.

Figure 3

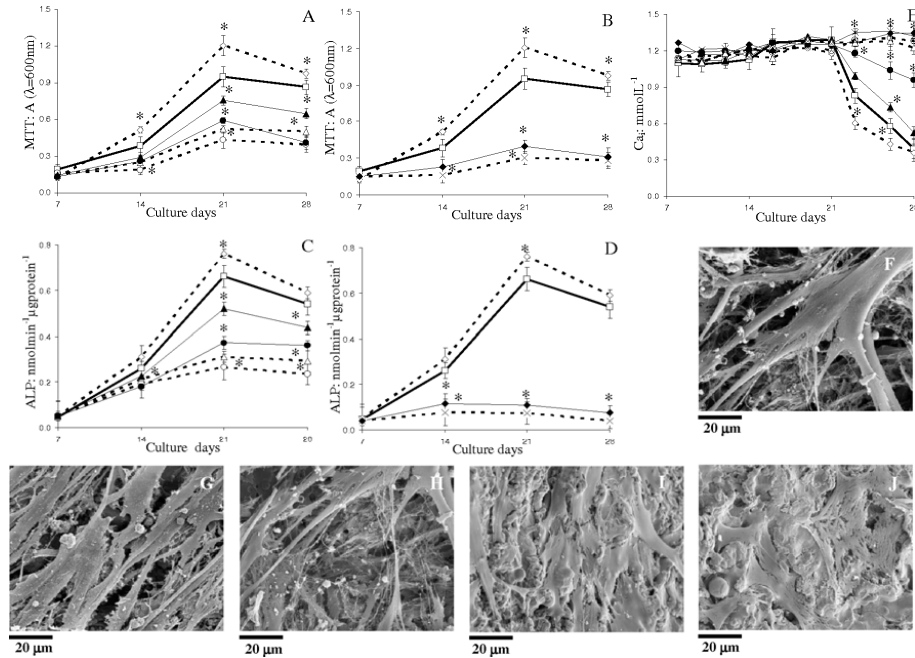


Figure 3. Simultaneous exposure of plasma-sprayed titanium implants seeded with human osteoblastic cells to nicotine 1.2 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM. Cell viability/proliferation (MTT assay: A, exposure to two compounds; B, exposure to three compounds); ALP activity (C, exposure to two compounds; D, exposure to three compounds); Cai levels in the culture medium (E); SEM observation at day 28: control (F) and cultures exposed to nicotine (G), nicotine + acrolein (H), nicotine + acetaldehyde (I) and nicotine + acrolein + acetaldehyde (J).

Control (\square); cultures exposed to nicotine (\diamond), acrolein (Δ), acetaldehyde (\circ), nicotine + acrolein (\blacktriangle), nicotine + acetaldehyde (\bullet), acrolein + acetaldehyde (\times) and nicotine + acrolein + acetaldehyde (\blacklozenge). *Significantly different from control.

Figure 4

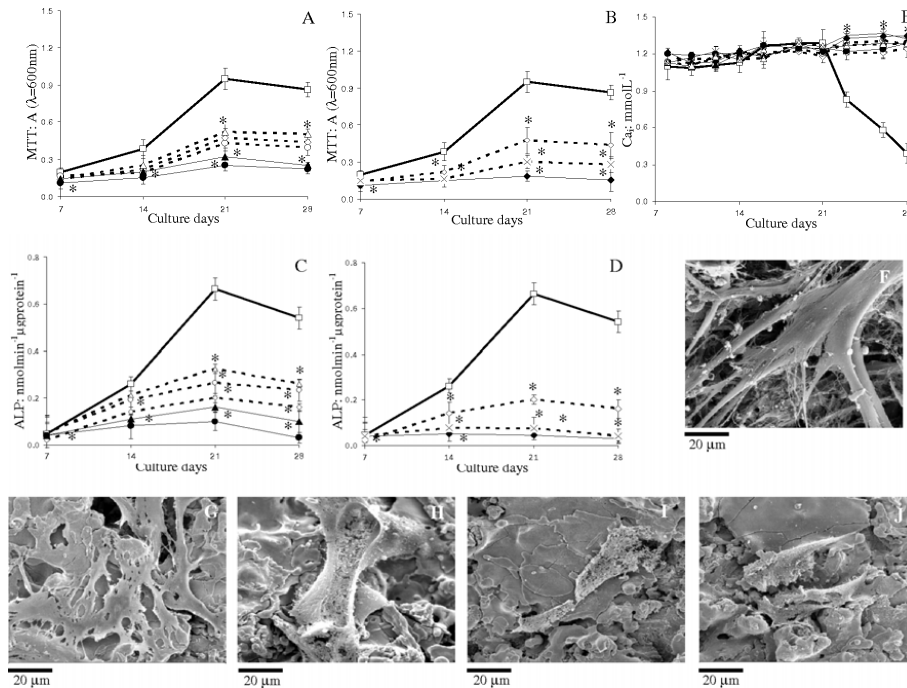


Figure 4. Simultaneous exposure of plasma-sprayed titanium implants seeded with human osteoblastic cells to nicotine 2.4 mM, acrolein 0.06 mM and acetaldehyde 0.3 mM. Cell viability/proliferation (MTT assay: A, exposure to two compounds; B, exposure to three compounds); ALP activity (C, exposure to two compounds; D, exposure to three compounds); Cai levels in the culture medium (E); SEM observation at day 28: control (F) and cultures exposed to nicotine (G), nicotine + acrolein (H), nicotine + acetaldehyde (I) and nicotine + acrolein + acetaldehyde (J).

Control (□); cultures exposed to nicotine (◇), acrolein (Δ), acetaldehyde (○), nicotine + acrolein (▲), nicotine + acetaldehyde (●), acrolein + acetaldehyde (×) and nicotine + acrolein + acetaldehyde (◆). *Significantly different from control.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL

O sucesso clínico dos implantes dentários está intimamente relacionado com a sua integração no tecido ósseo. O estabelecimento e manutenção da osteointegração requerem, entre outros eventos, o recrutamento de células precursoras dos osteoblastos, a sua ancoragem, adesão, proliferação e diferenciação em osteoblastos com capacidade para produzir uma matriz mineralizada na superfície do implante. Embora a taxa de sucesso dos implantes orais seja elevada, ocorrem falências e os hábitos tabágicos são apontados como um factor de risco importante.¹²⁷⁻¹²⁹

A presença de substâncias bioactivas no microambiente ósseo podem alterar o processo de cicatrização comprometendo a instalação e manutenção da osteointegração. Os mecanismos pelos quais o fumo do tabaco afecta a osteointegração e a longevidade dos implantes orais, isto é, a capacidade para manter um metabolismo ósseo adequado na interface osso/implante, não se encontram completamente esclarecidos. O fumo do tabaco é uma mistura heterogénea de mais de 4000 compostos, muitos dos quais apresentam potencial toxicidade em vários tecidos, incluindo o tecido ósseo.^{80,100} A nicotina é o composto presente em maior quantidade e tem sido frequentemente associada com os efeitos deletérios observados nos processos de regeneração óssea.²³⁴⁻²³⁹

No entanto, estudos experimentais mostraram que a administração sistémica de nicotina não influencia significativamente o desempenho biológico de implantes endósseos de titânio.^{149,152,153,240} Paralelamente, nos mesmos modelos animais foi possível demonstrar que a exposição intermitente ao fumo do tabaco, normalizada para a obtenção dos mesmos níveis de nicotina, influencia negativamente o processo de osteointegração.^{241,242} Estes dados sugerem que a nicotina não é o único componente do fumo do tabaco que apresenta efeitos negativos no metabolismo ósseo em geral e no processo de osteointegração em particular. Das substâncias resultantes da combustão do tabaco, a acroleína e o acetaldeído, aldeídos reac-

tivos, são reconhecidamente citotóxicos para vários elementos celulares como os neutrófilos,^{225,226} células epiteliais brônquicas,^{206,207} linfócitos,²²³ fibroblastos gengivais²³¹⁻²³³ e células osteoblásticas,^{227,228} e atingem concentrações significativas na saliva dos fumadores.²⁰⁹

Não existem dados disponíveis sobre as concentrações dos componentes presentes no fumo do tabaco que efectivamente atingem a interface osso/implante durante a instalação e manutenção da osteointegração e que, deste modo, possam afectar a actividade metabólica a nível do microambiente ósseo. Salienta-se, no entanto, o facto do epitélio juncional peri-implantar possuir uma maior permeabilidade a substâncias exógenas quando comparado com o epitélio juncional que envolve os dentes naturais,⁷⁷ do gradiente de concentração após a exposição favorecer a difusão tecidular e ainda o facto da exposição do epitélio oral à nicotina aumentar a sua permeabilidade.²⁴³

O efeito directo da nicotina, acroleína e acetaldeído em células osteoblásticas tem sido pouco estudado e a maioria dos trabalhos descritos diz respeito a células animais e linhas celulares imortalizadas.^{192-195,197-199,227,228,244} Salienta-se ainda o facto dos estudos disponíveis serem efectuados em placas de cultura e avaliarem o comportamento celular na presença de cada composto isoladamente. Acresce ainda, que as condições experimentais descritas (modelo osteoblástico, fase de diferenciação, concentrações utilizadas e tempo de exposição) são muito variadas, o que dificulta a caracterização dos efeitos e mecanismos subjacentes.

