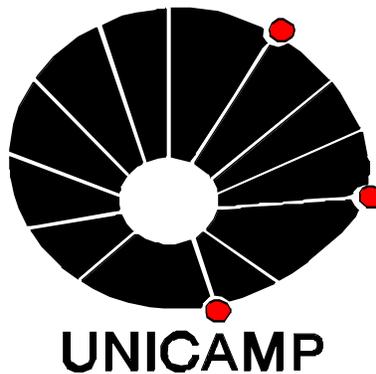


Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

BRUNO BRAGA BENATTI

Cirurgião-Dentista



Influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea. Estudo histológico em ratos.

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de mestre em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.**

**Piracicaba
2005**

BRUNO BRAGA BENATTI

Cirurgião-Dentista

Influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea. Estudo histológico em ratos.

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de mestre em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

**Banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior
Prof. Dr. Enílson Antônio Sallum
Prof. Dr. Élcio Marcantônio Júnior**

Piracicaba

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B431i	<p>Benatti, Bruno Braga. Influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea. Estudo histológico em ratos. / Bruno Braga Benatti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador: Francisco Humberto Nociti Júnior, Márcio Zaffalon Casati. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Envelhecimento. 2. Periodonto. I. Nociti Júnior, Francisco Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: The influence of cigarette smoke inhalation and nicotine administration on spontaneous periodontal regeneration. A histologic study in rats

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Aging; Periodontium

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Francisco Humberto Nociti Júnior; Enílson Antônio Sallum; Élcio Marcantônio Júnior

Data da defesa: 22/02/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2005, considerou o candidato BRUNO BRAGA BENATTI aprovado.

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

PROF. DR. ELCIO MARCANTONIO JUNIOR

PROF. DR. ENILSON ANTONIO SALLUM

2005 12047

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus pais **Juliano** e **Rita de Cássia**,*

pelo grande exemplo de caráter, honestidade e amor.

E por não medirem esforços para realizar meus sonhos e apoiarem as

minhas escolhas na vida.

*As minhas irmãs **Fernanda** e **Fabiana**,*

pelo amor, amizade e incentivo na luta pelos meus objetivos.

*A **Luciana**,*

pelo companheirismo, dedicação, amor e amizade

e que em tão pouco tempo despertou o amor no meu coração.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, de quem me afastei por muito tempo,

e hoje faz parte de todos os meus dias,

iluminando minha alma.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr., o Chico**, pela orientação, oportunidade e exemplo de amor à ciência. Mas principalmente pelo caráter, lealdade e amizade durante estes anos em Piracicaba.

Ao Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum**, pelo exemplo de determinação e dedicação ao ensino.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pela serenidade e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Enílson Antônio Sallum**, pela confiança e exemplo de conduta.

Ao Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pela amizade e ajuda nos primeiros passos desta caminhada.

Ao Prof. Dr. **Antônio Fernando Martorelli de Lima** (*in memoriam*), pela importância na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Getúlio da Rocha Nogueira Filho**, pela amizade e por abrir meu olhos para a ciência.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Magnífico Reitor Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz** e **vice-reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Diretor **Thales Rocha de Matos Filho** e Vice-Diretor **Oslei Paes de Almeida**.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao **Sr. Wanderley Francisco Vieira e a Dona Zuleica**, pelos cuidados dispensados aos animais.

A **Eliete**, por ser a alma do departamento e pela eterna competência e boa vontade em nos ajudar .

A **Mariana**, pela dedicação, esforço em aprender e auxílio no trabalho.

A **Srta. Heloísa Maria Ceccotti**, bibliotecária da FOP, pela orientação na formação da tese.

Aos amigos da **República Biotério** por tantas descobertas e momento felizes em Piracicaba.

Aos amigos de pós-graduação **Antonieta, Juliana, Luciana, Bruno, Robert, Renato, Fernando, Mariana, Fabíola, Danilo, Gabriela, Cléverson, Saulo, Ivana, Sandro, Érica e Guilherme**, pessoas indispensáveis para minha formação. Obrigado pela amizade e troca de conhecimentos e experiências.

A **Ângela, Suzana, Daiane, Poliana, Patrícia, João, Guilherme e Henrique** irmãos que Piracicaba me deu, que deixarão muitas saudades, mas eternas lembranças.

Aos Marcelos (**Goiano e Hermetos**), companheiros de república, que se tornaram a minha família nestes anos em Piracicaba e que tem lugar cativo no meu coração.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Impacto do consumo de cigarros de tabaco na saúde geral	5
2.2 Características da fumaça do cigarro	6
2.3 Fumaça de cigarro e seus componentes: estudos <i>in vitro</i>	8
2.4 Fumaça de cigarro e seus componentes: estudos <i>in vivo</i>	11
2.5 Fumaça de cigarro e seus componentes: Resposta ao tratamento periodontal	13
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Características da amostra	16
4.2 Delineamento Experimental	16
4.3 Exposição a fumaça de cigarro	16
4.4 Procedimento Cirúrgico	18
4.5 Análise Histomorfométrica	21
4.6 Análise Estatística	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	30

REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	37

RESUMO

Tem sido relatado que o consumo de cigarros influencia negativamente a cicatrização periodontal após procedimentos terapêuticos. Entretanto, existe pouca informação em relação à influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar histologicamente em ratos, o impacto da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina num modelo de reparo periodontal espontâneo. Foram utilizados neste estudo, 39 ratos adultos (*Rattus Norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), todos originários do centro de bioterismo da UNICAMP. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: Grupo 1 – controle (n=13), Grupo 2 – administração subcutânea de nicotina (3mg/kg), 3 vezes ao dia (n=13) e Grupo 3 – exposição à fumaça de cigarro, 3 vezes ao dia (n=13). Trinta dias após o início dos regimes, sob anestesia geral, foi criado um defeito do tipo fenestração (King *et al.*, 1997 modificado), tendo como dimensões 4mm de comprimento, 3mm de altura e 1mm de profundidade, com o objetivo de expor a região vestibular da raiz distal dos primeiros molares inferiores, e proporcionar a remoção do cimento dental. Os animais foram sacrificados 21 dias após a criação dos defeitos. Os resultados foram avaliados histometricamente para os seguintes parâmetros: extensão do defeito remanescente, porcentagem de preenchimento do defeito, densidade do novo osso e extensão de novo cimento. A análise intergrupo demonstrou que os defeitos tinham tamanho similar inicialmente, e que a exposição a fumaça de cigarro reduziu significativamente ($P \leq 0.05$) a densidade do novo osso ($80.07 \pm 3.45\%$, $76.37 \pm 5.27\%$, $72.74 \pm 6.24\%$, grupos 1, 2 e 3; respectivamente) e o preenchimento do defeito ($95.97 \pm 4.64\%$, $90.62 \pm 4.64\%$, $85.34 \pm 7.70\%$, grupos 1, 2 e 3; respectivamente). Não ocorreu a formação de novo cimento em nenhum dos grupos experimentais. Dentro dos limites deste estudo, a análise dos dados nos permite concluir que a fumaça de cigarro pode influenciar negativamente a regeneração periodontal espontânea em ratos.

ABSTRACT

Cigarette smoking has been shown to negatively influence healing following periodontal therapeutic procedures. However, limited information is available on the effect of cigarette smoking on periodontal self-healing capacity in sites not previously exposed to contaminants. Therefore, the aim of this study was to histologically evaluate in rats, the impact of cigarette smoke inhalation and nicotine administration on a spontaneous periodontal healing model. Thirty nine male adult Wistar rats were used, and randomly assigned to one of the following groups: Group 1- control (n=13), Group 2- subcutaneous nicotine administration (NA) (3mg/Kg) (n=13), and Group 3- cigarette smoke inhalation (CSI) (n=13). Thirty days after the beginning of CSI and NA regimens; periodontal fenestration defects (4x3x1mm) were created at the buccal aspect of the distal root of first mandibular molars, and the animals sacrificed 21 days after surgery. The percentage of bone fill and density of new formed bone, new cementum formation, and extension of the remaining defect were histometrically obtained. Intergroup analysis demonstrated that the defects were initially similar in size, and that CSI significantly reduced ($P \leq 0.05$) density of the newly formed bone ($80.07 \pm 3.45\%$, $76.37 \pm 5.27\%$, $72.74 \pm 6.24\%$, for group 1, 2 and 3; respectively) and bone filling ($95.97 \pm 4.64\%$, $90.62 \pm 4.64\%$, $85.34 \pm 7.70\%$, for group 1, 2 and 3; respectively). No new cementum was formed along the root surface in the above groups. Within the limits of the present study, data analysis suggests that smoking may influence the self-healing capacity of periodontal tissues regardless previous exposure to dental biofilm.

1 INTRODUÇÃO

O organismo é capaz de substituir células lesadas ou mortas promovendo o reparo dos tecidos após a inflamação através de dois mecanismos distintos: regeneração (substituição das células lesadas por outras do mesmo tipo) e fibroplasia ou fibrose (substituição por tecido conjuntivo). Ambos os eventos estão relacionados com migração, proliferação e diferenciação celulares. Estes processos são controlados, em grande parte, por mediadores químicos que inibem ou estimulam a proliferação celular através do recrutamento de células em repouso para o ciclo celular. Eles podem se originar de fatores de crescimento polipeptídicos, citocinas e inibidores do crescimento (Cotran *et al.*, 2000).

Os componentes da matriz extracelular como as proteínas de estrutura fibrosa, as glicoproteínas e os proteoglicanos, também desempenham um papel importante durante a reparação (Vernon & Sage, 1995). Através de sua estrutura e permeabilidade tais componentes modulam este processo por possuírem receptores de superfície celular que unem as células à matriz extracelular.

O processo de cura dos tecidos periodontais é similar a qualquer outro do organismo, podendo também ocorrer através de reparo (nova inserção, re-inserção, epitélio juncional longo e adesão conjuntiva) ou regeneração, definido como a reconstituição funcional do osso alveolar, cimento e ligamento periodontal (Glossary of Periodontal Terms, 1992).

Nos estágios iniciais, proteínas plasmáticas, principalmente o fibrinogênio, precipitam na região da lesão. Um infiltrado inflamatório de neutrófilos descontamina a ferida, enquanto macrófagos migram para região removendo células mortas e substâncias residuais, além de secretarem fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos, produção de matrix e angiogênese (Wikesjo & Selvig, 1999).

