

ANA PAULA OLIVEIRA GIORGETTI BOSSOLAN

CIRURGIÃ-DENTISTA

**INFLUÊNCIA DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DE
CIGARRO SOBRE O PROCESSO DE REPARO
ÓSSEO ALVEOLAR. ESTUDO HISTOMÉTRICO E
DE REGULAÇÃO GÊNICA EM RATOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. João Batista César-Neto

Piracicaba

2009

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

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

B655i

Bossolan, Ana Paula Oliveira Giorgetti.

Influência da inalação da fumaça de cigarro sobre o processo de reparo ósseo alveolar. Estudo histométrico e de regulação gênica em ratos. / Ana Paula Oliveira Giorgetti Bossolan. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Francisco Humberto Nociti Junior, João Batista César Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Expressão gênica. 2. Reabsorção óssea. 3. Alvéolo dental. 4. Tabaco. 5. Osteogênese. I. Nociti Junior, Francisco Humberto. II. César Neto, João Batista. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Experimental study and genetic expression on wound healing of alveolar bone sockets after cigarette smoke inhalation in rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Gene expression. 2. Bone resorption. 3. Tooth socket. 4. Tobacco. 5. Osteogenesis

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Francisco Humberto Nociti Junior, Márcio Zaffalon Casatti, Giuseppe Alexandre Romito

Data da Defesa: 17-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNICAMP

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 17 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata ANA PAULA OLIVEIRA GIORGETTI BOSSOLAN aprovada.

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior.

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

A smaller, more compact handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati.

PROF. DR. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

A handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito.

PROF. DR. GIUSEPPE ALEXANDRE ROMITO

“Ainda na juventude, tornei-me ciente de que um vasto abismo separa os autores de seu público, embora, felizmente para ambos os lados, nenhum deles se dê conta disso. Logo percebi também quão inúteis são todos os prefácios, pois, quanto mais tentamos explicar os nossos propósitos, mais confusão criamos. Além disso, um autor pode escrever um prefácio tão longo quanto desejar, que o público continuará a dirigir-lhe as mesmas cobranças que ele havia procurado afastar.”

Goethe (1830)

“Na ciência as convicções não têm direito de cidadania, é o que se diz com boas razões: apenas quando elas decidem rebaixar-se à modéstia de uma hipótese, de um ponto de vista experimental e provisório, de uma ficção reguladora, pode lhes ser concedida a entrada e até mesmo um certo valor no reino do conhecimento – embora ainda com a restrição de que permaneçam sob vigilância policial, a vigilância da suspeita.”

Nietzsche (1882)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto e Sueli

Seus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Seus corações sabem compreender quando preciso de amigos. Seus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. O amor de pai e mãe me dirigiu pela vida e me deu as asas que eu precisava para voar. Meu respeito, amor e gratidão!

Ao meu irmão, Beto

Obrigada por não medir esforços para me ajudar e por me admirar. Isso me faz ter mais responsabilidade por servir como exemplo e me faz cada dia tentar ser uma pessoa melhor e mais humilde.

Ao meu marido, Renato

E desde então, sou porque tu és
E desde então és
sou e somos...
E por amor
Serei... Serás... Seremos...

(Pablo Neruda)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof Dr. José Tadeu Jorge, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela estrutura oferecida para a realização dos meus objetivos profissionais e aos seus funcionários que, com dedicação e profissionalismo, trabalham para manter tudo em ordem.

À CAPES, pelo auxílio financeiro indispensável durante meu curso de Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr., o Chico, por ter acreditado em mim, não através de notas ou currículo, mas por meio da minha palavra e do meu trabalho e interesse. Sua determinação e competência são admiráveis.

Ao Professor Antônio Wilson Sallum, pelas palavras de incentivo e maturidade e por acreditar no potencial de seus alunos.

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, por me mostrar, através de sua experiência e seminários, que não existe ciência sem a parte clínica.

Ao Professor Enílson Antonio Sallum, por estar sempre incentivando nossa busca pelo conhecimento.

Aos meus familiares, por todo o carinho que têm por mim.

À minha amiga Fabíola, por ter aberto o caminho da FOP, pelo exemplo e incentivo.

À minha amiga Daia, por toda ajuda e por ser um exemplo a ser seguido. As ótimas conversas e convivência só me fazem admirá-la cada dia mais.

Ao João, por me emprestar suas idéias e não se importar de eu falar que são minhas. Eu já o admirava antes de conhecê-lo pelo que outras pessoas falavam, mas hoje que o conheço melhor, admiro muito mais. Obrigada por toda a ajuda.

Ao Bruno B., por ter me recepcionado muito bem na FOP e por me apresentar aos outros colegas. A convivência foi bem melhor assim.

À Karina, por ter dispensado um tempo enorme para me ensinar as técnicas de laboratório e me ajudar a executá-las. Você é um exemplo de competência e discrição. Obrigada pelo incentivo e conselhos.