O objectivo deste trabalho foi a caracterização do efeito de três relevantes compostos presentes no fumo do tabaco – nicotina, acroleína e acetaldeído – no comportamento celular osteoblástico na superfície do implante.

Para a prossecução deste objectivo procedeu-se inicialmente ao estabelecimento do perfil biológico da nicotina relativamente ao comportamento de células osteoblásticas humanas cultivadas em placas de cultura “standard”, em condições experimentais que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico.

No primeiro estudo, utilizando como modelo células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano, caracterizou-se o efeito da nicotina em diferentes fases representativas do comportamento de proliferação celular – adesão, fase de crescimento exponencial e confluência. As culturas foram expostas a 0,6 a 6 mM, concentrações representativas das que podem estar na saliva dos utilizadores de tabaco,¹⁶⁹ por um período de 14 dias e caracterizadas relativamente à morfologia e proliferação celular. A nicotina provocou efeitos citotóxicos dependentes da dose e da fase de diferenciação celular. As alterações morfológicas mais evidentes foram o aparecimento de vacúolos, granulação citoplasmática, aumento do tamanho celular e perda da definição dos limites citoplasmáticos, que foram mais marcadas nas culturas expostas durante o processo de adesão e mínimas durante a fase de confluência. Relativamente à proliferação celular, verificou-se que nas culturas expostas à nicotina durante processo de adesão celular, o número de células aderentes diminuiu significativamente, principalmente nas culturas expostas a concentrações de nicotina superiores a 1,2 mM. Nas culturas tratadas com concentrações mais elevadas (3 e 6 mM) foi possível observar morte celular nos primeiros 3, 4 dias de incubação. Durante o crescimento exponencial, a sensibilidade à nicotina foi mais significativa nas culturas tratadas com concentrações superiores 1,2 mM, quer relativamente a alterações morfológicas quer à proliferação celular. As culturas expostas na fase de confluência mostraram um comportamento semelhante ao observado nas culturas controlo.

Seguidamente, utilizando o mesmo modelo celular, caracterizou-se o perfil da nicotina relativamente à proliferação e diferenciação celular em culturas mantidas por 35 dias. A diferenciação celular foi avaliada pela actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos mineralizados na matriz extracelular. Este estudo permitiu concluir que a nicotina em concentrações baixas (0,3 a 1,8 mM) estimula a proliferação celular, a actividade de fosfatase alcalina e a capacidade de formação de depósitos mineralizados. A exposição a concentrações mais elevadas, superiores a 1,8 mM, inibe significativamente estes parâmetros celulares.

Procedeu-se posteriormente à caracterização do perfil da nicotina utilizando como modelo células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana cultivadas em placas de cultura. As culturas foram mantidas durante um período de 28 dias e expostas a concentrações de nicotina representativas das que podem estar presentes no plasma (0,06 μM) e saliva (0,06 a 6 mM) dos utilizadores de tabaco.^{165,169} As culturas foram caracterizadas relativamente à morfologia, proliferação celular e actividade funcional, avaliada pela expressão da fosfatase alcalina e formação de depósitos minerais na matriz. As culturas controlo apresentaram células com uma morfologia característica do fenótipo osteoblástico, aspecto alongado com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos e núcleo proeminente. A morfologia celular foi afectada de forma significativa nas culturas expostas a concentrações de nicotina superiores a 1,2 mM, sendo o efeito mais característico o aparecimento de vacúolos e aumento do tamanho celular. Estes efeitos foram dependentes da dose e do tempo de exposição, excepto para as culturas expostas a 1,8 mM que mostraram uma capacidade de adaptação, isto é, em tempos mais longos de incubação adquiriram a morfologia normal. Níveis mais elevados (3 e 6 mM) causaram um efeito citotóxico muito significativo que se traduziu por uma morfologia muito alterada, com grandes vacúolos e retracção do citoplasma, arredondamento e destacamento da superfície de cultura, seguido de morte celular. A exposição das culturas a 0,06 μM de nicotina não afectou de forma significativa a proliferação e actividade funcional. No entanto, a presença de níveis superiores (0,06 a 6 mM) afectou o comportamento celular, de modo dependente da dose: estimulação da proliferação e da actividade de fosfatase alcalina nas culturas expostas a 0,06 a 1,2 mM, inibição, seguida de recuperação, nas culturas expostas a 1,8 mM e, nas culturas expostas a concentrações superiores (2,4 a 6 mM), um efeito inibitório em todos os parâmetros estudados.

Após a caracterização do perfil da nicotina em células osteoblásticas derivadas de dois modelos celulares relevantes do fenótipo osteoblástico (osso alveolar; medula óssea), procedeu-se à colonização de implantes de titânio TPS (titanium plasma sprayed) com células ósseas derivadas de medula óssea humana e avaliou-se o seu comportamento na presença de concentrações plasmáticas (0,06 a 0,3 μM) e salivares (0,06 a 6 mM) de nicotina.

Adicionalmente, e com o objectivo de caracterizar de forma mais detalhada o efeito da nicotina na actividade funcional, nomeadamente na mineralização da matriz, avaliou-se a resposta celular em implantes de titânio TPS colonizados com células derivadas de medula óssea humana e células Saos-2 derivadas de osteosarcoma humano. As culturas foram mantidas durante um período que permitiu a expressão completa do fenótipo osteoblástico nos dois modelos, respectivamente 28 ou 35 dias nas células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana e 14 dias nas Saos-2.

As células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana cultivadas na superfície titânio na situação controlo apresentaram um padrão normal de desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, nomeadamente proliferação gradual, que se acompanhou da produção de uma matriz extracelular abundante, aumento significativo da actividade de fosfatase alcalina e formação de uma matriz mineralizada para tempos de incubação mais longos. As células Saos-2 apresentaram uma taxa de proliferação baixa, elevada expressão de fosfatase alcalina e formação de depósitos minerais exuberantes após a adição de uma fonte de fosfato.

Nas culturas celulares derivadas de medula óssea e expostas a concentrações plasmáticas de nicotina, o comportamento celular foi semelhante ao observado nas culturas controlo, embora se tenha verificado uma ligeira tendência de estimulação em todos os parâmetros estudados. Níveis mais elevados, representativos dos encontrados na saliva dos utilizadores de tabaco, causaram um efeito que foi dependente da dose. Verificou-se um efeito de estimulação na proliferação, actividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz nas culturas expostas a concentrações $\leq 1,2$ mM. Nesta situação foi possível observar a formação mais precoce e mais exuberante de depósitos minerais quando comparado com as culturas controlo, comprovada por um consumo mais precoce de iões cálcio do meio de cultura e por observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento. Concentrações mais elevadas ($\geq 1,8$ mM) determinaram um efeito inibitório em todos os parâmetros estudados. De salientar que nas culturas expostas a 1,8 mM foi possível detectar a formação de depósitos minerais, embora mais tardiamente quando comparado com o controlo. Nas culturas tratadas com concentrações mais elevadas observou-se uma

diminuição significativa na proliferação celular e expressão de fosfatase alcalina, e ausência de depósitos minerais na matriz.

Nas células Saos-2, a exposição a concentrações de nicotina $\leq 1,2$ mM não afectou de forma significativa a proliferação celular e o efeito sobre a actividade de fosfatase alcalina observado foi de ligeira estimulação. Em relação à formação de depósitos minerais, observou-se uma antecipação na deposição mineral para concentrações $\leq 0,6$ mM, e um efeito negativo no consumo de cálcio ionizado nas culturas expostas a 1,2 e 1,8 mM que se reflectiu num menor número de depósitos minerais comparativamente com a situação controlo. Não se observou a formação de depósitos minerais na presença de concentrações mais elevadas de nicotina. Os resultados obtidos neste estudo permitiram ainda concluir que os modelos celulares que expressam o comportamento normal de proliferação/diferenciação do fenótipo osteoblastico, como as células osteoblásticas derivadas de medula óssea humana, apresentam a vantagem de permitir caracterizar os efeitos de substâncias exógenas, neste caso a nicotina, ao longo de todo o processo de desenvolvimento do fenótipo osteoblástico.