Já nos estágios de maturação e remodelação, o tipo de tecido formado dependerá, em grande parte, do fenótipo das células que povoarem a lesão (Melcher, 1976). Estudos têm demonstrado que células do ligamento periodontal são responsáveis, em parte, pela síntese do sistema de fibras dentogengivais, além de terem o potencial para diferenciar-se em cementoblastos e osteoblastos, sendo assim, essenciais para a regeneração periodontal (McCulloch & Melcher, 1983; Pitaru *et al.*, 1994).

Tem sido descrito que fatores podem interferir na qualidade e adequação da inflamação e do reparo dos tecidos. Alguns têm influência local como infecções, corpos estranhos além do tamanho e da localização da ferida (Cotran *et al.*, 2000). Outros têm ação sistêmica como nutrição, idade, diabetes e o consumo de cigarros (Kornman & Robertson, 2000). O consumo de cigarro tem sido considerado um forte marcador de risco e possivelmente um real fator de risco para a doença periodontal (Genco, 1996; Tonetti, 1998). Evidências experimentais demonstram que o fumo influencia negativamente a cicatrização periodontal após diversos procedimentos terapêuticos como raspagem e alisamento radicular associada ou não a antimicrobianos (Jin *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001), terapia cirúrgica (Scabbia *et al.*, 2001) e durante a fase de manutenção após a terapia ativa (Kaldahl *et al.*, 1996). Além disso, uma cicatrização comprometida após terapias regenerativas em defeitos intraósseos (Stavropoulos *et al.*, 2004), retrações gengivais (Trombelli & Scabbia, 1997; Martins *et al.*, 2004) e lesões de furca (Trombelli *et al.*, 2003), já foram relatadas. Em modelos animais sabe-se que a inalação da fumaça de cigarro pode promover um menor preenchimento ósseo ao redor de implantes (Nociti *et al.*, 2002a) e uma menor densidade óssea na região adjacente a implantes colocados em tíbias de ratos (Nociti *et al.*, 2002b).

A nicotina é o componente da fumaça de cigarro mais comumente relacionado a dificuldades na reparação tecidual e progressão da doença periodontal, por isso sua ação tem sido muito estudada. A meia-vida plasmática da nicotina é relativamente curta (de 30 a 150 minutos), quando então é convertida em seu metabólito primário, a cotinina, que apresenta meia-vida plasmática mais longa (11 a 24 horas) (McGuire, *et al.*, 1997). Estudos clínicos têm mostrado uma correlação positiva entre os níveis séricos de cotinina e severidade da doença periodontal (Gonzalez *et al.*, 1996; Machtei *et al.*, 1997). De maneira similar, estudos em modelo animal têm relatado uma maior perda óssea nos animais submetidos à aplicação de nicotina após a indução de doença periodontal (Nociti *et al.*, 2000; Nociti *et al.*, 2001), entretanto ela é apenas uma das mais de 4000 substâncias potencialmente tóxicas presentes na fumaça de cigarro.

Em todos os estudos disponíveis que já investigaram o efeito do consumo de cigarros na cicatrização periodontal, existe uma contaminação prévia por biofilme bacteriano nos sítios avaliados, entretanto, não há informação em estudos *in vivo*, se a fumaça de cigarro e/ou a nicotina podem influenciar a regeneração espontânea dos tecidos periodontais (ligamento periodontal, osso e cimento) em sítios não contaminados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impacto do consumo de cigarros de tabaco na saúde geral

O impacto do consumo de cigarros na saúde geral tem sido amplamente discutido na literatura médica. Sabe-se que o hábito de fumar está intimamente relacionado com um maior risco de doenças cardíacas e vários tipos de câncer. Observa-se ainda uma forte correlação com as doenças obstrutivas pulmonares crônicas, doenças vasculares periféricas, enfisema pulmonar, osteoporose e diabetes (World Health Organization-WHO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde estima que o consumo de cigarros foi responsável por cerca de 3 milhões de mortes em 1990 e que esse número aumentou para cerca de 4,023 milhões de mortes em 1998. Estima-se ainda que o tabagismo será responsabilizado por 8,4 milhões de mortes em 2020, alcançando a marca de 10 milhões de mortes por ano em 2030 (WHO, 2002).

Outra estimativa da Organização Mundial da Saúde afirma que há cerca de 1,1 bilhão de fumantes no mundo. Embora o consumo de tabaco tenha diminuído nos países desenvolvidos, observa-se um grande aumento nos países em desenvolvimento. A população chinesa tem sido muito estudada no que diz respeito ao hábito de fumar, pelo fato de ser uma população jovem em que dois terços dos adultos do sexo masculino são fumantes. Foram realizados dois grandes estudos avaliando o reflexo do tabagismo nessa população. O primeiro deles investigou a causa de morte de 1 milhão de pessoas em meados da década de 80 e o segundo acompanhou fumantes adultos. Os resultados desses estudos mostraram que 12% das mortes ocorridas na China eram atribuídas ao consumo de cigarros, valor muito próximo aos encontrados em países desenvolvidos (14,5%) (WHO, 2002).

Um outro aspecto importante é a influência que a fumaça de cigarro tem sobre as pessoas que convivem com fumantes (fumantes passivos). Nos EUA, o fumo passivo provoca cerca de 3000 mortes por câncer de pulmão por ano, enquanto as outras formas de poluição em ambiente externo causam cerca de 100 mortes de câncer de pulmão por ano.

Observa-se, ainda, que a exposição à fumaça de cigarro pode agravar a asma e outros problemas respiratórios, principalmente em crianças. As substâncias presentes na fumaça de cigarro influenciam

também as patologias cardíacas, pois elas afetam o músculo do coração, interferem no potencial dos vasos sanguíneos de regular a pressão arterial e tornam o sangue mais viscoso (WHO, 2002).

Inúmeros estudos já relataram os efeitos prejudiciais do consumo de cigarros de tabaco e do fumo passivo sobre a saúde geral, porém muitos governos relutam em tomar medidas para o controle do tabagismo pelo fato da indústria produtora de cigarros ser uma importante fonte de empregos para a população e de recursos financeiros para o governo. Entretanto, em 1999, o banco mundial realizou um estudo e constatou que medidas de restrição ao tabagismo, como o aumento das taxas, não causaria, em longo prazo, diminuição do número de empregos e traria muitos benefícios à saúde geral da população, além de economia com gastos médicos e hospitalares (WHO, 2002).

2.2 Características da fumaça do cigarro

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa de gases e partículas que possui mais de 4000 substâncias potencialmente tóxicas, incluindo 43 substâncias cancerígenas (Haverstoch & Mandracchia, 1998). A fase gasosa é composta principalmente por monóxido e dióxido de carbono, nitrogênio, oxigênio, cianeto de hidrogênio, acroleína, acetaldeído, formaldeído (Silverstein, 1992). Já a fase particulada tem como constituintes principais nicotina, água, nitratos, nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Hanes *et al.*, 1991).

A composição da fumaça varia de acordo com o tipo de tabaco e também com a preparação, como compactação do fumo, comprimento da coluna, características do filtro de papel (Ramos & Ramos, 1998). Além disso, outro aspecto importante é a temperatura de queima, que é mais alta nos fumantes que já apresentam dificuldades na respiração (Ramos & Ramos, 1998).

Quando a fumaça é inalada para dentro dos pulmões, muitos dos seus constituintes tóxicos têm partículas cujo tamanho é suficiente para afetar diretamente os cílios ou ultrapassar a barreira ciliar e penetrar na corrente sanguínea, alcançando outras regiões do organismo. Individualmente e em combinação, essas substâncias podem alterar as condições necessárias para a reparação tecidual (Silverstein, 1992). O primeiro relato dos efeitos deletérios do consumo de cigarros sobre a cicatrização foi publicado em 1977 por Mosely & Finseth, que observaram uma pior cicatrização de feridas na mão de um fumante com arteriosclerose. A partir daí, diversos trabalhos

têm relacionado o tabagismo com dificuldades na reparação tecidual (Jones & Triplett, 1992; Tonetti *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 1996; Scabbia *et al.*, 2001).

A nicotina, o monóxido de carbono e o cianeto de hidrogênio são os elementos da fumaça de cigarro mais comumente relacionados a um pior do processo de reparo (Silverstein, 1992; Haverstoch & Mandracchia, 1998). Outros componentes da fumaça de cigarro, como a acroleína e o acetaldeído, têm mostrado *in vitro* um efeito prejudicial na proliferação e adesão de células importantes para o processo de cicatrização (fibroblastos) (Cattaneo *et al.*, 2000). Autores como Silverstein (1992), relatam ainda, que outros constituintes da fumaça de cigarro também podem ter efeitos negativos sobre a reparação tecidual.

A nicotina é a razão primária pela qual as pessoas consomem produtos do tabaco, possui alto poder viciante e seu uso crônico pode causar dependência psicológica e física (Robbers *et al.*, 1997). Ao ser consumida, produz estimulação primária transitória seguida de depressão persistente de todos os gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos. Entre seus efeitos estão: taquicardia, estado de alerta, diminuição dos reflexos profundos e tônus muscular esquelético (Gennaro, 1998), além de promover uma sensação de disposição durante as primeiras horas do dia e de relaxamento, principalmente em situações de estresse (Robbers *et al.*, 1997). Presente nas folhas secas do tabaco (*Nicotiana tabacum*) na forma de malatos ou citratos (Robbers *et al.*, 1997) é classificada como um alcalóide, inodoro e incolor. Em contato com o ar adquire cor escura e odor característico do cigarro (Ramos & Ramos, 1998). Alguns de seus efeitos podem prejudicar os processos de reparo, como a liberação de catecolaminas que diminuem a perfusão tecidual e a alteração no metabolismo dos fibroblastos (Tipton & Dabbous, 1995), além da diminuição da proliferação de hemácias, macrófagos e fibroblastos (Sherwin & Gastwirth, 1990).