À minha companheira e amiga Tati, por confiar em mim desde o início do meu estágio e por abrir seu coração para que eu pudesse ser mais uma amiga. Sem você, as minhas viagens seriam bem mais penosas. Uma amiga para todas as horas e que admiro muito.

Às minhas amigas do Mestrado, Mirela, Mônica, Tati e Fer V. Aprendi a admirá-las a cada dia. Obrigada por tornarem meus dias melhores e mais engraçados.

Aos amigos do Doutorado, Thaisângela, Fabrícia, Liana, Bia, Wagner, Renato, Fernanda, Ezymar, Mauro e Daniela. Sucesso a todos.

À Lia e à Regina, secretárias da Periodontia, muito prestativas. Meu eterno agradecimento.

À Mari, técnica do laboratório de Periodontia, por tornar os dias menos penosos com ótimas conversas e por me ajudar no laboratório.

Aos bioteristas Wanderley e Fábio, pelo cuidado prestado aos meus animais.

À Banca de Qualificação, Prof. Dr. Márcio de Moraes, Prof^a. Dr^a. Daiane Cristina Peruzzo e Prof. Dr. Marcelo Marques.

A todos que indiretamente tiveram grande importância para a realização de mais essa etapa da minha formação.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da inalação da fumaça de cigarros sobre o processo de reparo ósseo alveolar em ratos. Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos aleatoriamente divididos em: Grupo CONTROLE – 20 animais que não foram expostos à fumaça de cigarros (FC) e Grupo TESTE – 20 animais que foram expostos à FC. Todos os animais tiveram seus 1^{os} e 2^{os} molares (M) inferiores extraídos, sendo que as exposições à FC iniciaram-se 3 dias antes das extrações mantendo-se até o sacrifício (3, 7, 10 e 14 dias). Após cada sacrifício, os alvéolos dentais dos 1^{os}M foram curetados e o tecido obtido armazenado. Os alvéolos dos 2^{os}M foram processados para avaliação histométrica. A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real quantificou a expressão dos genes: fosfatase alcalina (ALP), proteína óssea morfogenética (BMP)-2, BMP-3 e BMP-7, ligante ativador do receptor do fator κ B (RANKL), osteoprotegerina (OPG) e v-ATPase V0 subunidade d2 (Atp6v0d2). Histometricamente, a inalação da fumaça de cigarros influenciou negativamente o preenchimento ósseo apenas no 7^o dia mostrando diferença estatisticamente significativa para os parâmetros tecido medular e defeito remanescente ($p < 0,05$). Em relação à expressão gênica, a análise dos dados demonstrou que no grupo controle houve diminuição nos níveis de RNA_m ao longo do tempo de Atp6v0d2, BMP-3 e na razão entre RANKL/OPG. Os níveis de RNA_m para ALP, BMP-2 e BMP-7 mostraram-se aumentados. Já no grupo teste, esses padrões de expressão gênica se invertem, pois houve aumento nos níveis de RNA_m de Atp6v0d2 e na razão entre RANKL/OPG. Desta forma, conclui-se que a inalação da fumaça de cigarros pode modular o padrão de reparo ósseo alveolar observado histometricamente, provavelmente devido ao efeito observado sobre a expressão de genes envolvidos nesse processo.

Palavras-chave: inalação da fumaça de cigarro, reparo ósseo alveolar, histometria, regulação gênica e expressão gênica.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of cigarette smoke inhalation on wound healing of molar extraction socket. A total of 40 male Wistar rats were randomly assigned to one of the following groups: Control Group – 20 animals not exposed to cigarette smoke inhalation (CSI) and Test Group - 20 animals exposed to CSI for 3 days before the surgery until sacrifice (3, 7, 10, 14 days). After sacrifice, the mandible was removed and the specimens processed either for histometric analysis (2nd molar sockets) or for gene expression analysis (1st molar sockets) by Real Time polymerase chain reaction (PCR). The expression of alkaline phosphatase (ALP), bone morphogenetic protein (BMP) - 2, BMP-3 and BMP-7, receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) and v-ATPase V₀ subunit d2 (Atp6v0d2) was assessed. Histometrically, data analysis showed that CSI negatively affected bone formation on the 7th day showing a lower amount of non-mineralized tissue and higher wound area ($p < 0.05$). As for gene expression, data analysis demonstrated a trend of lower mRNA levels over time for Atp6v0d2, BMP-3 and RANKL/OPG ratio in the control group. Whereas, ALP, BMP-2 and BMP-7 mRNA levels were increased. Data analysis additionally demonstrated that this pattern was modified by CSI. Cigarette smoke exposure resulted in an increase in Atp6v0d2 mRNA levels and in RANKL/OPG ratio.

Within the limits of the present study, it can be concluded that cigarette smoke inhalation may affect the post-extraction socket healing pattern, probably due to the observed effect on the expression of bone remodeling-associated genes in the sites of tooth extraction.