Embora os efeitos deletérios da nicotina sobre os processos de regeneração e em particular os que envolvem o tecido ósseo se encontrem descritos na literatura,²³⁴⁻²³⁹ estudos animais realizados com o objectivo de caracterizar os efeitos sistémicos deste composto no processo de osteointegração não demonstraram uma influência significativa no processo de cicatrização em redor de implantes endósseos.^{149,152,153,240}

No entanto, nos mesmos modelos animais, demonstrou-se que a exposição intermitente ao fumo do tabaco, normalizada para a obtenção dos mesmos níveis sanguíneos de nicotina, afectava de modo significativo a quantidade de osso formada em redor dos implantes,^{241,242} sugerindo que outros compostos bioactivos podem contribuir para o efeito negativo global no desempenho dos implantes endósseos. Entre os vários compostos presentes no fumo do tabaco, a acroleína e o acetaldeído são substâncias com uma elevada reactividade atingindo concentrações significativas na saliva dos fumadores.²⁰⁹

Procedeu-se à caracterização do perfil dose-resposta da acroleína e acetaldeído na

proliferação e diferenciação de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície de implantes de titânio TPS. Os implantes colonizados foram expostos durante 28 dias a concentrações de acroleína de 0,01 a 0,12 mM e a concentrações de acetaldeído de 0,1 a 6 mM. As culturas foram caracterizadas para a proliferação celular, actividade de fofatase alcalina e mineralização da matriz extracelular.

A exposição das culturas a níveis superiores a 0,03 mM de acroleína e 0,1 mM de acetaldeído causou um efeito inibitório, dependente da dose, na proliferação celular. As concentrações CI_{50} para a proliferação celular foram de 0,06 e 0,3 mM para a acroleína e acetaldeído, respectivamente. As culturas tratadas com concentrações baixas de acroleína (0,01 mM) e acetaldeído (0,1 mM) apresentaram uma morfologia semelhante às culturas controlo. Na exposição a concentrações mais elevadas, observaram-se alterações morfológicas, perda de orientação celular e presença de restos celulares. Nas culturas controlo, a actividade de fosfatase alcalina aumentou significativamente até ao dia 21. Nas culturas expostas aos aldeídos, o efeito na expressão da fosfatase alcalina foi dose dependente e semelhante ao observado na redução do MTT. Nas culturas controlo foi possível observar a diminuição dos níveis de Cai no meio de cultura a partir do dia 21, e a observação por microscopia electrónica de varrimento permitiu constatar, no dia 28, a presença de depósitos minerais de fosfato de cálcio em contacto com a camada celular. Nas culturas tratadas com os aldeídos, os níveis de cálcio no meio de cultura baixaram, a partir do dia 21, nas culturas tratadas com 0,01 e 0,03 mM de acroleína e 0,1 mM de acetaldeído, embora com uma taxa mais lenta quando comparada com as culturas controlo. Nas culturas expostas a concentrações mais elevadas, não se observou a formação de depósitos minerais na matriz extracelular.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, avaliou-se seguidamente o efeito da exposição simultânea das células osteoblásticas à nicotina, acroleína e acetaldeído, em várias combinações, nas condições experimentais referidas anteriormente. A nicotina foi utilizada nas concentrações de 1,2 e 2,4 mM, níveis que exibiram nos estudos anteriores um efeito indutor e um efeito inibitório, respectivamente. A acroleína e o acetaldeído foram testados nas concentrações de 0,06 mM e 0,3 mM, respectivamente, as CI_{50} para estes aldeídos de acordo com os estudos de dose-efeito.

Os resultados observados nas culturas expostas à nicotina, acroleína e acetaldeído isoladamente foram concordantes com os obtidos nos estudos realizados inicialmente, nomeadamente um efeito indutor em todos os parâmetros estudados nas culturas expostas à nicotina e uma inibição de cerca de 50% nas culturas tratadas com a acroleína e o acetaldeído. Nos implantes expostos à combinação de 1,2 mM de nicotina com 0,06 mM de acroleína ou 1,2 mM de nicotina com 0,3 mM de acetaldeído, verificou-se uma inibição na proliferação celular relativamente à observada nas culturas expostas somente à nicotina, mas os valores foram superiores aos observados nas culturas expostas aos aldeídos isoladamente. As variações na expressão de actividade da fosfatase alcalina nas várias condições experimentais tiveram um padrão semelhante ao observado para a proliferação celular. Em relação à capacidade de mineralização da matriz, foram observados depósitos minerais somente nas culturas controlo, culturas tratadas com nicotina, nicotina + acroleína e depósitos muito discretos nas culturas expostas à nicotina + acetaldeído.

A exposição dos implantes a 2,4 mM de nicotina resultou numa diminuição significativa da proliferação celular e actividade da fosfatase alcalina relativamente às culturas controlo; adicionalmente, não se observou a mineralização da matriz extracelular. O tratamento das culturas com a combinação de acroleína + nicotina, acetaldeído + nicotina ou nicotina + dois aldeídos resultou numa diminuição de todos os parâmetros quando comparado com a exposição isolada à acroleína ou ao acetaldeído.

Os resultados experimentais mostraram que, na situação controlo, as culturas celulares derivadas de osso alveolar humano e de medula óssea humana efectuadas nas condições experimentais descritas apresentaram características do desenvolvimento completo do fenótipo osteoblástico: uma fase de proliferação activa acompanhada da síntese de uma matriz celular, expressão de níveis elevados de fosfatase alcalina, maturação e mineralização da matriz. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que estas culturas, em condições experimentais adequadas,^{37,245,246} expressam uma sequência de proliferação/diferenciação semelhante constituindo, ambas, modelos adequados para o estudo do fenó-

tipo osteoblástico.^{33,247} Na presença de idênticas concentrações de nicotina, estes dois modelos celulares apresentaram resposta semelhante relativamente à morfologia, proliferação celular e actividade funcional. Após a colocação de um implante dentário, os precursores das células ósseas têm origem na medula do osso alveolar adjacente, nos desdentados parciais, e na medula do osso basal, nos desdentados totais de longa duração. Deste modo, as culturas de células derivadas destes dois tecidos constituem modelos celulares representativos para estudar o efeito dos componentes do tabaco na interacção tecido ósseo/implante dentário.

Neste estudo, de uma forma geral, observou-se que a exposição às concentrações mais elevadas de nicotina, acroleína e acetaldéido condicionou uma diminuição no número de células que mantinham a capacidade de aderir ao substrato de cultura e induziu alterações morfológicas como vacuolização citoplasmática (mais predominante nas células expostas à nicotina), retracção do citoplasma com perda de definição dos limites, alteração na orientação celular, arredondamento celular e destacamento celular do substrato de cultura. A adesão celular ao substrato, placa de cultura *in vitro*, superfície óssea pré-existente ou biomaterial implantado *in vivo*, constitui um pré-requisito para a proliferação e diferenciação celular.^{248,249} Os constituintes do citoesqueleto (microfilamentos, filamentos intermédios e microtúbulos) desempenham um papel fundamental na organização estrutural das células, funcionam como uma matriz que determina a forma da célula, posição dos organelos e organização geral do citoplasma.²⁵⁰ O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica responsável pelos movimentos celulares, transporte dos organelos, tradução e estabilidade do ARNm, divisão celular e diferenciação.^{250,251} Durante a adesão celular, observa-se a reorganização do citoesqueleto e as interferências neste processo traduzem-se num comprometimento da viabilidade celular pois apenas as células aderentes que apresentam a morfologia fenotípica característica iniciam o processo de proliferação/diferenciação. Os efeitos negativos dos componentes do fumo do tabaco, nicotina, acroleína e acetaldéido sobre o citoesqueleto foram anteriormente descritos em fibroblastos gengivais.^{185,231-233}