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro, insípido e não irritante que resulta da combustão incompleta da matéria orgânica (Klaassen, 1996). É o poluente mais encontrado na atmosfera inferior, e um grande número de mortes acontece anualmente devido a sua inalação (Klaassen, 1996). Corresponde a 4 % da fumaça de cigarro (Haverstoch & Mandracchia, 1998), sua toxicidade deve-se à alta afinidade pela hemoglobina. Esse gás se liga à hemoglobina nos capilares pulmonares e forma um composto altamente estável. Nessa forma, a hemoglobina não transporta oxigênio (O), pois ambos os gases reagem com os mesmos grupamentos da molécula (Klaassen, 1996). Como a afinidade pelo CO é cerca de 220 vezes maior que pelo O, o CO apresenta

seus efeitos mesmo em baixas concentrações (Klaassen, 1996). Indivíduos normais têm níveis de CO ligado à hemoglobina que variam de 0,5 a 1,0%, já nos indivíduos fumantes esses níveis podem variar de 1 a 20 %. A redução na capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue é proporcional à quantidade de hemoglobina ligada ao CO. Entretanto, a quantidade de O disponível para os tecidos é ainda menor pela influência inibitória da carboxihemoglobina na dissociação de qualquer molécula de oxihemoglobina ainda disponível (Klaassen, 1996). Esse conjunto de fenômenos pode diminuir a quantidade de O presente nos tecidos em reparação, gerando reflexos negativos nessas áreas (Sherwin & Gastwirth, 1990).

Outro componente da fumaça de cigarro que pode influenciar negativamente a reparação tecidual é o cianeto de hidrogênio, substância altamente tóxica utilizada em diversas áreas como inseticida e até como gás letal em execuções. O cianeto tem uma afinidade muito alta pelo ferro no estado férrico. Quando absorvido, reage prontamente com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria. A respiração celular é inibida resultando em acidose láctica e hipóxia citotóxica (Klaassen, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular podem prejudicar o processo de reparação dos tecidos (Mosely & Finseth, 1977).

Os aldeídos são formados pela combustão incompleta de hidrocarbonetos e pela oxidação dessas moléculas pela luz solar (Klaassen, 1996). Existem diversos tipos de aldeídos. Os mais freqüentes na atmosfera são o formaldeído e a acroleína, presentes também na fumaça de cigarro. Outro aldeído muito comum na fumaça de cigarro é o acetaldeído. O formaldeído pode causar irritação da mucosa nasal, ocular e vias aéreas superiores. A acroleína é muito mais tóxica que o formaldeído e é uma das substâncias que confere a qualidade irritante da fumaça do cigarro. Tal substância produz diminuição da freqüência respiratória e aumento da resistência das vias aéreas superiores. Um estudo recente (Cattaneo *et al.*, 2000) observou que a acroleína e o acetaldeído alteram a proliferação e adesão dos fibroblastos gengivais *in vitro* e sugere que esses efeitos podem ocorrer *in vivo*.

2.3 Fumaça de cigarro e seus componentes: estudos *in vitro*

Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que a fumaça de cigarro e seus componentes apresentam efeitos negativos em culturas de células ósseas. Ramp *et al.* (1991) estudaram o efeito da nicotina sobre culturas de células tipo osteoblasto. Os resultados mostraram que a nicotina inibiu a

atividade da fosfatase alcalina e a síntese de colágeno num padrão dose-dependente. Não foram observados efeitos da nicotina sobre as proteínas não-colágenas e observou-se uma estimulação da síntese de DNA.

No ano de 1999, Yuhara *et al.* avaliaram a influência da nicotina sobre o metabolismo ósseo de culturas de células. Para esse estudo foram utilizadas 3 linhagens de células: clonais osteogênicas da calvária de ratos (ROB-C26), clonais pré-osteoblásticas da calvária de camundongos (MC3T3-E1) e células tipo osteoblasto retiradas de uma co-cultura de células da medula óssea de ratos. Os resultados revelaram que a nicotina estimulou a deposição de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina nas células ROB-C26. Por outro lado ambas as atividades foram diminuídas nas células MC3T3-E1. Observou-se ainda que a nicotina afetou a diferenciação das células tipo osteoblasto. Os autores dessa pesquisa concluíram que a nicotina pode ter um efeito crítico sobre o metabolismo ósseo.

Em 2001, Liu *et al.* realizaram um experimento avaliando a ação direta da fumaça de cigarro sobre células osteoprogenitoras humanas. Para isso, células da medula óssea foram isoladas de indivíduos normais e cultivadas em monocamadas e em um gel tridimensional de colágeno tipo 1. Em ambas as condições de cultura, a fumaça de cigarro inibiu a proliferação das células osteoprogenitoras num padrão dose-dependente. Observou-se também que a fumaça de cigarro impediu a diferenciação das células osteoprogenitoras em células tipo osteoblasto e que as culturas em monocamadas estavam mais susceptíveis aos efeitos adversos da fumaça de cigarro.

Num estudo recente, Andreou *et al.* (2004), cultivaram células derivadas da região medular do fêmur de ratos e em seguida as expuseram a hidrocarbonetos presentes na fumaça de cigarro, associados ou não a lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados demonstraram que estas substâncias isoladas tinham efeito deletério sobre a osteogênese, entretanto, houve um efeito sinérgico entre os hidrocarbonetos e o LPS reduzindo a formação de nódulos minerais em até 9 vezes, podendo explicar em parte porque fumantes com doença periodontal tem maior perda óssea e um pior prognóstico após tratamento.

Muitos estudos também têm sido realizados com o objetivo de observar os efeitos da fumaça de cigarro e seus componentes sobre os fibroblastos. Essas células têm uma função crítica no metabolismo do tecido conjuntivo, sendo importantes para os tecidos normais e em reparação. De maneira geral, as culturas de fibroblastos apresentam-se como uma monocamada de células

fusiformes, superfície lisa, alinhamento paralelo e mínima sobreposição (Trypton & Dabbous, 1995; James *et al.*, 1999). Já as culturas submetidas à ação da nicotina mostram células com arranjo desorganizado, sobreposições, anatomia alterada, vacuolização do citoplasma, redução do conteúdo protéico e destruição das membranas celulares (Raulin *et al.*, 1988; Trypton & Dabbous, 1995; Tanur *et al.*, 2000).

James *et al.* (1999) investigaram a ação da nicotina e do seu metabólito primário, a cotinina, sobre culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLP). Os resultados revelaram que a nicotina inibiu a adesão e o crescimento dos FLP em todas as concentrações estudadas (>1mg/ml e >0,5 mg/ml). Já a cotinina parece inibir o crescimento e adesão dos FLP na maior concentração estudada (10 µg/ml), porém esse resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Em 2002, Chang *et al.* realizaram um estudo investigando possíveis mecanismos da influência da nicotina sobre fibroblastos do ligamento periodontal. Os autores demonstraram que a nicotina inibia o crescimento celular em até 86% e a quantidade de síntese de proteínas em 44%. Em seguida os autores adicionaram a cultura antioxidantes e antagonistas de radicais livres na tentativa de proteger a célula da nicotina. Os resultados demonstraram que os antioxidantes foram efetivos diminuindo a citotoxicidade da nicotina, sugerindo que a depleção de tiol é um dos mecanismos pelos quais a nicotina atinge os fibroblastos.

Peacock *et al.* (1993) também avaliaram a influência da nicotina em culturas de fibroblastos gengivais. Entretanto, seus resultados foram conflitantes com os citados anteriormente. Observou-se nesse estudo que altas concentrações de nicotina não produziram nenhum efeito nas culturas e que, em baixas concentrações, a nicotina estimulou a reprodução celular. Os autores sugeriram que a nicotina não seria a única substância envolvida nas respostas teciduais provocadas pelo tabaco e que outros agentes presentes na fumaça poderiam ser responsáveis pelos efeitos negativos.

Sendo assim, Cattaneo *et al.* (2000) e Poggi *et al.* (2002) pesquisaram a ação de dois outros componentes da fumaça de cigarro, a acroleína e o acetaldeído, sobre os fibroblastos gengivais humanos (FGH). FGH derivados de indivíduos saudáveis e sem inflamação gengival foram utilizados nessa pesquisa. Os resultados mostraram que as duas substâncias inibiam o crescimento,

proliferação, viabilidade e adesão dos FGH de maneira dose-dependente. Além disso, alterações no citoesqueleto como a destruição de microtubúlos e filamentos de actina também foram observadas.

2.4 Fumaça de cigarro e seus componentes: Estudos *in vivo*

Em 1993, Broulik & Jarab estudaram a influência da nicotina sobre a concentração óssea mineral em ratos. Foram incluídos no estudo 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais e submetidos ao seguinte tratamento: A - controle, B - nicotina via água de bebedouro, C - castração e D - castração e nicotina via água de bebedouro. Após 56 dias, os animais foram sacrificados e o fêmur analisado. Os resultados revelaram que os animais dos grupos B e D (grupos que receberam nicotina) apresentaram uma significativa redução na densidade óssea e no componente ósseo mineral, quando comparados aos outros grupos.

Ueng *et al.* (1997) estudaram o efeito da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo de tíbias de coelhos submetidas a um procedimento cirúrgico de alongamento. Foram utilizados 38 animais divididos em 2 grupos (teste: fumaça de cigarro e controle). A tíbia direita de cada animal foi alongada 5 mm. 5 animais de cada grupo foram sacrificados 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias para os testes de resistência mecânica, e 1 animal de cada grupo foi sacrificado 2, 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias, para as análises histológicas de reparo ósseo. Os resultados demonstraram que os animais submetidos à fumaça de cigarro obtiveram menor resistência no teste mecânico e que, histologicamente, a reabsorção do tecido de granulação, formação óssea e remodelação foi prejudicada.

Hollinger *et al.* (1999) avaliaram o efeito da nicotina sobre o reparo ósseo em ratos que receberam enxerto ósseo autógeno. Para isso, foram criados defeitos bilaterais (4 mm de diâmetro) na região parietal de 60 animais, nos quais o lado esquerdo servia como leito doador e era deixado cicatrizar espontaneamente, e o lado direito recebia o enxerto. Parte da amostra recebeu nicotina em 3 concentrações distintas via água do bebedouro (12,5 mg/ml, 25 mg/ml e 50 mg/ml) e foi comparada com animais que não receberam nicotina. Os resultados revelaram que não houve diferenças no reparo ósseo dos defeitos que receberam enxerto autógeno, entretanto a nicotina influenciou negativamente o reparo dos leitos doadores.

Nociti *et al.* (2000) analisaram o papel da nicotina na progressão da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Para isso, foram utilizados 20 ratos divididos em 4 grupos, 1 controle e 3

testes que receberam as seguintes concentrações de nicotina por ml de solução fisiológica: 0,13 µl, 0,19 µl e 0,26 µl. Concluiu-se que a nicotina potencializou a progressão da doença periodontal num padrão não dose-dependente.