Key-words: cigarette smoking inhalation, socket wound healing, histometry and genetic expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Efeito do consumo de cigarros sobre a saúde geral	4
2.2	Efeito do consumo de cigarros em fumantes passivos	4
2.3	Características da fumaça de cigarros	5
2.4	Reparo ósseo alveolar após exodontia: aspectos celulares e moleculares	8
2.5	Importância das moléculas avaliadas sobre o reparo e a fisiologia óssea	10
2.6	Influência da nicotina sobre a expressão gênica	15
2.7	Influência da fumaça de cigarros e seus componentes em estudos <i>in vitro</i>	15
2.8	Influência da fumaça de cigarros e seus componentes em estudos <i>in vivo</i>	18
3	OBJETIVO	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Características da amostra	23
4.2	Delineamento Experimental	23
4.2.1	Exposição à fumaça	23
4.3	Procedimento Cirúrgico	25
4.4	Sacrifício dos Animais e Extração do RNA	25
4.5	Avaliação dos níveis de RNA _m por meio de PCR em tempo real	27
4.5.1	Síntese de cDNA	27
4.5.2	Desenho dos “Primers”	27
4.5.3	Reações de PCR em Tempo Real	28

4.6	Processamento Histológico	28
4.7	Calibração do examinador	29
4.8	Análise Estatística	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Resultados Histométricos	30
5.2	Resultados de Expressão Gênica	35
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

Uma estimativa da Organização Mundial da Saúde afirma que há cerca de 1,3 bilhões de fumantes no mundo e que esta população está aumentando, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008). Informações como estas têm atraído a atenção para o estudo das conseqüências do consumo de cigarros sobre os eventos biológicos.

Dentre os inúmeros trabalhos que demonstram os efeitos deletérios do consumo de cigarros sobre o organismo, diversos estudos têm observado que o consumo de cigarros pode exercer um efeito importante sobre o metabolismo do tecido ósseo. Diminuição da densidade óssea mineral (Hollenbach *et al.*, 1993; Ortego-Centeno *et al.*, 1997; Ward & Klesges, 2001), aumento na incidência de osteoporose, osteopenia (Hollenbach *et al.*, 1993; Ward & Klesges, 2001) e maior risco à fraturas (Kanis *et al.*, 2004) têm sido observado em fumantes. Em odontologia, o tabagismo tem sido relacionado a dificuldades na reparação de enxertos ósseos (Jones & Triplett, 1992; Kan *et al.*, 1999), inadequado preenchimento sangüíneo dos alvéolos dentários pós-extração (Meechan *et al.*, 1988), menor taxa de sucesso de implantes de titânio (Bain & Moy, 1993; De Bruyn & Collaert, 1994) e maior perda óssea ao redor de implantes já osseointegrados (Haas *et al.*, 1996; Lindquist *et al.*, 1996).

Outros estudos (Nociti *et al.*, 2002 a e b; César-Neto *et al.*, 2003; César-Neto *et al.*, 2005 a e b; César-Neto *et al.*, 2005 c e d; César-Neto *et al.*, 2006) documentaram, em ratos, o efeito da inalação da fumaça de cigarros e seus componentes sobre a taxa de progressão da doença periodontal experimental e o processo de osseointegração. Observou-se, histologicamente, que a fumaça de cigarros interfere negativamente no reparo e na densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos (Nociti *et al.*, 2002 a e b) e que a nicotina é responsável por parte deste efeito (César-Neto

et al., 2003). Estudos radiográficos (César-Neto *et al.*, 2005 a e b) e histológico (César-Neto *et al.*, 2006) mostraram que além de influenciar negativamente o reparo ósseo, a fumaça de cigarro também promove uma diminuição na densidade do tecido ósseo que não sofreu nem um tipo de lesão e está em função normal, e que esse efeito é revertido com a interrupção da exposição à fumaça. A reversibilidade dos efeitos da fumaça de cigarro foi também observada no tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em tíbias de ratos (César-Neto *et al.*, 2005 c e d).

Embora inúmeros estudos tenham sido realizados (Theiss *et al.* 2000; Liu *et al.*, 2001; Henemyre *et al.* 2003), os mecanismos pelos quais o tabagismo interfere no metabolismo ósseo não estão totalmente elucidados. Estudos *in vitro* demonstraram que os componentes da fumaça de cigarro têm efeitos sobre as células responsáveis pelo metabolismo e remodelação óssea. Henemyre *et al.* (2003) observaram que, em níveis clinicamente relevantes, a nicotina parece estimular a diferenciação osteoclástica e a reabsorção de fosfato de cálcio, componente importante do tecido ósseo. A influência da fumaça de cigarros (FC) sobre células osteoprogenitoras humanas e células tipo-osteoblasto também tem sido avaliadas. A FC inibiu a proliferação das células osteoprogenitoras e sua diferenciação em células tipo osteoblasto (Liu *et al.*, 2001). Estudos *in vivo* parecem confirmar os efeitos observados *in vitro*. Theiss *et al.* (2000) avaliaram a influência da nicotina sobre a expressão de alguns genes durante o reparo ósseo após um procedimento cirúrgico para fusão espinhal. Os resultados deste trabalho mostraram que os coelhos que receberam nicotina apresentaram uma menor expressão de colágeno tipo 1 e 2, BMP-2, BMP-4, BMP-6, bFGF e VEGF, genes relacionados com a neoformação óssea.

Entretanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão destes fenômenos, uma vez que outros genes podem estar envolvidos neste processo e outras substâncias presentes na fumaça do cigarro, além da nicotina, podem interferir em sua

ação como um todo. Além disso, o número de evidências investigando os mecanismos pelos quais o tabagismo interfere sobre o reparo ósseo é limitado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeito do consumo de cigarros sobre a saúde geral

Sabe-se que o hábito de fumar está intimamente relacionado com um maior risco de doenças obstrutivas pulmonares crônicas, doenças vasculares periféricas, enfisema pulmonar, osteoporose e diabetes (WHO 2008).

A Organização Mundial da Saúde afirma que há cerca de 1,3 bilhões de fumantes no mundo e que esta população está aumentando, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008). Informações como estas têm atraído a atenção dos pesquisadores para o estudo das conseqüências do consumo de cigarros sobre eventos biológicos.

Numa pesquisa feita na Índia, 2/3 de todos os pacientes com câncer de pulmão eram fumantes (WHO, 2008). Num outro estudo, o risco de mortes por câncer de pulmão foi de duas a quatro vezes maior entre pacientes homens fumantes comparado com pacientes homens não-fumantes e esses dados foram consistentes tanto nas áreas rurais quanto nas áreas urbanas da China (WHO, 2008). Além disso, fumantes têm risco 27 vezes maior de apresentar câncer bucal que não fumantes (WHO, 2008). Em relação ao tecido ósseo, uma das principais evidências sobre os efeitos negativos dos componentes do tabaco foi gerada através de uma meta-análise que considerou 29 estudos. Esta investigação concluiu que em cada oito fraturas de bacia uma é atribuída ao consumo de cigarros, uma vez que este diminui a densidade óssea mineral (Law *et al.*, 1997).

2.2 Efeito do consumo de cigarros em fumantes passivos

Há na atmosfera ambiental uma dispersão dos poluentes do tabaco de tal forma que os não-fumantes acabam inalando a mesma quantidade de nicotina e de monóxido de carbono que os não-fumantes e apresentam as mesmas taxas de nicotina e de

carboxihemoglobina no sangue (OMS, 2006). Após uma manhã em recintos onde se fuma, os fumantes passivos podem ter concentrações de nicotina no sangue equivalentes aos fumantes de três a cinco cigarros (OMS, 2006).

Lesões do endotélio das coronárias e diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo são identificadas através da ecocardiografia Doppler em fumantes passivos (OMS, 2006). Essa diminuição da luz arterial, em consequência da ação da nicotina, também pode ser verificada pela ultra-sonografia da artéria do braço, comprovando-se a diminuição do fluxo sanguíneo (OMS, 2006).

Em resumo, a nicotina dispersa no ambiente, associada ao monóxido de carbono, reduz o fluxo sanguíneo, diminuindo o aporte de oxigênio ao coração, provoca aumento e agregação das plaquetas e lesa o endotélio, podendo criar ateromas nas paredes das artérias e com isso reunir elementos que aumentam o risco de infarto do coração (OMS, 2006).

Em 2002, um grupo de 29 cientistas de 12 países revisou as evidências publicadas e relacionadas com câncer e fumantes ativos e passivos. Confirmaram os riscos de câncer em fumantes ativos e também em fumantes passivos. É estimado que esse risco seja 20% maior em mulheres e 30 % maior em homens que moram com fumantes (WHO, 2008).

2.3 Características da fumaça de cigarros

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 & Mandrachia, 1998). A fase gasosa é composta principalmente por monóxido e dióxido de carbono, nitrogênio, oxigênio, cianeto de hidrogênio, acroleína, acetaldeído e formaldeído (Silverstein, 1992). Já a fase particulada contém nicotina, água, nitratos, nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como principais constituintes (Hanes *et al.*, 1991) e a fase sólida contém gotículas de alcatrão. O alcatrão e

a nicotina têm sido reduzidos devido às características físicas dos filtros, mas com pouca mudança, pois a dose que um indivíduo recebe depende muito da maneira como se fuma (Benowitz, 1989) e as variações dependem da frequência de inalação, profundidade da inalação, o tamanho da ponta de cigarro desprezada e a marca do cigarro (Benowitz, 1988).

Quando a fumaça é inalada e chega aos pulmões, muitos dos 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. Essas substâncias podem alterar as condições necessárias para a reparação tecidual (Silverstein, 1992). Mosely & Finseth em 1977 fizeram o primeiro relato dos efeitos deletérios do consumo de cigarros mostrando uma pior cicatrização de feridas na mão de um fumante com arterioesclerose. Desde então, 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 mais comuns da fumaça de cigarro relacionados com um pior processo de reparo (Silverstein, 1992; Haverstoch & Mandrachia, 1998) e outros componentes como a acroleína e o acetaldeído, têm mostrado *in vitro* um efeito prejudicial na proliferação e adesão de fibroblastos, células importantes para o processo de cicatrização (Cattaneo *et al.*, 2000).