A vacuolização do citoplasma, com conseqüente aumento citoplasmático, foi a alteração morfológica mais característica observada nas culturas expostas à nicotina

e resulta da sua acumulação nos lisossomas. A nicotina, sendo uma base fraca, $pK_a=7,9$, tem tendência a acumular-se nos lisossomas pois estes organelos têm um meio relativamente ácido. A entrada da nicotina nos lisossomas é acompanhada pela entrada de água nestas estruturas e os lisossomas convertem-se em vacúolos que se tornam progressivamente maiores com o tempo de exposição. Esta alteração morfológica, após exposição à nicotina, está descrita noutros tipos de células, como fibroblastos gengivais e periodontais,^{184,185,252} macrófagos¹⁹¹ e células osteoblásticas provenientes de calvária de embrião de pinto.¹⁹² A formação de vacúolos parece funcionar como um mecanismo protector contra os efeitos da nicotina, na medida em que previne a interacção com os organelos citoplasmáticos.¹⁹¹

A susceptibilidade aos efeitos tóxicos da nicotina mostrou ser dependente do estado de diferenciação celular, sendo grande durante o processo de adesão ao substrato e proliferação exponencial e pequena na fase de confluência. Esta observação está de acordo com os 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.²⁵³ O estudo do efeito dos fármacos durante o processo de adesão providencia dados relevantes relativamente à sua toxicidade. As substâncias que interferem com este processo comprometem a viabilidade celular, pois só após a adesão ao substrato se observa a proliferação e diferenciação celulares. Durante a fase de crescimento exponencial, fase proliferativa, as células apresentam uma intensa actividade metabólica, sendo de esperar, também nesta fase, uma elevada susceptibilidade ao efeito de substâncias bioactivas.²⁵⁴

De um modo geral, o tratamento das células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano e de medula óssea humana com concentrações baixas de nicotina induziu a proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina e provocou a antecipação na formação da matriz mineralizada. Estes efeitos foram observados nas culturas realizadas nas placas de cultura “standard” e na superfície dos implantes de titânio.

O efeito da nicotina sobre as células Saos-2 não foi significativo na proliferação celular, excepto para as concentrações mais elevadas tendo, no entanto, influenciado de forma significativa a formação de depósitos minerais. Estas células apresentam uma taxa proliferativa baixa, expressam níveis elevados de fosfatase alcalina desde

o início do período de incubação e formação de depósitos minerais logo após a adição de uma fonte de fosfato. Estas características tornam esta linha celular útil nos estudos em que se pretende caracterizar os acontecimentos relacionados com as fases mais tardias da diferenciação osteoblástica, nomeadamente a formação de nódulos mineralizados na matriz.^{255,256} A importância da escolha do modelo celular foi evidenciada por Yahura et al¹⁹⁴ que observaram efeitos opostos quando compararam simultaneamente o efeito da nicotina em duas linhas celulares osteoblásticas relativamente à proliferação e actividade funcional.

O desenvolvimento do fenótipo osteoblástico está associado a uma fase inicial de proliferação que é acompanhada pela síntese da matriz extracelular colagenosa, seguida de maturação e organização da matriz culminando com a sua mineralização. Na presença de níveis adequados de iões cálcio e iões fosfato, a mineralização da matriz ocorre quando existe uma relação apropriada entre a quantidade de matriz sintetizada, a sua composição e o seu grau de maturação.^{32,58} A presença de níveis elevados de fosfatase alcalina está associada com o início do processo de mineralização, pois através da sua actividade hidrolítica ocorre um enriquecimento local de fósforo inorgânico necessário para a nucleação dos cristais de hidroxiapatite.³² Após o início do processo de mineralização observa-se uma repressão da expressão da enzima, e o aumento da deposição mineral constitui um processo físico-químico que depende da disponibilidade dos iões intervenientes. Nas culturas osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano e medula óssea humana expostas a níveis salivares de nicotina $\leq 1,2$ mM, o efeito de estimulação do crescimento celular foi acompanhado por um início mais precoce da deposição mineral. Este facto pode estar relacionado com uma maior taxa de acumulação de matriz extracelular, devido ao maior número de células viáveis e funcionais presentes na cultura. No entanto, o efeito de estimulação no processo de mineralização observado nas células Saos-2, sem se verificar qualquer efeito aparente de estimulação sobre a proliferação celular, sugere que a nicotina influencia também a actividade funcional das células osteoblásticas. Adicionalmente neste modelo, a exposição a concentrações mais elevadas de nicotina (3 mM) determinou uma diminuição em cerca de 30% na proliferação celular, que foi acompanhada da síntese de níveis de fosfatase alcalina insignificantes. Estes

dados sugerem que os efeitos dose-dependente da nicotina sobre a capacidade de mineralização da matriz não são somente reflexo do efeito na proliferação celular mas também sobre a actividade funcional, nomeadamente a expressão da fosfatase alcalina. Relativamente a este aspecto, Fang et al¹⁹³ mostraram que a nicotina estimulava a expressão de fosfatase alcalina, mas inibia a proliferação celular de células osteoblásticas UMR 106-01.

Os mecanismos moleculares envolvidos no efeito da nicotina, acroleína e acetaldeído na proliferação celular e actividade funcional de células osteoblásticas não estão completamente esclarecidos. Em relação ao efeito da nicotina na proliferação celular, Walker et al¹⁹⁵, mostraram que em células de osso trabecular humano exposto a concentrações de nicotina variáveis entre 0,1 a 1µM, a estimulação da proliferação celular é acompanhada por um aumento da expressão do gene *c-fos*. Paralelamente, nas culturas expostas a concentrações mais elevadas de nicotina, foi observada uma inibição da proliferação acompanhada de uma diminuição da expressão do gene *c-fos*. Estes autores mostraram ainda a presença da subunidade $\alpha 4$ dos receptores nicotínicos e sugeriram o envolvimento destes receptores no efeito sobre a proliferação, ao mostrar que a estimulação observada é inibida na presença da D-tubocurarina (antagonista dos receptores nicotínicos). Estes receptores encontram-se acoplados a canais de cálcio, e a sua estimulação condiciona a entrada do cálcio para o interior da célula.¹⁹⁵ Assim, alguns autores têm sugerido, embora de forma indirecta, o envolvimento deste ião na acção da nicotina.¹⁹⁵ O influxo do ião cálcio modula numerosas funções celulares tais como a proliferação celular, a secreção proteica, a apoptose, e a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica.^{34,257}

Relativamente ao efeito dos aldeídos na proliferação celular, são escassos os estudos que descrevem a acção destes compostos utilizando como modelo células osteoblásticas. Hurley et al sugeriram que o acetaldeído ao inibir a polimerização da tubulina (proteína rica em grupos sulfidrílo) nas células osteoblásticas derivadas da calvária de embrião de rato interfere com o processo de divisão celular e consequentemente com a proliferação.²²⁷

A nicotina, a acroleína e o acetaldeído promovem a depleção da glutathione em vários sistemas celulares.^{201,207,222,258} As flutuações dos níveis de glutathione em relação à sín-

tese do ADN sugerem o envolvimento deste tripéptideo no processo de divisão celular. Uma correlação directa entre os níveis de glutathione e a taxa de proliferação celular foi observada em células epiteliais brônquicas.²⁵⁹ Adicionalmente, está descrito que a diminuição da glutathione por acção da butionina nas células A549 é acompanhada por um efeito inibitório na proliferação celular, sendo este efeito revertido pela adição de glutathione exógena.^{260,261} Também, a depleção da glutathione por acção da acroleína causa uma diminuição na expressão de factores de transcrição directamente relacionados com a proliferação celular, como o factor de transcrição AP-1.²⁰⁴

A glutathione está envolvida em vários processos biológicos incluindo reacções enzimáticas, transporte molecular, síntese proteica e de ácidos nucleicos, expressão génica e protecção celular contra os processos oxidativos.²⁶² A depleção da glutathione intracelular leva a acumulação de radicais livres aumentando a susceptibilidade celular aos efeitos citotóxicos de substâncias electrofílicas como o acetaldeído e a acroleína. Os aldeídos são compostos com elevada reactividade reagindo rapidamente com os grupos sulfidrilos das biomoléculas. Compostos como a guanina, a cisteína, a lisina e os resíduos de arginina em regiões críticas de factores nucleares, proteases e outras proteínas são alvo da acção dos aldeídos podendo esta interacção resultar em mutações e alteração da transcrição genética.²⁰¹

Considerando os níveis elevados de vários compostos bioactivos detectados nos fluidos orais dos fumadores e os factores locais que favorecem a sua difusão tecidual,^{77,169,209,243} pode antecipar-se a possibilidade de interacções complexas a nível do comportamento das células ósseas na manutenção de um metabolismo normal no microambiente osso/implante. Curiosamente, a avaliação da resposta celular resultante da exposição a mais que um composto bioactivo não está descrita na literatura. Neste trabalho, a análise do comportamento celular durante a exposição simultânea à nicotina, acroleína e acetaldeído, em várias combinações de efeitos indutores e efeitos inibitórios, sugeriu uma interacção/contribuição dos efeitos dos vários compostos envolvidos na resposta celular observada. Estes resultados estão em linha com o descrito na literatura relativamente à complexidade dos factores envolvidos no impacto negativo do tabagismo em implantologia dentária e à consequente dificuldade na identificação de mecanismos específicos.