Num estudo subsequente realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, Nociti et al. (2001) utilizaram a mesma metodologia para avaliar a influência de outras dosagens de nicotina na progressão da doença periodontal em ratos (0,37, 0,57 e 0,73 mg de nicotina/kg). Os resultados desse estudo mostraram um efeito dose-dependente da nicotina sobre a progressão da doença periodontal e, além disso, observou-se que a nicotina parece ter uma ação deletéria direta sobre os tecidos periodontais.

Stefani *et al.* (2002) avaliaram a influência da administração de nicotina sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio. Foram utilizados nesse experimento 32 coelhos que receberam 2 implantes em cada tibia (um de superfície usinada e um jateado com óxido de alumínio). Embora tenha sido observada uma tendência numérica de que a nicotina influenciou negativamente o contato ósseo para os implantes de superfície usinada, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Concluiu-se, nesse estudo, que a nicotina parece não influenciar o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio.

Sendo assim, César-Neto *et al.* (2003) investigaram em ratos, a influência da administração de nicotina (3mg/Kg 2x ao dia) e da inalação da fumaça de cigarro (3X ao dia) durante 60 dias, sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio. Os resultados mostraram que a fumaça de cigarro diminuiu a quantidade de contato osso-implante e a área de preenchimento ósseo dentro das roscas tanto na zona cortical quanto na medular enquanto a nicotina influenciou apenas o preenchimento das roscas na região medular. Os autores concluíram que o impacto negativo do consumo de cigarros está relacionado a mais de uma molécula presente em toda a fumaça de cigarro, sendo a nicotina parcialmente responsável por tais efeitos.

Já Saldanha *et al.* (2004), avaliaram em cães, o efeito da administração de nicotina (2mg/Kg, 2X ao dia, 4 meses) em defeitos ósseos tratados com regeneração óssea guiada (ROG). Os resultados demonstraram que a nicotina foi capaz de influenciar a área e densidade do osso neoformado quando comparados ao grupo controle que não recebeu nicotina. Os autores concluíram que a nicotina pode influenciar, mas não prevenir o reparo ósseo em defeitos tratados por ROG, entretanto os mecanismos e importância clínica destes achados ainda necessitam ser investigados.

2.5 Fumaça de cigarro e seus componentes: Resposta ao tratamento periodontal

Inúmeros estudos têm avaliado a influência do consumo de cigarros na resposta ao tratamento periodontal realizado por diversas modalidades terapêuticas. Um estudo realizado por Grossi *et al.* (1997), avaliou o efeito do consumo de cigarros sobre a resposta ao tratamento de raspagem e alisamento radicular. Foram avaliados 28 pacientes fumantes e 60 não fumantes. Após 3 meses, foi constatado que nos fumantes, o ganho no nível clínico de inserção foi em média 0,5mm menor e que a redução nas bolsas profundas ($\geq 5\text{mm}$) foi de 48% contra 72% nos não-fumantes. Além disso, apenas 33% dos fumantes apresentaram resultado negativo para *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* contra 75% dos não-fumantes.

Já em 2001, Scabbia *et al.* avaliaram 28 pacientes fumantes e 29 pacientes não-fumantes com pelo menos uma área com três dentes que necessitasse de acesso cirúrgico para raspagem e alisamento radicular. Após seis meses de acompanhamento foi observado que em sítios que inicialmente apresentavam profundidade de sondagem moderada (4mm a 6mm) não houve diferença com relação a profundidade de sondagem e nível clínico de inserção. Entretanto, em sítios inicialmente profundos ($> 7\text{mm}$), a redução na PS foi de $3\text{mm} \pm 1\text{mm}$ em fumantes e $4\text{mm} \pm 0,8\text{mm}$ nos não - fumantes, e o ganho no NCI de $2,8\text{mm} \pm 1\text{mm}$ nos não fumantes e $1,8\text{mm} \pm 1,1$ nos fumantes. Além disso, foi observado que nos fumantes, apenas 16% dos sítios reduziram sua PS para menos de 3mm contra 47% nos não-fumantes, enquanto um ganho no NCI maior de 2mm ocorreu em 58% dos sítios nos fumantes e em 82% nos não-fumantes.

Num outro estudo realizado por Trombelli *et al.* (2003), os autores avaliaram o efeito do consumo de cigarros na terapia cirúrgica em lesões de furca classe I e II. Foram avaliados 19 pacientes fumantes e 12 não-fumantes. Após 6 meses, os autores observaram que o ganho clínico de inserção foi significativamente maior nos não-fumantes do que nos fumantes ($1,3 \pm 1,1$ e $1 \pm 1,3$ respectivamente). Outro achado interessante foi que nos fumantes, 27,6% das lesões progrediram de grau II para I contra 38,5% nos não fumantes. Além disso, 3,4% das lesões grau I nos fumantes fecharam completamente contra 27,8% nos não fumantes.

A influência do consumo de cigarros na terapia regenerativa em defeitos intra-ósseos foi avaliada por Stavropoulos *et al.* (2004), em 47 defeitos tratados com raspagem e membrana reabsorvível. Foi observado que em fumantes, o ganho no NCI foi em média 1mm menor do que nos

não-fumantes e que a chance de fumantes atingirem um ganho de 4mm no NIC e sete vezes menor do que nos não-fumantes.

Baseado no fato de que fumantes possuem uma resposta menos favorável ao tratamento periodontal e que a eliminação de periodontopatógenos é mais difícil em fumantes, Machtei *et al.* (2003) propuseram um protocolo para o tratamento de lesões de furca grau II. Foram utilizados 38 pacientes fumantes divididos em grupo teste e controle. No grupo teste, as furcas foram raspadas e uma membrana posicionada na região com uma aplicação subsequente de gel de metronidazol (25%) na face externa da membrana. Durante a fase pós-operatória, foi prescrito 100mg de doxiciclina diariamente de 6 a 8 semanas, além de uma profilaxia e reaplicação de metronidazol na região operada semanalmente. No grupo controle, as furcas foram raspadas e uma membrana posicionada. Durante a fase pós-operatória, foi prescrito 100mg de doxiciclina diariamente por 1 semana, e profilaxias realizadas a cada duas semanas. Após um ano, a altura e espessura das furcas diminuíram no grupo teste e aumentaram no grupo controle, indicando que em fumantes uma terapia anti-infecciosa agressiva deve ser incorporada com o intuito de melhorar os resultados obtidos com técnicas regenerativas.

Com relação ao impacto da fumaça de cigarros no recobrimento de recessões gengivais, Trombelli & Scabbia (1997) trataram recessões gengivais classe I e II de Miller utilizando uma membrana de politetrafluoretileno expandido em 9 pacientes fumantes e 13 pacientes não-fumantes. Após 6 meses, os resultados demonstraram que nos fumantes houve uma menor taxa de recobrimento radicular (57%) quando comparados aos não-fumantes (78%). Num outro estudo, Martins *et al.* (2004) avaliaram a influência do consumo de cigarros no tratamento de recessões gengivais classe I e II de Miller com enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em 7 paciente fumantes e 8 não-fumantes. Após 120 dias, a análise intragrupo revelou que a técnica empregada promoveu recobrimento radicular, aumento da espessura gengival e ganho de inserção clínica em ambos os grupos. Entretanto, a análise intergrupo demonstrou que nos fumantes houve uma menor porcentagem de recobrimento radicular (58,84% contra 74,73%), menor ganho de inserção (2,54mm contra 2mm) e maior profundidade de sondagem (2,35 contra 1,56) do que nos não-fumantes ($P < 0,05$).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1- Avaliar a influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea em defeitos do tipo fenestração não contaminados previamente pelo biofilme dental bacteriano;
- 2- Comparar os efeitos da inalação da fumaça de cigarro com os efeitos da administração de nicotina;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

Foram utilizados 39 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de 5 dias para a aclimação ao ambiente do laboratório. Durante todo o período do estudo, os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da UNICAMP (protocolo 541-1).

4.2 Delineamento Experimental

Foram utilizados 39 animais aleatoriamente divididos em 3 grupos:

Grupo 1 (controle): 13 animais que não foram expostos à fumaça e não receberam nicotina durante todo o período experimental;

Grupo 2 (nicotina): 13 animais que receberam uma administração subcutânea de nicotina (3mg/kg) durante todo o período experimental, 3 vezes ao dia.

Grupo 3 (fumaça): 13 ratos que foram expostos à fumaça de 10 cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono por três períodos diários, durante 51 dias. Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação que era constituído de 2 dias: no primeiro dia ficavam expostos por 3 períodos de 5 minutos, no segundo dia, por 3 períodos de 7 minutos e, a partir do terceiro dia, os animais eram expostos em 3 períodos diários de 8 minutos.

4.3 Exposição a fumaça de cigarro

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier *et al.* (1983) e posteriormente modificada (Cendon-Filha, 1993). Trata-se de um recipiente de acrílico transparente, com dimensões de 45 X 25 X 20 cm³, composto por 2 câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nessa parte há

também uma entrada por onde é bombeado ar, formando uma corrente que leva a fumaça para a segunda câmara, onde ficam os animais. Na segunda câmara há outro orifício que dá vazão ao ar bombeado (Figuras 1 e 2).

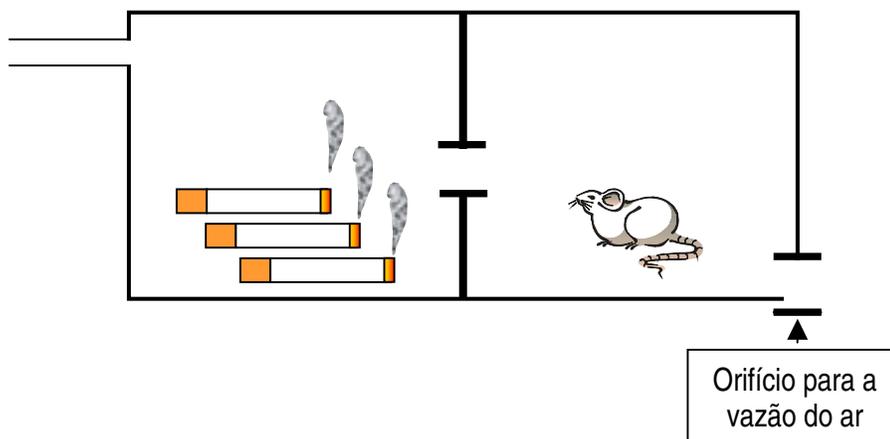


Figura 1- Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça. Observa-se a câmara 1 onde os cigarros eram posicionados e a câmara dois, onde os animais permaneciam durante a exposição à fumaça de cigarro.