A nicotina é a razão primária pela qual as pessoas consomem produtos do tabaco, pois possui alto poder viciante e seu uso crônico pode causar dependência psicológica e física (Robbers *et al.*, 1997). Quando consumida, produz estimulação primária transitória de todos os gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos, seguida de depressão persistente. Taquicardia, estado de alerta, diminuição dos reflexos profundos e tônus muscular esquelético estão entre seus efeitos (Gennaro, 1998), além de promover uma sensação de disposição durante as primeiras horas do dia e de relaxamento em situações

de estresse (Robbers *et al.*, 1997). Alguns desses efeitos podem prejudicar os processos de reparo, como a diminuição da proliferação de hemácias, macrófagos e fibroblastos (Sherwin & Gastwirth, 1990), a liberação de catecolaminas que diminuem a perfusão tecidual e a alteração no metabolismo dos fibroblastos (Trypton & Dabbous, 1995).

O Monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro, insípido e não-irritante que resulta da combustão incompleta da matéria orgânica. É o poluente mais encontrado na atmosfera e um grande número de mortes acontece anualmente devido a sua inalação (Klaassen, 1996). Sua toxicidade deve-se a alta afinidade pela hemoglobina e corresponde a 4% da fumaça de cigarro (Haverstoch & Mandrachia, 1998). O CO se liga à hemoglobina nos capilares pulmonares e forma um composto altamente estável. Dessa forma, a hemoglobina não transporta oxigênio (O₂), pois ambos os gases reagem com os mesmos grupamentos da molécula (Klaassen, 1996). Como a afinidade com o CO é cerca de 220 vezes maior que pelo O₂, o CO apresenta seus efeitos mesmo em baixas concentrações (Klaassen, 1996). Indivíduos não-fumantes 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. Além disso, a quantidade de O₂ disponível para os tecidos é ainda menor pela influência inibitória da carboxihemoglobina na dissociação de qualquer molécula de oxihemoglobina ainda disponível (Klaassen, 1996). Portanto, esse conjunto de fenômenos pode diminuir a quantidade de O₂ presente nos tecidos de reparação, gerando reflexos negativos nessas áreas (Sherwin & Gastwirth, 1990).

O cianeto de hidrogênio é uma substância altamente tóxica e pode ser usada como inseticida e até como gás letal em execuções. Quando absorvido, reage prontamente com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria, com a qual tem uma alta afinidade, e a respiração celular é inibida resultando em acidose láctica e hipóxia citotóxica (Klaassen, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular também podem prejudicar o processo de reparação dos tecidos (Mosely & Finseth, 1977).

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 frequência respiratória e aumento da resistência das vias aéreas superiores (Cattaneo *et al.*, 2000). O estudo de 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*.

2.4 Reparo ósseo alveolar após exodontia: aspectos celulares e moleculares

O reparo alveolar após exodontia se inicia com o preenchimento do alvéolo pelo coágulo e conseqüentemente a obliteração das extremidades dos vasos sangüíneos rompidos nas primeiras horas que sucedem a cirurgia. Há também restos celulares e alimentares aderidos à superfície do coágulo. Durante as primeiras 24 horas, há migração de leucócitos vindos dos vasos do ligamento periodontal remanescente que se organizam ao redor do coágulo constituído principalmente por uma rede de fibrina. Após 24 horas, inicia-se a proliferação de vasos sangüíneos oriundos do ligamento periodontal. Aproximadamente 3 dias depois, inicia-se a proliferação de fibroblastos que se infiltram no coágulo e formarão o tecido conjuntivo jovem e sem orientação definida. Por volta do 5º dia, o coágulo já sofreu maturação e a rede de fibrina foi substituída pelo tecido de granulação com evidente proliferação de fibroblastos e vasos sangüíneos neoformados. Ao final da 1ª semana, inicia-se a formação de osso no espaço alveolar propriamente dito e o ligamento periodontal perde a individualidade. Osteoblastos revestem trabéculas de osso jovem, imaturo e fibrilar, que se liga ao osso pré-existente e se prolifera a partir das paredes alveolares e do fundo do alvéolo. A presença de osteoclastos do ligamento periodontal é evidente na crista alveolar. Ao final dessa semana o epitélio recobre quase toda a ferida. No início da 2ª semana, os fibroblastos presentes no tecido de granulação produzem fibras colágenas e observam-se sinais evidentes de ossificação no fundo do

mesmo. Por volta do 10º dia, estas fibras passam a assumir orientação mais definida e aproximadamente no 13º dia, o alvéolo está praticamente preenchido por osso jovem e o epitélio está amadurecido. Também podem estar presentes fragmentos de osso necrótico, resultados de fraturas durante a extração. Cerca de 20 dias após, a camada cortical do osso alveolar sofre remodelação e as trabéculas ósseas estão em fase de amadurecimento. Passados 30 dias, o alvéolo está totalmente reparado, mas continua a ocorrer o processo de calcificação e reabsorção remodeladora do osso presente. Os remanescentes do ligamento periodontal são importantes para o início da proliferação do tecido de granulação e para o reparo alveolar (Smith 1974, Guglielmotti & Cabrini 1985, Hsieh *et al.* 1994, Devlin *et al.* 1996).