CONCLUSÕES

A exposição contínua de células osteoblásticas humanas, cultivadas em placas de cultura ou na superfície de implantes de titânio TPS, a concentrações de nicotina representativas das que podem estar presentes no plasma (0,06 e 0,3 μ M) dos utilizadores de tabaco não influenciou de forma significativa a viabilidade/proliferação celular e a actividade funcional. Por outro lado, a exposição contínua a concentrações salivares de nicotina (0,1 a 6 mM) causou um efeito dependente da dose, tendo sido de estimulação na presença de concentrações baixas (0,1 a 1,2 mM) e de inibição para níveis mais elevados (2,4 a 6 mM). A exposição a 1,8 mM causou um efeito inibitório inicial seguido de uma recuperação progressiva da proliferação e função celular. A presença de concentrações mais elevadas (2,4 a 6 mM) resultou num efeito inibitório dependente da dose. A exposição a níveis salivares de nicotina influenciou, também, de modo dependente da dose e do estágio de diferenciação, a adesão e as características morfológicas de células osteoblásticas humanas.

A exposição contínua de células osteoblásticas humanas, cultivadas na superfície de implantes de titânio TPS, à acroleína (0,01 a 0,12 mM) e ao acetaldeído (0,1 a 6 mM) causou um efeito inibitório na proliferação celular e actividade funcional, para concentrações superiores a 0,03 e 0,1 mM, respectivamente.

A exposição simultânea à nicotina, acroleína e acetaldeído, em várias combinações de efeitos indutores e efeitos inibitórios, resultou numa interacção/contribuição dos efeitos dos vários compostos envolvidos na resposta celular observada na superfície de implantes de titânio TPS.

Em conclusão, os resultados deste trabalho mostram que a nicotina, a acroleína e o acetaldeído afectam a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas humanas cultivadas na superfície de implantes de titânio TPS. Adicionalmente, observa-se uma interacção/contribuição de efeitos indutores e inibitórios na resposta celular observada durante a exposição simultânea a vários compostos. Estes resultados sugerem a possibilidade de uma modulação local a nível do metabolismo ósseo peri-implantar, com eventual repercussão na osteointegração e longevidade dos implantes endósseos.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA

- 1 Tavares AV. História da implantologia. Stoma 1993; 26:17-31.
- 2 Bränemark P-I, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. Scand J Plast Reconstr Surg 1969; 3:81-100.
- 3 Bränemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent 1983;(50):390-410.
- 4 Albrektsson T, Bränemark P-I, Hansson H-A, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthop Scand 1981; 52:155-170.
- 5 Bränemark PI, Ericson L, Lausmaa J, Thomsen P, Bränemark R, Skalak R. Anatomy of Osseointegration and the Transfer of Load. In: Fonseca RJ, Davis HW, editors. Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995: 165-283.
- 6 Albrektsson T, Bränemark P-I, Hansson H-A, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthop Scand 1981; 52:155-170.
- 7 Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 1999; 20:2311-2321.
- 8 Park JY, Davies JE. Red blood cells and platelet interaction with titanium implants surfaces. Clin Oral Implants Res 2000; 11:530-539.
- 9 Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. Int J Prosthodont 1998; 11:391-401.
- 10 Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. J Dent Educ 2003; 67:932-949.
- 11 Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. Periodontology 2000 2008; 47:15-26.
- 12 Steinemann SG. Titanium - the material of choice. Periodontology 2000 1988; 17:7-21.
- 13 Steinemann SG. Corrosion of surgical implants - in vivo and in vivo tests. In: Winter GD, Leray JL, Groot K, editors. Evaluation of Biomaterials. New York: John Wiley & Sons, 1980: 1-34.
- 14 Ellingsen JE, Thomsen P, Lyngstadaas P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. Periodontology 2000 2006; 41:136-156.
- 15 Le Guéhennec L, Souidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegratio. Dental Materials 2007; 23:844-854.

- 16 Qu J, Chehroudi B, Brunette DM. the use of micromachined surfaces to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. *Oral Dis* 1996; 2(1):102-115.
- 17 Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkilä P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:37-47.
- 18 Anselme K, Bigarrelle M, Noel B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002; 60:529-540.
- 19 Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Di Meglio F, Salzano S et al. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res* 2003; 82(9):692-696.
- 20 Rosa A, Beloti M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation and differentiation. *Braz Dent J* 2003; 14(1):16-21.
- 21 Jayraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann H-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004; 25:625-631.
- 22 Vallecillo CM, Romero OM, Olmedo GM, Reyes BC, Zorrilla RC. Cylindrical dental implants with hydroxyapatite- and titanium plasma spray-coated surfaces: 5-year results. *J Oral Implantol* 2007; 33(2):59-68.
- 23 Sennerby L. Dental implants: a matter of course and controversies. *Periodontology* 2000 2008; 47:9-14.
- 24 Huang Y-H, Polimeni G, Qahash M, Wikesjö UMF. Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge - future possibilities. *Periodontology* 2000 2008; 47:206-223.
- 25 Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J. Osseointegration: Historic Background and Current Concepts. In: Lindh J, Karring T, Niklaus PL, editors. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003: 809-820.
- 26 Garant PR. Bone. In: Arinne Dickson, editor. *Oral Cells and Tissues*. Illinois: Quintessence Books, 2003: 195-239.
- 27 Williams PL. Skeletal system. *Gray's Anatomy - The anatomical basis of medicine and surgery*. USA: Churchill Livingstone, 1995: 426-484.
- 28 Junqueira L, Carneiro J. *Tecido Ósseo. Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 1999: 111-128.

- 29 Dias M, Lourenço P, Cabrita A. Organização microscópica do tecido ósseo. *Rev Port Ortop Trauma* 2004; 12(1):39-51.
- 30 Walsh WR, Walton M, Yan Y, Gillies RM, Svehla M. Cell structure and biology of bone and cartilage. In: Yuehuei H, Martin KL, editors. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, New jersey: Human Press, 2003: 35-58.
- 31 Puzas JE. The Osteoblast. In: Favus MJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. New York: Raven Press, 1993: 15-21.
- 32 Bellows CG, Aubin JE, Heersch JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphates. *Bone and Min* 1991; 14:27-40.
- 33 Fernandes HR, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8:61-65.
- 34 Dvorak M, Siddiqua A, Ward D, Carter D, Dallas S, Nemeth E. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:5140-5145.
- 35 Kanuparthi D, Yano S, Tfelt - Hansen J, Rooney P, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S et al. Mitogenic action of calcium - sensing receptor on rat calvarial osteoblasts. *Endocrinology* 2004;(145):3451-3462.
- 36 Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17:77S-83S.
- 37 Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikiam JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press, 1996: 69-86.
- 38 Fernandes MHR. Mecanismo de regulação do metabolismo ósseo. *Acta Médica Portuguesa* 1998; (11):41-52.
- 39 Franz-Odenaal TA, Hall KB, Eckhard WP. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental Dynamics* 2006; 235:176-190.
- 40 Knothe Tate ML, Adamson J, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1-8.
- 41 Whitson SW. Bone. In: Ten Cate AR, editor. *Oral Histology. Development, structure and function*. St Louis: Mosby, 1998: 104-127.
- 42 Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;(55):287-299.

- 43 Nijweide PJ, Burger EH, Nulend KJ. The osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 1996: 115-126.
- 44 Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 17:57-60.
- 45 Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Osso alveolar. In: Bispo de Lima L, editor. Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal. São Paulo: Artemed Editora, 2004: 205-219.
- 46 Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old-rats. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1760-1767.
- 47 Martin TJ, Findlay DM, Heath JK, Ng KW. Osteoblasts: differentiation and function. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. Handbook of experimental pharmacology - vol 107. Springer-Verlag, 1993: 149-183.
- 48 Suda T, Nobuyuki U, Takahashi N. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 1996: 87-102.
- 49 Baron R, Chakraborty D, Chatterjee D, Horne W, Lombri A, Ravesloot JH. Biology of the osteoclast. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. Handbook of experimental pharmacology - Vol 107. Berlin: Springer - Verlag, 1993: 111-140.
- 50 Väänänen K. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 1996: 103-114.
- 51 Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: Favus MJ, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. New York: Raven Press, 1993: 3-9.
- 52 Delmas PD, Malaval L. The proteins of bone. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. Handbook of Experimental Pharmacology - vol 107. Springer - Verlag, 1993: 673-724.
- 53 Robey PG. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. In: Bilezikiam JP, Raisz LG, Rodam GA, editors. Principles of Bone Biology. Academic Press, 1996: 155-165.
- 54 Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Butler WT, Sodeck J. Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein -1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (ostenection)] in association with mineralized - tissue formation by fetal - rat calvarial cells in culture. *Biochem J* 1991; 274:513-520.