Figura 2- Câmara de exposição à fumaça de cigarro

Após 30 dias do início da exposição à fumaça de cigarro e da administração de nicotina, os animais dos grupos 1, 2 e 3, foram submetidos a criação de um defeito periodontal do tipo fenestração (King *et al.*, modificado) e sacrificados 21 dias após a realização da cirurgia (Figura 3).

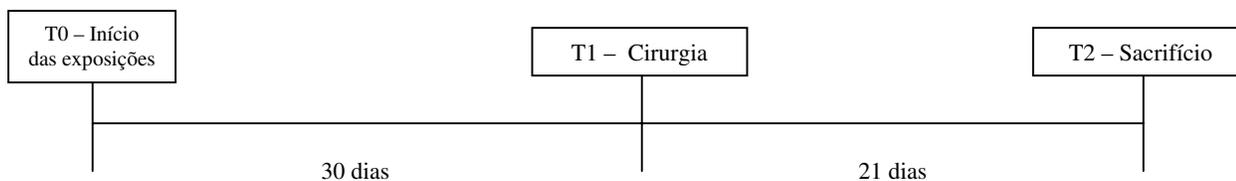


Figura 3- Delineamento experimental

4.4 Procedimento Cirúrgico

Antes da cirurgia, os animais foram pesados e de acordo com seu peso corpóreo anestesiados com solução de ketamina (1ml/kg/IM) (Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg/IM) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil). Uma solução de álcool iodado foi utilizada para a anti-sepsia do campo operatório. Após tricotomia na região mandibular, foi feita uma incisão superficial de aproximadamente 2cm na altura da comissura labial, no sentido ântero-posterior. A fáscia superficial foi separada, expondo o músculo masseter. As inserções musculares foram incisadas, e tanto o músculo quanto o periósteo, elevados para exposição do tecido ósseo mandibular. Com o auxílio de um microscópio cirúrgico, o tecido ósseo que reveste a região vestibular da raiz distal dos primeiros molares foi removido com o auxílio de uma broca esférica número 4, até que um defeito de cerca de 4mm de comprimento, 2mm de altura e 1mm de profundidade foi criado (Figura 4-8). A margem superior do defeito estava localizada logo abaixo da linha mucogengival, e acima da região apical das raízes assegurando que os dentes não percam vitalidade. Em seguida, com o auxílio de curetas, a superfície radicular foi cuidadosamente raspada e alisada com o objetivo de remover cimento dental, ligamento periodontal e dentina superficial. Os defeitos foram então irrigados constantemente com solução salina fisiológica (0,9%) para a remoção de fragmentos que poderiam interferir com o processo de reparação.

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (1 ml/Kg/IM) (Pentabiótico; Whitehall LTDA, São Paulo, S.P., Brasil). Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi feita aos animais após a cirurgia, os quais foram mantidos em gaiolas durante todo o período experimental.

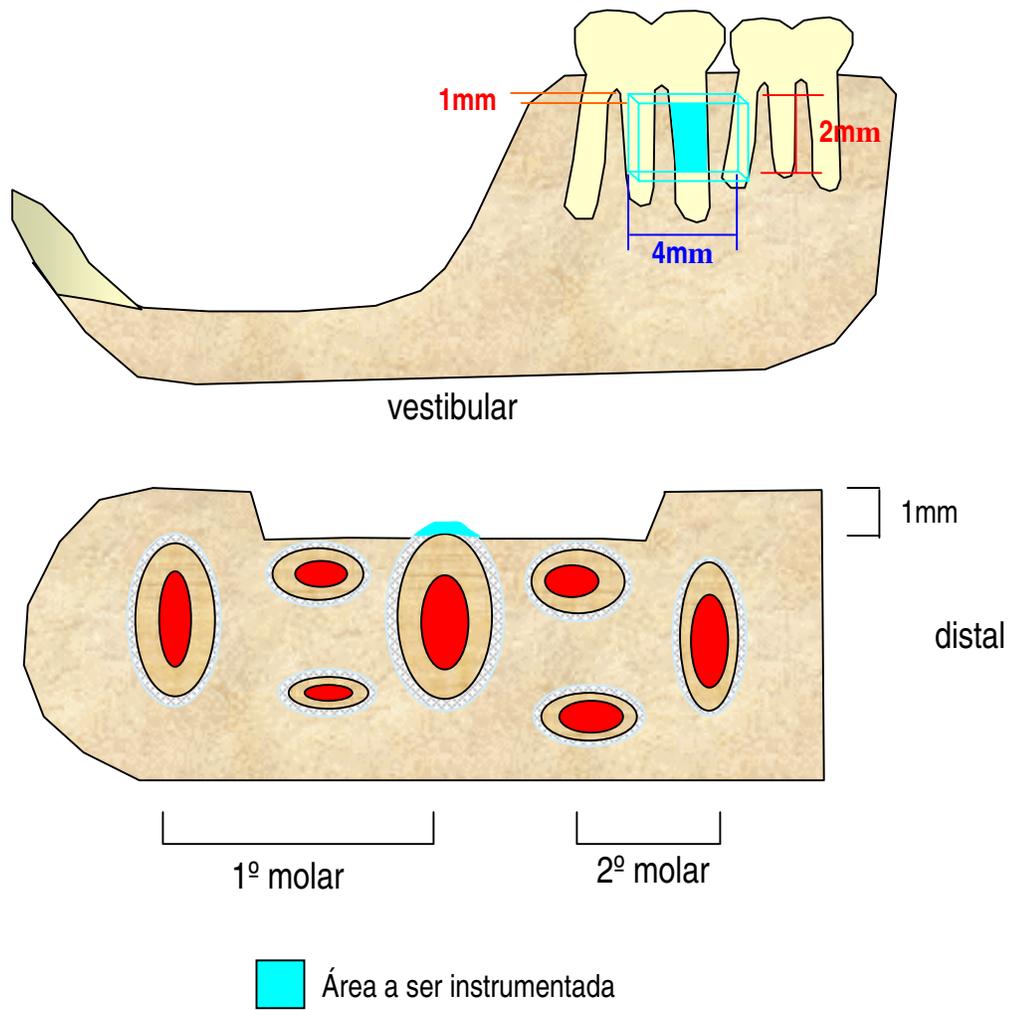


Figura 4- Ilustração esquemática do defeito tipo fenestração criado cirurgicamente



Figura 5- Campo operatório



Figura 6- Exposição da face vestibular da mandíbula

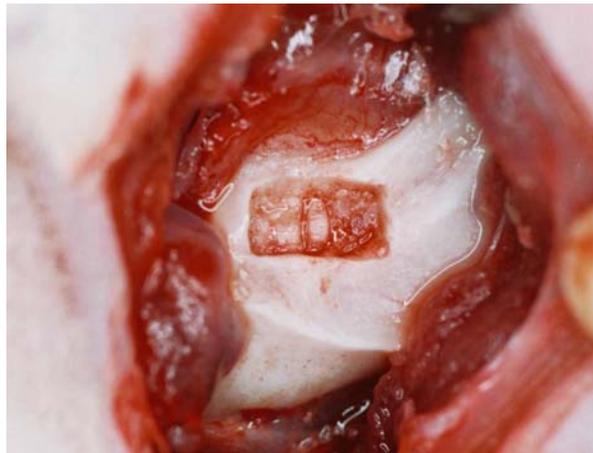


Figura 7- Criação do defeito periodontal

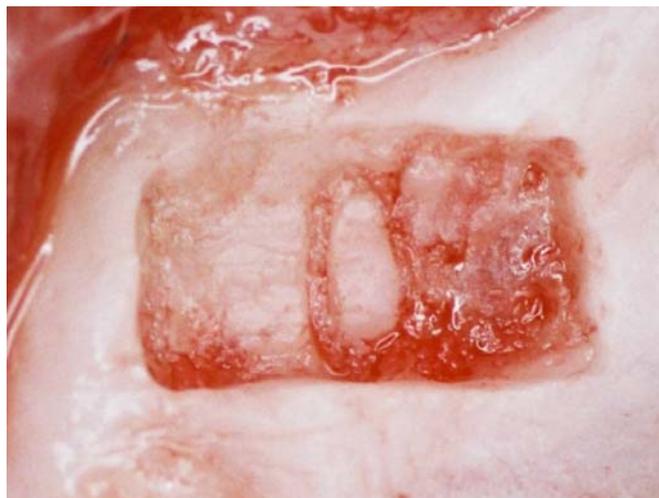


Figura 8- Exposição da raiz distal do primeiro molar inferior

4.5 Análise Histomorfométrica

Após o período experimental, os animais foram sacrificados com uma dose letal do anestésico. As mandíbulas foram removidas completamente, divididas pela sínfise mandibular e fixadas em formol tamponado neutro a 4%. A descalcificação foi realizada em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais (solução de Morse) sob agitação constante, seguindo posteriormente a tramitação laboratorial de rotina. Secções seriadas com 7 μm de espessura foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina. Com o auxílio de um programa para análise de imagens (Image Pro[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) 10 secções representativas da região média do defeito foram avaliadas em relação à quatro parâmetros : extensão do defeito remanescente, área de preenchimento do defeito (novo osso), densidade do novo osso e extensão de novo cemento (Figura 9). Para a obtenção da medida de área, um retículo (quadrados) foi posicionado de maneira que sempre incluísse a região delimitada pela superfície do dente e a superfície externa do tecido ósseo. Por fim, as amostras mais representativas foram selecionadas e uma análise morfológica descritiva realizada.