Amler *et al.* (1960), avaliaram o reparo após extração não complicada em humanos entre 2 e 50 dias e relataram a seguinte seqüência: formação do coágulo, substituição do mesmo por tecido de granulação por volta do 7º dia, que é substituído por tecido conjuntivo por volta do 12º dia. Segue-se o aparecimento do tecido osteóide na base do alvéolo por volta do 17º dia e preenchimento de dois terços do alvéolo por trabéculas ósseas por volta do 38º dia. A formação óssea iniciou-se no osso perialveolar e não no interior do alvéolo (Boyne 1966) sendo que neste a formação óssea iniciou-se junto aos restos do ligamento periodontal entre 9 e 10 dias após a remoção do dente.

Green *et al.* (1969), realizaram estudo do processo de reparo alveolar após extração dos terceiros molares superiores esquerdos, em ratos, utilizando o radioisótopo estrôncio-85 em períodos de 0 a 42 dias e concluíram que o período de maior formação óssea ocorreu entre o 10º e o 14º dia. A incorporação de radioisótopos continuou até o 35º e 42º dias após a extração, indicando que a maturação óssea continua mesmo após ter ocorrido a maturação histológica, que se completa por volta do 21º dia.

Smith (1974) avaliou comparativamente o reparo alveolar após extração dos primeiros molares inferiores de ratos por meio de radiografias e cortes histológicos. Assim como Bodner *et al.*, (1993 a e b) dividiu o processo de reparo em 3 fases: recente, quando

há organização completa do coágulo e epitelização sobre quase todo o alvéolo e que se estende do 1º ao 5º dia após a exodontia, formação óssea (5º ao 20º dia) e remodelação, quando há maturação do osso jovem e crista alveolar e que se estende do 20º ao 50º dia após a cirurgia. Devlin (2000) identificou a presença de numerosos osteoclastos em alvéolos de molares de ratos. Segundo a autor, estas células circundaram as paredes alveolares entre os dias 2 e 7 após as cirurgias e estariam relacionadas aos eventos de remodelação óssea. A sequência de cicatrização em ratos é similar a de outros animais e a do homem, sendo, porém, mais rápida (Pietrokovski & Massler, 1967; Green *et al.*, 1969; Bodner *et al.*, 1993b), como a neoformação óssea, que ocorre entre o 7º e 14º dia, na região subperiosteal (Green *et al.*, 1969).

Recentemente, Trombelli *et al.* (2008) monitoraram por 6 meses o reparo de alvéolos após extração em humanos em vários estágios do processo de remodelamento. Biópsias foram feitas representando as fases: Inicial (2-4 semanas), intermediária (6-8 semanas) e final (12-24 semanas). Observou-se que havia tecido de granulação presente em grande quantidade na fase inicial do reparo alveolar e também no intervalo entre a fase inicial e a intermediária. Já na fase intermediária, havia presença de matriz provisória e osso imaturo. A densidade de estruturas vasculares e macrófagos diminuiu vagarosamente ao longo do tempo entre 2 e 4 semanas e a presença de osteoblastos teve o seu pico entre 6 e 8 semanas, permanecendo praticamente estável após esse período. Pequeno número de osteoclastos estava presente em algumas amostras, mas em todos os períodos observacionais.

2.5 Importância das moléculas avaliadas sobre o reparo e a fisiologia óssea

O fumo é considerado um fator de risco previsível para afetar a severidade das doenças periodontais e outras doenças sistêmicas. A nicotina altera a expressão de genes relacionados com inflamação, resposta imunológica, ácido aracdônico, cascatas do complemento e reparo. Através dessas alterações, a maior ou menor secreção de

mediadores químicos da inflamação leva à insuficiência do sistema imune e cicatrizações prejudicadas em fumantes (Rivera-Hidalgo, 1990).

O metabolismo do tecido ósseo é dependente dos processos de reabsorção e formação óssea (Lerner, 2004). Nos adultos, o arcabouço ósseo está em constante remodelação e os dois processos andam juntos e estão em equilíbrio, resultando na preservação da massa óssea obtida durante o período de crescimento (Lerner, 2004). Em situações patológicas, a formação e a reabsorção óssea ficam desequilibradas, o que resulta na perda óssea ou ganho ósseo (Lerner, 2004).