-
- 55 Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone - related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994; 158:555-572.
- 56 Nefussi JR, Brami G, Forest N, Oboeuf M. Sequential expression of the bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem & Cytochem* 1997; 45(4):493-503.
- 57 Termine JD. Bone Matrix Proteins and the Mineralization Process. In: Favus MJ, editor. *Primers on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Raven Press, 1993: 21-25.
- 58 Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology - vol 107*. Berlin: Springer-Verlag, 1993: 267-298.
- 59 Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone Formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988; 254:317-330.
- 60 Franchi M, Fini M, Giavaresi G, Ottani V. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 2005; 36:630-644.
- 61 Block SM, Achong MR. Osseointegration. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen EP, Waite PD, editors. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. London: BC Decker Inc, 2004: 189-203.
- 62 Schenk KR, Hørtting-Hansen E, Buser D. Bone integration of implants. *Forum Implantologicum* 2006; 2(1):14-23.
- 63 Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* 1999; 13:8-20.
- 64 Shetty V, Bertolami CN. The physiology of Wound Healing. In: Peterson LJ, Indresano AT, Marciani RD, Roser SM, editors. *Principals of oral and maxillofacial surgery*. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 3-18.
- 65 Slaets E, Carmeliet G, Naert I, Duyck J. Early cellular responses in cortical bone healing around unloaded titanium implants: an animal study. *J Periodontol* 2006; 77:1015-1024.
- 66 Arnold W, West D. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 1991; 52:407-422.
- 67 Berglundh T, Abrahamsson I, Lang PN, Lindh J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. a model study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2003; 25:253-259.

- 68 Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surface. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15(4):381.
- 69 Gruber R. Mechanisms of bone development, remodeling and loss. In: Watzek G, editor. *Implants in qualitatively compromised bone*. London: Quintessence Publishing, 2004: 9-29.
- 70 Hupp JR. Wound Repair. In: Peterson LJ, Ellis E, Tucker MR, editors. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. St Louis: Mosby, 2003: 49-62.
- 71 Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Impl Res* 1991; 2:1-19.
- 72 Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res* 2005; 84:9-20.
- 73 Fugiseki MASA, Matusaka KENI, Yosshinari MASA, Shimono MASA, Inoue TAKA. An experimental study on the features of peri-implant epithelium: immunohistochemical and electron-microscopic observations. *Bull Tokyo Dent Coll* 2003; 44(4):185-199.
- 74 Kivela-Rajamaki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirila EM et al. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14(2):158-165.
- 75 Weber H-B, Cochram DL. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent* 1998; 79:79-89.
- 76 Ericsson L, Lindhe L. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1993; 20:623-627.
- 77 Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido MA, Ayukawa Y et al. Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. *Clin Oral Impl Res* 2001; 13:243-251.
- 78 Musk AW, De Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology* 2003; 8:286-290.
- 79 Routh HB, Bhowmik KR, Parish JL, Parish CL. Historical aspects of tobacco use and smoking. *Clin Dermatol* 1998; 16:539-544.
- 80 Musk AW. History of tobacco and health. *Respirology* 2003; 8(3):286-290.
- 81 Costa e Silva VL, Fishburn B. Tobacco use and control: determinants of consumption, intervention strategies, and the role of the tobacco industry. *Toxicology* 2004; 198:9-18.

- 82 Cruz JAA, Martins I, Mano MC, Dantas MA, Airoso ML, Rombo MM. Nutrição e saúde dos idosos de Vila Franca de Xira -III. Estilos de vida: Alimentação, bebidas alcoólicas, actividade física, tabaco e exposição ao sol. *Rev Port Nutr* 1992; 4(3):4-18.
- 83 Machado AP, Vicente P, Barros H. Adolescent smokers in Portuguese schools. *Saúde em Números* 1995; 10:17-19.
- 84 Almeida S, Tavares M, Barros H. Prevalência de tabagismo durante a gravidez em Portugal. *Gac Sanit* 2002; 16(1):33-132.
- 85 Santos AC, Barros H. Smoking patterns in community sample of Portuguese adults 1999-2000. *Prev Med* 2004; 38(1):114-119.
- 86 Monteiro AB, Neves AL, Marques MM, Lopes C. Hábitos tabágicos em estudantes universitários do Porto. *Arq Med* 2004; 18(3):98-102.
- 87 Fraga S, Sousa S, Santos AC, Mello M, Lunet N, Padrão P et al. Tabagismo em Portugal. *Arq Med* 2005; 19(5-6):207-229.
- 88 Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1968; 68:153-207.
- 89 Huber GL, First MW, Grobner O. Marijuana and tobacco smoke gas-phase cytotoxins. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40:629-636.
- 90 Baker RR, Massey ED, Smith G. An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem Toxicol* 2004; 42S:S53-S83.
- 91 Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Doll R. Mortality from smoke Worldwide. *Br Med Bull* 1996; 52:12-21.
- 92 Peto R, Lopez A, Boreham J, Thun M, Heath CJ. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992; 339(8804):1268-1278.
- 93 Lakier JB. Smoking and cardiovascular diseases. *Am J Med* 1992; 93:8S-12S.
- 94 Hartman TE, Tazelaar HD, Swenson SJ, Muller NL. Cigarette smoking: CT and pathological findings of associated pulmonary diseases. *Radiographics* 1997; 17:377-390.
- 95 Kirkendal JW, Evaul J, Johnson LF. The effects of cigarette smoking on GI physiology and non-neoplastic digestive disease. *J Clin Gastroenterol* 1984; 6:65-78.
- 96 Kurata JH, Nogawa AN. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Helicobacter pylori*, and smoking. *J Clin Gastroenterol* 1997; 24(1):2-17.

- 97 La Vechia C, Boyle P, Franceschi S. Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 1991; 27:94-104.
- 98 Mosely LH, Finseth F. Cigarret smoking: impaired digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand* 1977; 9:97-101.
- 99 Hanley EN, Levy JA. The rate of pseudoarthrosis (nonunion) in patients who are smokers and patients who are non smokers: A comparision study. *Spine* 1989; 11:942.
- 100 Ward KD, Klesgs RC. A meta-analyses of the effects of cigarret smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2001; 68:259-270.
- 101 Valimaki MJ, Kärkkäinen M, Lamberg-Allardt C, Laitinen K, Alhava E, Heikkein J. Exercise, smoking, and calcium intake during adolescent and early adulthood as determinants of peak bone mass. *BMJ* 1994; 309:230-235.
- 102 Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of major effect. *BMJ* 1997;(315):841-846.
- 103 Syversen U, Nordsletten L, Falch JA, Madsen JE, Nilsen OG, Waldum HL. Effect of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical properties in female rat femurs. *Calcif Tissue Int* 1999; 65:246-249.
- 104 Gerdhem P, Obrant KJ. Effects of cigarete-smoking on bone mass as assessed by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry and Ultrasound. *Osteoporos Int* 2002; 13:932-936.
- 105 Benson BW, Shulman JD. Inclusion of tobacco exposure as predictive factor for decreased bone mineral content. *Nicotine and Tobacco Research* 2005; 7(5):719-724.
- 106 Nguyen TV, Center JR, Sambrook PN, Eisman JA. Risk Factors for proximal humerus, forearm, and wrist fractures in elderly men and women. *Am J Epidemiol* 2001; 153:587-595.
- 107 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(2):231-238.
- 108 La Vechia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997; 33:302-312.
- 109 Bolin A, Eklund G, Frithiof L, Lavstedt S. The effect of changed smoking habits on marginal alveolar bone loss. *Swed Dent J* 1993; 17:211-216.
- 110 Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. *J Periodontol* 1994;(65):996-1001.