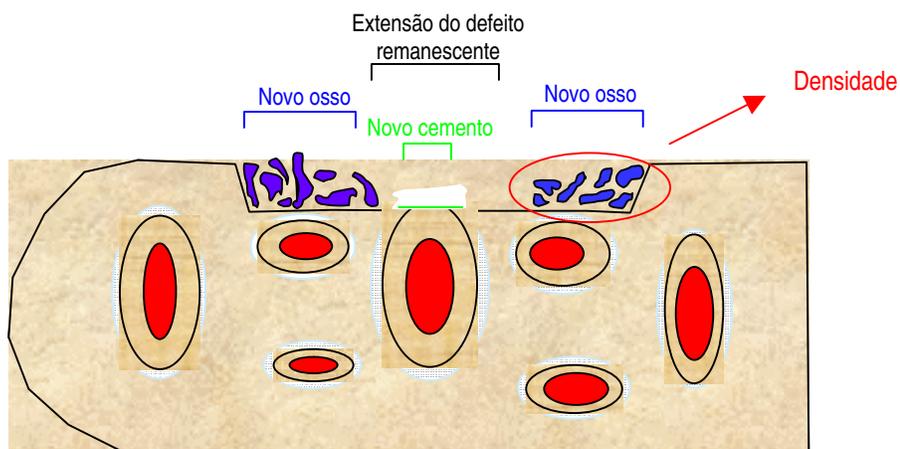


Figura 9- Ilustração esquemática dos parâmetros histométricos avaliados

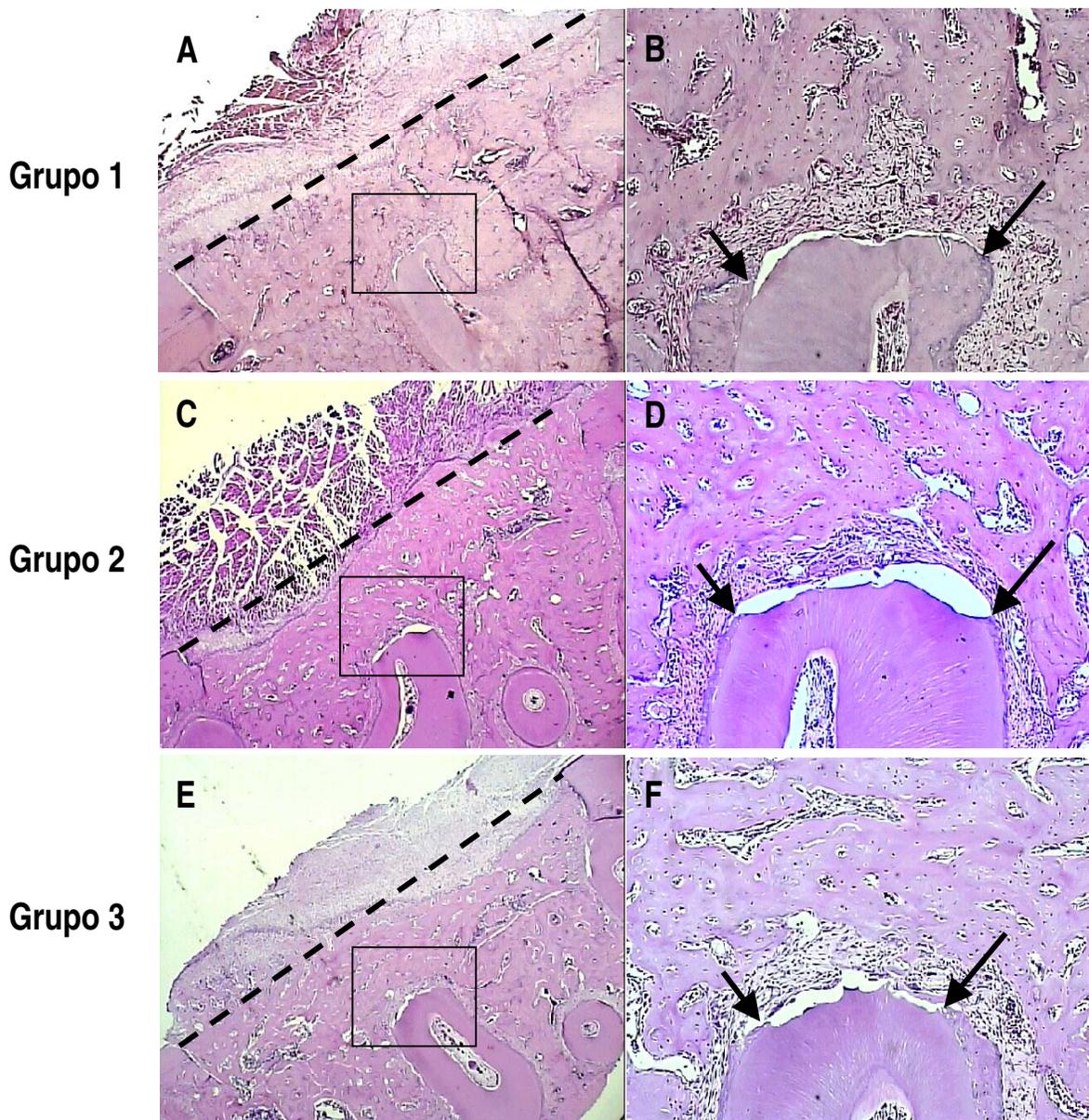


Figura 10: Ilustração histológica da cicatrização periodontal após 21 dias da criação do defeito periodontal (corante H&E). As linhas nas figuras A, C e E correspondem a extensão original do defeito, enquanto as setas nas figuras B, D e F indicam as margens do cimento pré-existente. As figuras A/B representam o grupo 1 (controle), C/D representam o grupo 2 (administração de nicotina), e E/F representam o grupo 3 (inalação da fumaça de cigarro) (aumentos A, C e E: 5X; B, D e F: 20X).

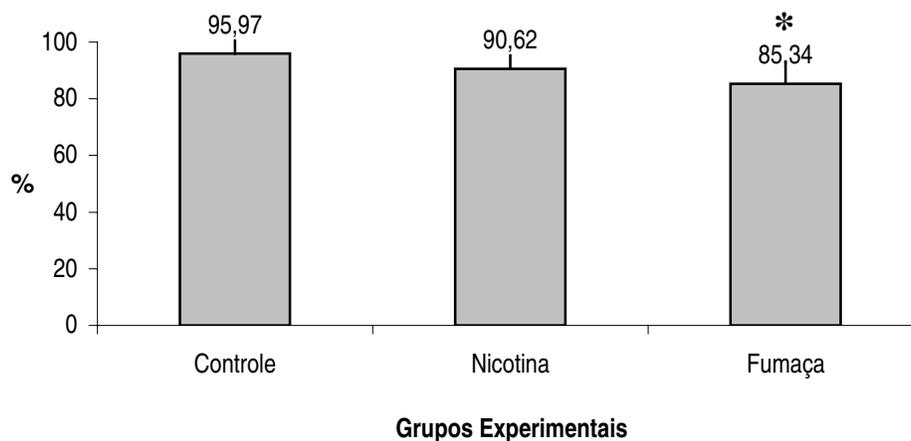
4.6 Análise Estatística

Uma vez obtidos os dados de cada defeito, médias representativas de cada animal foram obtidas e comparadas estatisticamente entre os grupos (análise intergrupos) com o auxílio do teste não paramétrico de Kruskal - Wallis ($\alpha= 5\%$). Quando detectada diferença estatística, o teste não paramétrico de Dunn ($\alpha= 5\%$) foi utilizado para detectar a diferença.

5 RESULTADOS

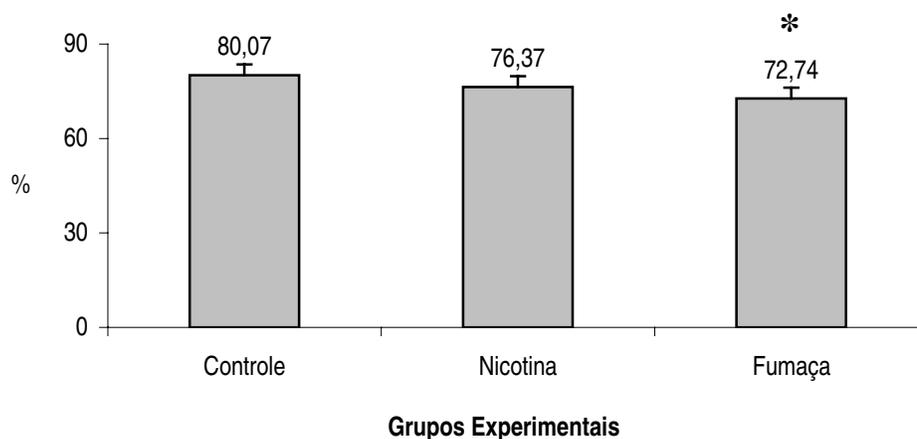
As análises histológicas mostraram que dentro da área do defeito houve um preenchimento composto de novo osso e tecido fibroso. Não houve a formação de novo cemento sobre a superfície das raízes em nenhum dos grupos experimentais. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao tamanho inicial dos defeitos ($4.19 \pm 0.22\text{mm}$, $4.10 \pm 0.13\text{mm}$, $4.09 \pm 0.21\text{mm}$, para os grupos 1, 2 e 3; respectivamente, $P > 0.05$). A análise intergrupo demonstrou que a exposição a fumaça de cigarro reduziu significativamente a densidade do novo osso ($80.07 \pm 3.45\%$, $76.37 \pm 5.27\%$, $72.74 \pm 6.24\%$, grupos 1, 2 e 3; respectivamente) e o preenchimento do defeito ($95.97 \pm 4.64\%$, $90.62 \pm 4.64\%$, $85.34 \pm 7.70\%$, grupos 1, 2 e 3; respectivamente) ($P < 0.05$). Na maioria das secções examinadas toda a extensão do defeito havia sido preenchida por tecido ósseo neoformado, ocorrendo apenas uma leve tendência numérica para a existência de maiores defeitos remanescentes para o grupo exposto a fumaça de cigarro, entretanto sem diferença estatística entre os grupos ($0.03 \pm 0.09\text{mm}$, $0.08 \pm 0.11\text{mm}$, 0.20 ± 0.31 , grupos 1, 2 e 3; respectivamente ($P > 0.05$)). Os resultados das medidas histométricas estão sumarizados nas figuras 10 e 11.

Figure 10: Média e desvio padrão (%) do preenchimento do defeito 21 dias após a criação dos defeitos em todos os grupos experimentais.



* Estatisticamente significativa – Análise intergrupo mostrando uma redução significativa no preenchimento do defeito nos animais expostos a inalação da fumaça de cigarro(Kruskal-Wallis – $P < 0.05$).

Figure 11: Média e desvio padrão (%) da densidade do novo osso (proporção de tecido mineralizado) 21 dias após a criação dos defeitos em todos os grupos experimentais.