Os osteoclastos se diferenciam a partir de células precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea, baço e sangue periférico. O desenvolvimento dos osteoclastos a partir de seus precursores, geralmente necessita da presença dos osteoblastos (Lerner, 2004), cuja função não é restrita à formação óssea, mas também à inicialização da reabsorção óssea, promovendo um estímulo essencial e suficiente que controla o comportamento dos osteoclastos, um evento que ocorre via interação célula-célula (Hughes *et al.*, 2006). Os determinantes moleculares dessa interação são dois fatores produzidos por células da linhagem osteoblástica, M-CSF e RANKL (Hughes *et al.*, 2006). RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e é produzido pela linhagem de células osteoblásticas, pelas células do ligamento periodontal e pelos linfócitos T (Simonet *et al.*, 1997). RANKL se liga a um receptor chamado RANK localizado na superfície dos osteoclastos e nos precursores de osteoclastos (Simonet *et al.*, 1997). A ligação entre RANKL e RANK induz a osteoclastogênese, ativa os osteoclastos maduros, controla a sua inserção no osso e promove a sua sobrevivência (Simonet *et al.*, 1997). A atividade de RANKL é controlada por um receptor chamado osteoprotegerina (OPG), que é expresso numa quantidade muito maior que RANKL (Esquema no anexo 1). OPG RNA_m tem sido detectado no osso, cartilagem, aorta, pele, pulmão, coração, rim, fígado, cérebro e em vários outros tecidos (Lerner, 2004). Num nível celular, OPG é expresso pelos osteoblastos, fibroblastos, células precursoras, endoteliais, dendríticas, linfóides e da

musculatura aórtica (Lerner, 2004). OPG se liga a RANKL e inibe a ligação entre RANK e RANKL e conseqüentemente, a osteoclastogênese é inibida (Teitelbaum, 2000).

Camundongos deficientes em OPG exibiram osteoporose severa com perda do osso trabecular e diminuição da resistência óssea (Mizuno *et al.*, 1998). Por outro lado, uma expressão maior de OPG em camundongos transgênicos resulta numa profunda osteopetrose e diminuição da diferenciação osteoclástica (Simonet *et al.*, 1997).

A característica mais notável dos osteoclastos polarizados (induzida pelo contato com o osso) é a sua membrana enrugada. Essa estrutura, que é a organela de reabsorção da célula, consiste num complexo bem particular de vilosidades da membrana plasmática que está justaposta ao osso e contém uma bomba de prótons vacuolares (H^+ ATPases) (Teitelbaum & Ross, 2003), cuja função é o transporte de prótons, o que torna o meio ácido e leva à dissolução da fase mineral do osso (Li *et al.*, 2006).

Examinando como os osteoclastos multinucleados se desenvolvem através da fusão de células precursoras, Lee *et al.* (2006), identificaram Atp6v0d2 como uma proteína chave para essa atividade, sendo também um componente da bomba de prótons da membrana enrugada dos osteoclastos. Os autores também mostram que Atp6v0d2, além de promover a fusão dos precursores e atividade osteoclástica, inesperadamente também inibe os osteoblastos, mostrando que não só os osteoblastos controlam a atividade dos osteoclastos como estes também controlam a atividade dos osteoblastos.

As Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs) são membros da superfamília do fator de crescimento transformador - β (TGF- β) e são moléculas de sinalização que têm uma variedade de funções durante o desenvolvimento e diferenciação celular (Hughes *et al.*, 2006). Foram descobertas pela sua forte habilidade de induzir formação cartilaginosa e óssea a partir de células mesenquimais não esqueléticas, pois recapitula a seqüência inteira de eventos que ocorrem durante a ossificação endocondral (Hughes *et al.*, 2006). Mais de 20 proteínas relacionadas às BMPs foram identificadas e há uma diversidade de

atividades biológicas quando cada BMP se liga a um determinado receptor. Entre a família das BMPs, BMP-2, BMP-4 e BMP-7 têm papéis-chave durante a diferenciação e comprometimento osteoblástico (Hughes *et al.*, 2006). BMP-2 consegue direcionar as células pluripotentes a se comprometerem com a diferenciação osteoblástica, como também conseguem BMP-4 e BMP-6 (Hughes *et al.*, 2006). Bmp-2 é expressa em áreas ao redor de condensações cartilaginosas iniciais, zonas periosteais e osteogênicas (Xiao *et al.*, 2007).

Estudos de expressão gênica mostram uma forte resposta osteogênica em fibroblastos da pele e gengivais de um adenovírus expressando BMP-7 (Franceschi *et al.*, 2000) e altos níveis de RNA_m de BMP-7 têm sido encontrados no pericôndrio (Xiao *et al.*, 2007). BMP-2 e BMP-7 têm importantes significados no desenvolvimento ósseo e de outros tecidos fora do osso. Em relação à formação óssea, BMP-2 e BMP-7 agem induzindo a expressão de críticos fatores de transcrição como Runx2 e Osterix nas células-tronco mesenquimais e assim comprometendo-as à diferenciação osteoblástica (Xiao *et al.*, 2007). Camundongos deficientes em BMP-7 exibem alterações esqueléticas nas costelas, membros e crânio e camundongos modificados geneticamente para ser deficiente em BMP-2 morrem entre os dias 7 e 10 de gestação por defeitos cardíacos, antes de qualquer formação óssea (Xiao *et al.*, 2007)..