- 111 Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: Etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998; 3:88-101.
- 112 Krall E, Garvey AJ, Garcia RI. Alveolar bone loss and tooth loss in male cigar and pipe smokers. *JADA* 1999; 130:57-64.
- 113 Bergström J, Dock J, Eliasson S. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000; 27:61-68.
- 114 Machuca G, Rosales I, Lacalle JR, Machuca C, Bullón P. Effect of cigarette smoking on periodontal status of health young adults. *J Periodontol* 2000; 71:73-78.
- 115 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; 71:1874-1881.
- 116 Schuller AA, Holst D. An "S-shaped" relationship between smoking duration and alveolar bone loss: generating a hypothesis. *J Clin Periodontol* 2001; 72:1164-1171.
- 117 Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontology* 2000 2003; 32:50-58.
- 118 Mullally BH. The influence of tobacco smoking on the onset of periodontitis in young persons. *Tobacco Induced Diseases* 2004; 2:53-65.
- 119 Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors - tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6):180-195.
- 120 Bain CA, Moy PK. The influence of smoking on bone quality and implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9:123. Ref Type: Abstract
- 121 Preber H, Bergström J. Effect of cigarret smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol* 1990; 17:324-328.
- 122 Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;(50):237-239.
- 123 Trombelli JL, Scabbia A. Healing response on proliferation of gingival defects following guided tissue regeneration in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 1995; 24.
- 124 Weyant RJ. Characteristics associated with the loss an peri-implant tissue of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;(9):95-102.
- 125 DeLuca S, Zarb G. The effect of smoking on osseointegrated dental implants. Part II: Peri-implant bone loss. *Int J Prosthodont* 2006; 19(6):560-566.

- 126 Wallace RH. The relationship between cigarette smoking and dental implant failure. *Eur J Prosthet Restorative Dent* 2000;(8):103-106.
- 127 Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa M, Yamanchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:473-478.
- 128 Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, KÜchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systemic review and meta-analyses. *J Clini Periodontol* 2007; 34:523-544.
- 129 Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (I). Success criteria and epidemiology. *Euro J Oral Sci* 1998; 106:527-551.
- 130 Perez-Sanchez A, Moya-Villaescusa MJ, Cafesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *J Periodontol* 2007; 78(2):351-359.
- 131 Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (II) Etiopathogenesis. *Euro J Oral Sci* 1998; 106(3):721-764.
- 132 Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8:609-615.
- 133 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; 26:402-409.
- 134 Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. *J Periodontol* 1994; (65):996-1001.
- 135 Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits. *J Dent Res* 1997; (76):1667-1674.
- 136 Haber J. Cigarette smoking: A major risk factor for periodontitis. *Compend Contin Educ Dent* 1995; XV(8):1002-1014.
- 137 Bain CA. Implant installation in the smoking patient. *Periodontology* 2000 2003; 33:185-193.
- 138 Gorman LM, Lambert PM, Morris HF, Ochi S, Winkler S. The effect of smoking on implant survival at second-stage surgery: DIRCRG interim report. *Implant Dent* 1994; (3):165-168.
- 139 De Brun H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5:260-264.

- 140 Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res* 1997;(76):1667-1674.
- 141 Duyck J, Naert I. Failure of oral implants: aetiology, symptoms and influencing factors. *Clin Oral Invest* 1997;(2):102-114.
- 142 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.
- 143 Hultin M, Fischer J, Gustafsson A, Kallus T, Kling B. Factors affecting late fixture loss and marginal bone loss around teeth and dental implants. *Clin Implants Dent Rel Res* 2000;(2):203-208.
- 144 Ekfeldt A, Christiansson U, Ericksson T, Lindén U, Lundqvist S, Runcrantz T et al. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res* 2001;(12):462-467.
- 145 Widmark G, Anderson B, Carlsson GE, Lindvall AM, Ivanoff CJ. Rehabilitation of patient with severely resorbed maxillae by means of implants with or without bone grafts: a 3- to 5- year follow-up clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; (16):73-79.
- 146 Schwartz-Arad D, Samet N, Samet N, Mamlider A. Smoking and complications of endosseous dental implants. *J Periodontol* 2002; (73):153-157.
- 147 DeLuca S, Habsha E, Zarb G. The effect of smoking on osseointegrated dental implants. Part I: implant survival. *Int J Prosthodont* 2006; 19(5):491-498.
- 148 Sánchez-Perez A, Moya-Villaescusa MJ, Caffesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *J Periodontol* 2007; 78(2):351-359.
- 149 Stefani MC, Filho GR, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol* 2002; 73(2):206-212.
- 150 Nociti FHJ, Neto CJB, Carvalho MD, Sallum AW, Sallum EA. Intermittent Cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002; (73):982-987.
- 151 César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Mreno HJ, Nociti FHJ. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol* 2003; (74):1445-1459.
- 152 Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. An experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:268-276.

- 153 Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:389-395.
- 154 César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FHJ. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histological study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:713-719.
- 155 Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 2004; 43(6):619-632.
- 156 Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 1986; 37:21-32.
- 157 Travel J. The influence of the hydrogen ion concentration on the abstraction of alkaloids from the stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 1940; 69:21-23.
- 158 Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol* 1998; 16(5):557-564.
- 159 Hukkanem J, Peyton J, Benowitz NL. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev* 2005; 57:79-115.
- 160 Feyerabend C, Higenbottam T, Russell MA. Nicotine concentrations in urine and saliva of smokers and non-smokers. *Br Med J* 1982; 284:1002-1004.
- 161 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.
- 162 Seaton MJ. Rates of excretion of cotinine, nicotine glucuronide, and 3-hydroxycotinine glucuronide in rat bile. *Drug Metab Dispos* 1993; 21:927-932.
- 163 Balabanova S, Buhler G, Schneider E, Boschek HJ, Schneitler H. Nicotine excretion by the apocrine and eccrine sweat in smokers and passive smokers. *Drug Metab Dispos* 1992; 43(73):76.
- 164 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(6219):972-976.
- 165 Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J* 1976; 1(6017):1043-1046.
- 166 Hukkanem J, Peyton J, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005; 57:79-115.
- 167 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(2):201-209.

- 168 Ryder MI, Fujitak R, Lebus F, Mahboud M, Faia B, Muhaimin D et al. Alterations of neutrophil L-selection and CD18 expression by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *J Periodont Res* 1998; 33(4):359-368.
- 169 Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981; 41(11 Pt 1):4305-4308.
- 170 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.
- 171 Benowitz NL, Jacob P, III, Jones RT, Rosenberg J. Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 32:758-372.
- 172 Brischetto CS, Connor WE, Connor SL, Matarazzo II. Plasma lipid and lipoprotein profiles of cigarette smokers from randomly selected families: Enhancement of hyperlipidemia and depression of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol* 1983; 52:675-680.
- 173 Argentin G, Cicchetti C. Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol Scienc* 2004; 79:75-81.
- 174 Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol* 1998; 84:2089-2098.
- 175 Chowdhury P, Udupa KB. Nicotine as a mitogenic stimulus for pancreatic acinar cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2006; 12(46):7428-7432.
- 176 Heusch LW, Maneckjee R. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 1998; 19(4):551-556.
- 177 Armitage AK, Turner DM. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoking through the oral mucosa. *Nature* 1970; 226:1231-1235.
- 178 Adrian CL, Olin HB, Dalhoff K, Jacobsen J. In vivo human buccal permeability of nicotine. *Int J Pharm* 2006; 311:196-202.
- 179 Theilig C, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Görman FF, Bereiter-Hann J, Keller-Stanislawski B et al. Reactions of human keratinocytes in vitro after application of nicotine. *Skin Pharmacol* 1994; 7:307-315.
- 180 Ringdahl BE, Johnson GK, Ali RB, Organ CC. Effect of nicotine on arachidonic acid metabolites and epithelial parameters in rat oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1977; 26:40-45.

- 181 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.
- 182 Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndaye A, Jolkovsky DL, Webber RJ et al. Choline acetyltransferase acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 2000; 79(4):939-949.
- 183 Grando RK. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2:41-48.
- 184 Tipton DA. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995; 66:1056-1064.
- 185 Alpar B, Leyhausen G, Sapotnick A, Günay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingival fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998; 2:40-46.
- 186 Austin WG, Cuenin FM, Hokett SD, Peacock ME, Sutherland DE, Erbland JF et al. Effect of nicotine on fibroblast β 1 integrin expression and distribution in vitro. *J Periodontol* 2001; 72:438-444.
- 187 Tanur E, McQuade JM, Mcpherson JC, Al-Hashimi IH, Hidalgo-Rivera F. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol* 2000; 71:717-722.
- 188 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; 37:279-285.
- 189 Hanes JP, Schuster SG, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991; 62:147-152.
- 190 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(3):401-406.
- 191 Ohkuma S, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J Cell Biol* 1981; 90(3):656-664.
- 192 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(1):36-43.
- 193 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(4):283-286.