* Estatisticamente significativa – Análise intergrupo mostrando uma redução significativa na densidade do novo osso nos animais expostos a inalação da fumaça de cigarro(Kruskal-Wallis – $P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou histologicamente em ratos, o impacto da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina na regeneração periodontal espontânea. A análise dos dados demonstrou que a exposição a fumaça de cigarro reduziu significativamente a densidade do osso neoformado e do preenchimento do defeito quando comparados ao grupo controle e ao submetido à administração de nicotina, que por sua vez, não exerceu influência sobre o reparo periodontal. Dentro do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que investigou a capacidade do consumo de cigarros em afetar a cicatrização periodontal sem a presença de biofilme dental.

Muitos trabalhos clínicos têm comparado a resposta de fumantes e não fumantes a variados procedimentos terapêuticos periodontais, dentre eles as terapias cirúrgicas e não-cirúrgicas. A maioria destes estudos mostra uma menor progressão nos parâmetros clínicos de pacientes fumantes quando comparados aos não fumantes (Kaldahl *et al.*, 1996; Trombelli & Scabbia, 1997; Jin *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Scabbia *et al.*, 2001; Trombelli *et al.*, 2003; Stavropoulos *et al.*, 2004). Num acompanhamento longitudinal de seis anos, pacientes fumantes obtiveram em média 50% menos ganho de inserção e diminuição de profundidade de sondagem do que os não fumantes (Ah *et al.*, 1994). Em outro estudo retrospectivo, Papantonopoulos (1999) demonstrou, que após terapia não-cirúrgica o cigarro exerceu influência sobre o reparo periodontal de três maneiras diferentes: a porcentagem de redução na profundidade de sondagem em bolsas ≥ 6 mm foi menor em fumantes, a correlação entre a porcentagem residual de bolsas ≥ 6 mm em fumantes se correlacionou significativamente as porcentagens iniciais e que o fumo foi um fator preditor na porcentagem de dentes que necessitaram de tratamento adicional.

Os mecanismos envolvidos na influência do cigarro sobre a reparação periodontal ainda não estão completamente esclarecidos. Para um melhor entendimento dos fenômenos que estão por trás destes efeitos negativos na resposta ao tratamento, a relação entre o consumo de cigarros e a resposta do hospedeiro tem sido investigadas. Persson *et al.* (2003), demonstraram que na presença de cigarro, os níveis de α -antitripsina (α -1-AT), α -2-macroglobulin (α -2-MG) e metaloproteinase (MMP)-8 permaneceram inalterados após terapia cirúrgica. Entretanto, na ausência de cigarro, α -1-

AT e α -2-MG aumentaram e MMP-8 diminuiu. Estes resultados foram interpretados como um possível mecanismo de interferência do cigarro na resposta ao tratamento, e pôde em parte, explicar a evidência clínica do pior resultado obtido entre os pacientes fumantes. Além disso, o impacto do cigarro na resposta microbiológica após terapia periodontal mecânica foi investigada sem resultados conclusivos (Preber *et al.*, 1995; Grossi *et al.*, 1997). Numa tentativa de superar os resultados desfavoráveis relatados em fumantes, um novo protocolo antimicrobiano para pacientes fumantes que necessitavam de regeneração tecidual guiada (RTG) foi criado (Machtei *et al.*, 2003). Foi demonstrado que enquanto o cigarro retardava a maturação e mineralização tecidual, o protocolo resultou numa resposta mais favorável, sugerindo que uma terapia antimicrobiana deve ser incorporada para estes pacientes visando um melhor resultado na regeneração dos tecidos envolvidos.

Embora o presente estudo não tenha demonstrado uma influência significativa da nicotina na regeneração periodontal, pelo menos parte do efeito do consumo de cigarros nesse processo, tem sido atribuída a ela, por ser o maior constituinte da fase particulada da fumaça de cigarro, sendo sua substância mais citotóxica e vasoativa. Estudos demonstram que a nicotina pode inibir a revascularização (Daftari *et al.*, 1994), ter um impacto negativo no reparo ósseo (Hollinger *et al.*, 1999), e alterar a expressão de várias citocinas, dentre elas as associadas a neovascularização e diferenciação osteoblástica (Theiss *et al.*, 2000). Quando o processo de cura esgota o suprimento local de células e moléculas de sinalização, a renovação deste contingente é essencial para a vascularização e atividade de células ativadas endogenamente durante a fase inicial do reparo ósseo. Sendo assim, o suprimento sanguíneo tem papel essencial durante todo o processo. O efeito vasoconstritor que a nicotina exerce sobre a microcirculação pode inibir a resposta angioblástica durante a revascularização da região e limitar a presença de fatores importantes como as citocinas. A nicotina também parece influenciar a proliferação de fibroblastos gengivais e aumentar a atividade de colagenases (Peacock *et al.*, 1993), além de diminuir a síntese de fibronectina e colágeno tipo I por células do ligamento periodontal (Tipton & Dabbous, 1995).

Embora pareça haver evidências que indiquem que a nicotina exerce um efeito negativo sobre o reparo de tecidos em geral, o presente e outros estudos realizados nesta instituição que vem tentando documentar, em nível histológico, a influência do consumo de cigarros e/ou de seus componentes no reparo dos tecidos periodontais apresentam resultados diferentes. Num estudo prévio

Stefani *et al.* (2002) estudaram a influência da administração da nicotina no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de coelhos. Foi observada uma tendência numérica a uma menor porcentagem de tecido ósseo em contato direto com a superfície dos implantes, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, em um outro estudo, Nociti *et al.* (2002c) avaliaram o efeito da nicotina na densidade óssea ao redor de implantes inseridos em tíbias de coelhos. Foi concluído nesse estudo que a administração diária de nicotina não influenciava a densidade óssea ao redor de implantes de titânio. Recentemente, Pimentel *et al.* concluíram que a nicotina também não foi capaz de influenciar negativamente o tratamento de deiscências criadas em cães e tratadas com proteínas derivadas da matriz do esmalte e regeneração tecidual guiada. Portanto, dentro dos limites destes estudos prévios, foi concluído que a nicotina, por si só, não seria capaz de influenciar no reparo dos tecidos periodontais e, com isso, sugeriu-se a hipótese de que esses efeitos somente aconteceriam com a fumaça como um todo.

Sabe-se que outros componentes voláteis da fumaça de cigarro como a acroleína e o acetaldeído, tem efeito negativo em cultura de fibroblastos (Cattaneo *et al.*, 2000; Poggi *et al.*, 2002). Além disso, outro componente da fumaça, o monóxido de carbono, tem uma grande afinidade pela hemoglobina. Sua ligação é 200 vezes maior do que a do oxigênio, conseqüentemente, diminui a capacidade desta célula de oxigenar os tecidos (Silverstein, 1992). César-Neto *et al.* mostraram que o efeito negativo da fumaça de cigarros no reparo ao redor de implantes, pode estar relacionado a mais de uma molécula presente na fumaça e que a nicotina contribui apenas parcialmente com estes resultados. Em vista disso, futuros trabalhos são necessários para se determinar o real papel da nicotina e dos outros componentes da fumaça de cigarro, sobre o reparo periodontal *in vivo*, já que trabalhos *in vitro* têm demonstrado que, dependendo da concentração atingida por essa droga, ela pode ter efeitos deletérios ou estimulantes (Ramp *et al.*, 1991; Yuhara *et al.*, 1999). Se a hipótese de que a nicotina não exerce efeitos adversos *in vivo* for confirmada, esta observação pode ser de grande interesse clínico.

Uma grande preocupação na literatura tem sido o modo de se classificar indivíduos fumantes, podendo ser considerado um fator de confundimento em estudos epidemiológicos. Relatos imprecisos podem ocorrer devido ao metabolismo individual, freqüência e quantidade de inalação de fumaça, capacidade de diluição do ar no ambiente, e até a marca do cigarro (Benowitz *et al.*, 1999). A validação bioquímica do consumo de cigarros parece ser útil na minimização da influência de fatores

de confundimento em estudos clínicos, principalmente para se determinar se o fumante é leve, moderado ou severo. Em estudos com animais, estes fatores podem ser mais controlados, e já foi relatado previamente (César-Neto *et al.*, 2003) que o regime de exposição à fumaça de cigarro utilizado neste estudo, promove níveis séricos de cotinina similares ao consumo de 10 a 20 cigarros/dia (Gonzalez *et al.*, 1996). Entretanto, comparações com humanos devem ser feitas com cautela, pelas diferenças no metabolismo de nicotina entre humanos e ratos, e da frequência da inalação de fumaça realizada neste estudo.

O modelo do defeito do tipo fenestração em ratos, criado pelo grupo de King e posteriormente modificado (Jin *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004), tem se mostrado eficaz no estudo da regeneração periodontal em sítios não contaminados. Embora este modelo não possua o tamanho crítico para regeneração periodontal, ele serve adequadamente para se examinar a dinâmica dos processos de cura. Um achado interessante deste estudo e dos outros com este modelo, é o de que mesmo na ausência de contaminação, a presença da formação de novo cemento não foi observada em nenhum caso. Neste modelo, a regeneração de cemento só foi observada com a utilização de alguma técnica regenerativa (King *et al.*, 1997; King & Hughes, 2001; Zhao *et al.*, 2004). Esta observação nos leva a verificar que o cemento tem uma capacidade muito limitada de regeneração espontânea, mesmo na ausência de exposição prévia ao biofilme dental. Portanto, outros estudos são necessários para avaliar o potencial real do cemento em regenerar, e quais fatores estão envolvidos neste processo.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, os dados sugerem que a inalação da fumaça de cigarros pode influenciar a regeneração periodontal espontânea em sítios sem contaminação prévia por biofilme dental, e que este efeito pode ser relevante numa resposta periodontal desfavorável relatada em pacientes fumantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. **J Clin Periodontol**. 1994 Feb;21(2):91-7.

Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP *et al*. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. **J Periodontol**. 2004 Jul;75(7):939-48.

Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Fong I, Modin G, Herrera B, Jacob P 3rd. Ethnic differences in N-glucuronidation of nicotine and cotinine. **J Pharmacol Exp Ther** 1999; 291:1196-1203.

Broulik PD, Jarab J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. **Horm Metab Res**. 1993 Apr;25(4):219-21.

Cattaneo V, Cetta G, Rota C, Vezzoni F, Rota MT, Gallanti A *et al*. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol**. 2000 Mar;71(3):425-32.

Cendon-filha SP. **Enfisema Pulmonar: Modelo experimental em ratos expostos a fumaça do cigarro**. [tese]. São Paulo: UNIFESP/Escola Paulista de Medicina; 1993.