- 194 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(3):387-393.
- 195 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(6):603-608.
- 196 Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma* 2005; 19:17-22.
- 197 Kamar AR, El-Ghobar N, Marzec N, Margarone III JE, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 2006; 17:121-127.
- 198 Tanaka H, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sci* 2005; 77:2273-2284.
- 199 Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Yamanaka K, Oka H et al. Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochim et Biophys Sin* 2006; 38:874-882.
- 200 Carmella SG, Chen M, Zhang Y. Quantification of acrolein-derived (3-hydroxypropyl)mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chem Res Toxicol* 2007; 20:986-990.
- 201 Stevens J, Maier CS. Acrolein: Sources, metabolism and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:7-25.
- 202 Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y et al. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4882-4887.
- 203 Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycoaldehyde, 2-hydroxypropanal and acrolein: A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha, beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1997; 99:424-432.
- 204 Kehrer JP, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 2000; 57:6-15.
- 205 Horton ND, Mamiya BM, Kehrer JP. Relationships between cell density, glutathione levels and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology* 1997; 122:111-122.

- 206 Grafström RC, Dypbukt MJ, Willey JC. Pathobiological effects of acrolein in cultured human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 1988; 48:1717-1721.
- 207 Grafström RC, Dypbukt MJ, Atzori L, Sundqvist K, Nielsen I, Curren DR et al. Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis* 1994; 15:985-990.
- 208 Lieber CS. Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans* 1988; 16:241-247.
- 209 Annovazzi L, Cattaneo V, Perani E, Zanone C, Rota C, Pecora F et al. High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: methodological challenges for the determination of biologically relevant low-aliphatic aldehydes in human saliva. *Electrophoresis* 2004; 25:1255-1263.
- 210 Holden TE, Maier JM, Malinow MR. Cigarette smoke extract increases albumin flux across pulmonary endothelium in vitro. *J Appl Physiol* 1989; 66:443-449.
- 211 Homann N, Jousimies-Somer H, Jokeleimen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: a methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 1997; 18:1739-1743.
- 212 Seeman JI, Dixon M, Haussmann H-J. Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. *Chem Res Toxicol* 2002; 15(11):1332-1350.
- 213 Miyata T, Shibamoto T. Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke. *J Chromatogr* 1995; 693:376-381.
- 214 Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer* 2004; 111(4):480-483.
- 215 Dalhamn T, Edfors M-L, Rylander R. Mouth absorption of various compounds in cigarette smoke. *Arch Environ Health* 1968; 16:831-835.
- 216 Dalhamn T, Edfors M-L, Rylander R. Retention of cigarette smoke components in human lungs. *Arch Environ Health* 1968; 17:746-748.
- 217 McLaughlin SD, Scott BK, Peterson CM. The effect of cigarette on breath and whole blood-associated acetaldehyde. *Alcohol* 1990; 7:285-287.
- 218 Nicholls R, De Jersey J, Worrall S, Wilce P. Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. *Int J Biochem* 1992; 24(12):1899-1906.
- 219 Carnevali S, Nakamura Y, Mio T, Liu X, Takigawa K, Ronberger DJ et al. Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 274(4):591-598.

- 220 Wyatt TA, Schmidt SC, Rennard DJ, Tuma DJ, Sisson JH. Acetaldehyde-stimulated PKC activity in airway epithelial cells treated with smoke extract from normal and smokeless cigarettes. *Exp Biol Med* 2000; 225:91-97.
- 221 Wang H, Liu X, Umino T, Sköld CM, Zhu Y, Kohyama T et al. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair process. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(6):772-779.
- 222 Nardini M, Finkelstein EI, Reddy S, Valacchi G, traber M, Cross CE et al. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Toxicology* 2002; 170:173-185.
- 223 Lambert C, McCue J, Portas M, Ouyang Y, Li J, Rosano TG et al. Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:916-922.
- 224 Tanel A, Averill-Bates DA. Activation of the death receptor pathway apoptosis by the aldehyde acrolein. *Free Radical Biol Med* 2007; 42:798-810.
- 225 Finkelstein EI, Nardini M, van der Vliet A. Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(3):L732-L739.
- 226 Finkelstein EI, Ruben J, Koot W, Hristova M, van der Vliet A. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the a,b-unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:L1019-L1028.
- 227 Hurley MM, Martin DL, Kream BE, Raisz LG. Effects of ethanol and acetaldehyde on collagen synthesis, prostaglandin release and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Bone* 1990; 11(1):47-51.
- 228 Giuliani N, Girasole G, Vescovi PP, Passeri G, Pedrazzoni M. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol Clin Exp Research* 1999; 23(2):381-385.
- 229 Friedenstein RI. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995; 56:S17.
- 230 Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10:63-76.
- 231 Cattaneo V, Cetta G, Vezzoni F, Gallanti A, Boratto R, Poggi P. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 2000; 71:425-432.
- 232 Rota MT, Poggi P, Boratto R. Human Gingival Fibroblast Cytoskeleton is a target for volatil smoke components. *J Periodontol* 2001; 72:709-713.
- 233 Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatil fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodont Res* 2002;(37):230-235.

- 234 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(8):904-911.
- 235 Silcox D, Daftari KT, Bodden MK, Shimandale J, Hutton CW, Whitesides TE. The effect of nicotine on spine fusion. *Spine* 1995; 20:1594-1553.
- 236 Hollinger OJ, Schmitt JM, Buck D, Hwang K. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:294-301.
- 237 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(1):3-9.
- 238 Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Barbieri D, Moreno HJ, Nociti FG. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration. a histological study in dogs. *J Periodontol* 2004; 75(4):565-571.
- 239 Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FG. Histological evaluation of the effect of nicotine administration on bone regeneration. A study in dogs. *Braz Oral Res* 2004; 18(4):345-349.
- 240 Nociti FHJ, Stefani MC, Sallum EA, Duarte PM, Sallum AW. Nicotine and bone density around titanium implants: A histometric study in rabbits. *Implant Dent* 2002; 11:176-182.
- 241 Nociti FHJ, Neto CJB, Carvalho MD, Sallum AW, Sallum EA. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2002; 73:982-987.
- 242 Nociti FHJ, César-Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: A histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:347-352.
- 243 Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:80-85.
- 244 Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci* 2006; 78:1733-1740.
- 245 Coelho MJ, Trigo Cabral A, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in a-MEM and DMEM. *Biomaterials* 2000; 21:1087-1094.

-
- 246 Costa MA, Fernandes HR. Long - term effects of parathyroid hormone, 1,25 - dihydroxyvitamin D3 dexamethasone on the cell growth and functional, activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures. *Pharmacol Res* 2000; 42(4):345-353.
- 247 Fernandes HR. Culturas celulares de osso alveolar humano. *Revista de Saúde Oral* 1996; 2:87-95.
- 248 Gwynn IAP. Cell biology at interfaces. *J Mater Sci Mater Med* 1994; 5:357-360.
- 249 Anselme K. Osteoblasts adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21:667-681.
- 250 Cooper MG, Hausman RE. The cytoskeleton and cell movement. In: Cooper MG, editor. *The cell: a molecular approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 2007: 473-526.
- 251 David-Ferreira JF. Citoesqueleto: Composição, organização e significado funcional. In: Azevedo C, editor. *Biologia celular*. Lisboa: Lidel-Edições Técnicas, 1994: 189-202.
- 252 Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol* 2002; 29:763-770.
- 253 Costa MA, Fernandes HR. Proliferation/differentiation of osteoblastic human bone cell cultures in the presence of stainless steel corrosion. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11:141-153.
- 254 Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*. San Diego: 1996: 69-86.
- 255 McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone* 1995; 16(4):415-426.
- 256 Ahmad M, McCarthy M, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant material. *Biomaterials* 1999; 20:211-220.
- 257 Labelle D, Jumarie C, Moreau R. Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells. *Cell Prolif* 2007; 40:866-884.
- 258 Chang Y-C, Hsieh Y-S, Lii C-K, Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y. Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodont Res* 2003; 38:44-50.

- 259 Atzori L, Dypbukt JM, Hybbinette SS, Moldeus P, Grafström RC. Modifications of cellular thiols during growth of squamous differentiation of cultured human bronchial epithelial cells . *Exp Cell Res* 1994; 211:891-896.
- 260 Kang YJ, Enger MD. Glutathione content and growth in A549 human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1994; 187:177-179.
- 261 Kang YJ. Exogenous glutathione attenuates the antiproliferative effect of buthionine sulfoximine. *Toxicology* 1994; 88(177):189.
- 262 Kosower NS, Kosower EM. The glutathione statues of cells. *Int Rev Cytol* 1978; 1978(54):109-159.