Cesar-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 Oct;74(10):1454-9.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. **J Periodontal Res**. 2002 Aug;37(4):279-85.

Cotran RS, Kumar V, Collins. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins, editores. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.p.80-100.

Daftari TK, Whitesides TE Jr, Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. **Spine**. 1994 Apr 15;19(8):904-11.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J Periodontol**. 1996 Oct;67(10 Suppl):1041-9.

Gennaro AR. **Remington farmacia**. 19 ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamerican; 1998. p.3020.

Glossary of periodontal terms. 3rd edition. Chicago: **The American Academy of Periodontology**; 1992.

Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. **J Dent Res**. 1996 Feb;75(2):796-802.

Grossi SG, Zambon J, Machtei EE, Schifferle R, Andreana S, Genco RJ *et al*. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. **J Am Dent Assoc**. 1997 May;128(5):599-607.

Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. **J Periodontol**. 1991 Feb;62(2):147-52.

Haverstock BD & Mandracchia VJ. Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. **J Foot Ankle Surg**. 1998 Jan-Feb;37(1):69-74; discussion 78

Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. **J Biomed Mater Res**. 1999 Jun 15;45(4):294-301. Erratum in: **J Biomed Mat Res** 1999 Sep 5;46(3):438-9.

James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. **J Periodontol**. 1999 May;70(5):518-25.

Jin L, Wong KY, Leung WK, Corbet EF. Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. **J Clin Dent**. 2000;11(2):35-41.

Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. **J Periodontol**. 2003 Feb;74(2):202-13.

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 Mar;50(3):237-9; discussion 239-40.

Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. **J Periodontol**. 1996 Jul;67(7):675-81.

King GN, Hughes FJ. Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing. **J Clin Periodontol**. 2001 May;28(5):465-75.

King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. **J Dent Res**. 1997 Aug;76(8):1460-70.

Klaassen CD. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. Poluentes atmosféricos, solventes e vapores e pesticidas. *In*: Goodman, L.S, editor. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana; 1996. p. 1240-1257.

Kornman KS, Robertson PB. Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. **Periodontol** 2000. 2000 Feb;22:22-43.

Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. **Environ Res**. 1981 Feb;24(1):207-17.

Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H *et al*. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. **J Lab Clin Med**. 2001 Mar;137(3):208-19.

Machtei EE, Dunford R, Hausmann E, Grossi SG, Powell J, Cummins D *et al*. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. **J Clin Periodontol**. 1997 Feb;24(2):102-9.

Machtei EE, Oettinger-Barak O, Peled M. Guided tissue regeneration in smokers: effect of aggressive anti-infective therapy in Class II furcation defects. **J Periodontol**. 2003 May;74(5):579-84.

Martins AG, Andia DC, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Junior FH. Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. **J Periodontol**. 2004 Apr;75(4):586-91.

McCulloch CA, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. **J Periodontal Res**. 1983 Jul;18(4):339-52.

McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, Garnick JJ, Sutherland DE, Scheidt MJ *et al*. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. **J Periodontol**. 1989 Apr;60(4):176-81.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**. 1976 May;47(5):256-60.

Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. **Hand**. 1977 Jun;9(2):97-101.

Nociti FH Jr, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **J Periodontol**. 2002a Sep;73(9):982-7.

Nociti FH Jr, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2002b May-Jun;17(3):347-52.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. **J Periodontol.** 2000 Sep;71(9):1460-4.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA *et al.* Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. **J Periodontol Res.** 2001 Dec;36(6):361-6.

Nociti FH Jr, Stefani CM, Sallum EA, Duarte PM, Sallum AW. Nicotine and bone density around titanium implants: a histometric study in rabbits. **Implant Dent.** 2002c;11(2):176-82.

Papantonopoulos GH. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. **J Periodontol.** 1999 Oct;70(10):1166-73.

Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL *et al.* The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol.** 1993 Jul;64(7):658-65.

Persson L, Bergstrom J, Gustafsson A. Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. **J Periodontol.** 2003 Oct;74(10):1475-82.

Pimentel SP. **Avaliação da influência da nicotina na utilização da proteína derivada da matriz do esmalte e regeneração tecidual guiada em defeitos ósseos do tipo deiscência. Histometria em cães.** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2004.

Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. **J Periodontol Res.** 1994 Mar;29(2):81-94.

Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. **J Periodontol Res.** 2002 Jun;37(3):230-5.

Preber H, Linder L, Bergstrom J. Periodontal healing and periopathogenic microflora in smokers and non-smokers. **J Clin Periodontol.** 1995 Dec;22(12):946-52.

Ramos WPB, Ramos AO. Abuso de drogas. *In:* SILVA, P. **Farmacologia.** 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.161.

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 May;197(1):36-43.

Raulin LA, McPherson JC 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. **J Periodontol.** 1988 May;59(5):318-25.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Alcalóides de pirina-piridina. In: Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE, editores. **Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier; 1997. p.166-168.

Rosen PS, Marks MH, Reynolds MA. Influence of smoking on long-term clinical results of intrabony defects treated with regenerative therapy. **J Periodontol**. 1996 Nov;67(11):1159-63.

Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum EA, Barbieri D, Moreno HJ *et al*. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. **J Periodontol**. 2004 Apr;75(4):565-71.

Scabbia A, Cho KS, Sigurdsson TJ, Kim CK, Trombelli L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. **J Periodontol**. 2001 Jan;72(1):43-9.

Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. **J Foot Surg**. 1990 Jan-Feb;29(1):84-7.

Silverstein P. Smoking and wound healing. **Am J Med**. 1992 Jul 15;93(1A):22S-24S

Stavropoulos A, Mardas N, Herrero F, Karring T. Smoking affects the outcome of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analysis of intrabony defects. **J Clin Periodontol**. 2004 Nov;31(11):945-50.

Stefani CM, Nogueira F, Sallum EA, de Toledo S, Sallum AW, Nociti FH Jr. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. **J Periodontol**. 2002 Feb;73(2):206-12.

Tanur E, McQuade MJ, McPherson JC, Al-Hashimi IH, Rivera-Hidalgo F. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. **J Periodontol**. 2000 May;71(5):717-22.

Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. **Spine**. 2000 Oct 15;25(20):2588-94.

Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol**. 1995 Dec;66(12):1056-64.

Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. **J Clin Periodontol**. 1995 Mar;22(3):229-34.

Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. **Ann Periodontol**. 1998 Jul;3(1):88-101.

Trombelli L, Scabbia A. Healing response of gingival recession defects following guided tissue regeneration procedures in smokers and non-smokers. **J Clin Periodontol**. 1997 Aug;24(8):529-33.

Trombelli L, Cho KS, Kim CK, Scapoli C, Scabbia A. Impaired healing response of periodontal furcation defects following flap debridement surgery in smokers. A controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**. 2003 Jan;30(1):81-7.

Ueng SW, Lee MY, Li AF, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. **J Trauma**. 1997 Feb;42(2):231-8.

Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. **Am J Pathol**. 1995 Oct;147(4):873-83. Review.

WHO (World Health Organization) *Tobacco Free Initiative*. [on line] URL: <http://tobacco.who.int/index.cfm> . [2002 Jan 21]

Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. **Periodontol 2000**. 1999 Feb;19:21-39.

Williams RC, Paquette DW, Offenbacher S, Adams DF, Armitage GC, Bray K. Treatment of periodontitis by local administration of minocycline microspheres: a controlled trial. **J Periodontol**. 2001 Nov;72(11):1535-44.

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 Nov 3;383(3):387-93.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH Jr, Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. **J Periodontol**. 2004 Jan;75(1):154-61.

ANEXOS

Dados das medidas histométricas dos defeitos iniciais (mm)

	controle	nicotina	fumaça
1	4,0875	4,08375	3,966667
2	4,218333	4,175	3,821667
3	4,095714	3,991429	3,991667
4	4,308333	4,088333	3,931667
5	4,291429	3,971429	4,028571
6	4,135	4,2575	4,176
7	4,216	3,961429	4,388333
8	4,2	4,278	4,28
9	3,56625	4,14	3,741667
10	4,328	3,998333	4,225
11	4,098	4,053333	3,926667
12	4,514	4,33	4,275
13	4,371667	3,97	4,4
MÉDIA	4,18694	4,099887	4,088685
D.P.	0,224113	0,127132	0,215013

Dados das medidas histométricas da extensão do defeito remanescente (mm)

	controle	nicotina	fumaça
1	0	0	0,873333
2	0	0,241667	0,871667
3	0	0	0
4	0	0,3	0,11
5	0	0	0
6	0,125	0	0
7	0,322	0,02	0,223333
8	0	0,068	0
9	0	0	0,11
10	0	0,268333	0,19
11	0	0	0
12	0	0,135	0,281667
13	0	0	0
MÉDIA	0,034385	0,079462	0,204615
D.P.	0,093068	0,116035	0,31195

Dados das medidas histométricas do preenchimento do defeito (%)

	controle	nicotina	fumaça
1	98,23928	87,36292	80,35664
2	92,7694	90,32348	79,90076
3	94,84504	89,7262	99,01243
4	91,80301	100	85,67029
5	100	83,76527	100
6	92,97783	91,99112	87,83899
7	97,29762	93,08272	78,68707
8	99,89362	96,2263	87,40426
9	83,28753	90,46504	76,10357
10	98,44465	87,28074	91,01351
11	100	90,41184	77,2681
12	98,0097	83,52279	85,10602
13	100	93,9406	81,08461
MÉDIA	95,97	90,62	85,34
D.P.	4,64	4,64	7,7

Dados das medidas histométricas da densidade do novo osso (%)

	controle	nicotina	fumaça
1	85,65	74,57	76,06
2	76,84	70,53	73,74
3	80,27	84,48	80,71
4	85,41	78,52	70,23
5	82,45	80,17	70,84
6	78,5	76,28	64,38
7	77,7	84,75	68,4
8	78,15	81,95	71,06
9	85,24	69,26	81,83
10	78,6	74,59	69,16
11	75,9	71,87	84,42
12	78,94	75,49	68,38
13	77,27	70,44	66,41
MÉDIA	80,07	76,37	72,74
D.P.	3,45	5,27	6,24



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 541-1 sobre "Avaliação comparativa da influência da fumaça de cigarro e nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea em defeitos do tipo fenestração: estudo em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de Maio 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 541-1, entitled "Comparative evaluation of the influence of passive smoking and nicotine injection on periodontal healing of fenestration defects: a study in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 09, 2003.

Campinas, 09 de Maio de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEA/IB/UNICAMP