Tsuji *et al.* (2006) quantificaram a atividade de BMP presentes em sítios com fratura através da análise dos RNA_m de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 aos 3 e 10 dias após a fratura, período em que a sinalização de BMP é crítica para o início do reparo e foram comparados com os níveis de BMP no osso intacto. Como esperado, nos camundongos do grupo controle (+/+) e do grupo heterozigótico (+/-), os níveis de BMP-2, -4 e -7 estavam elevados logo após a fratura e permaneceram elevados até 10 dias de reparo ósseo, o que indica que a cascata de reparo da fratura estava em progresso. Quando BMP-2 estava ausente (-/-), os níveis de BMP-4 e BMP-7 estavam presentes em níveis comparáveis em camundongos do grupo controle aos 3 dias, mas com diminuição significativa aos 10 dias.

Esse resultado mostra que BMP-2 é especificamente recrutada para a iniciação do reparo ósseo. Os autores sugerem, portanto, que BMP-2 é um componente necessário para a capacidade regenerativa inerente do osso e promove o primeiro sinal molecular para a iniciação do reparo esquelético endógeno.

No estudo de Daluiski *et al.* (2001), BMP-3 representa uma exceção às outras BMPs. Camundongos deficientes em BMP-3 exibiram um aumento significativo no volume ósseo trabecular, o que indica que BMP-3 é um regulador da formação óssea (Daluiski *et al.*, 2001). Os mesmos autores encontraram que no processo de reparo de fraturas, BMP-3 é expressa mais intensivamente no desenvolvimento de camadas periosteais dos segmentos ósseos próximos ao sítio de fratura do que na superfície de remodelamento ósseo (Zheng *et al.*, 2001; Daluiski *et al.*, 2001). A expressão de BMP-3 nessa área sugere papéis reguladores importantes no processo de formação óssea intramembranosa (Daluiski *et al.*, 2001).

Bahamonde & Lyons (2001) sugerem que BMP-3 antagoniza a função de BMP-2 através de um caminho de ativação distinto que é contrário à ativação de BMP-2.

O fumo também influencia enzimas envolvidas com a regulação óssea sendo a fosfatase alcalina (ALP) uma delas (Gordon, 1993). A fosfatase alcalina (ALP) tem seu papel no metabolismo ósseo e tem sido usada como marcador de células osteoblásticas diferenciadas (McCauley & Nohutcu, 2002), ou seja, é um marcador de formação óssea e diminui quando a atividade osteoblástica é diminuída (Fleisch, 1993; Lafage *et al.*, 1995; Siris *et al.*, 1996; Tucci *et al.*, 1996; Sass *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2006). ALP é encontrada em muitas células do periodonto incluindo osteoblastos, fibroblastos e neutrófilos (Shibata *et al.*, 1994).

2.6 Influência da nicotina sobre a expressão gênica

A influência da nicotina sobre a expressão de alguns genes durante o reparo ósseo foi avaliada por Theiss *et al.* (2000) após um procedimento cirúrgico para fusão espinhal. Os resultados mostraram que os coelhos que receberam nicotina apresentaram uma menor expressão de colágeno tipo 1 e 2, BMP-2, BMP-4, BMP-6, bFGF e VEGF, genes relacionados com a neoformação óssea.

Koshi *et al.* (2007) analisaram as mudanças induzidas pela nicotina na expressão gênica de uma linhagem de células tipo macrófagos por meio do Micro-Arranjo de DNA. Os resultados mostraram 4914 genes detectados, sendo que 118 desses genes mostraram um padrão de expressão gênica acima do normal e 97 mostraram um padrão abaixo do normal. Entre eles, estavam genes relacionados com inflamação e outros relacionados com a resposta imune. Através da análise de PCR em tempo real, mudanças similares na expressão de RNA_m foram encontradas. Dessa maneira, os resultados sugerem que a nicotina causa excesso de inflamação e descontrola o mecanismo de defesa do hospedeiro contra os patógenos.

Para investigar o efeito da nicotina na perfusão sanguínea, na angiogênese e na regeneração óssea, Zheng *et al.* (2008) utilizaram um modelo de distração osteogênica em ratos. Os resultados mostraram que as exposições à nicotina aumentaram a densidade dos microcapilares, mas inibiu o fluxo sanguíneo e a formação óssea. A expressão de BMP-2 nos osteoblastos também foi diminuída.

2.7 Influência da fumaça de cigarros e seus componentes em estudos *in vitro*

A fumaça de cigarros 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 em cultura 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 (Yuhara *et al.*, 1999) concluíram que a nicotina pode ter um efeito crítico sobre o metabolismo ósseo.

Muitos estudos (Raulin *et al.*, 1988; Tripton & Dabbous, 1995; James *et al.*, 1999; Tanur *et al.*, 2000) também têm sido realizados com o objetivo de se 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 (Tripton & Dabbous, 1995; James *et al.*, 1999). Já as culturas submetidas à ação da nicotina mostram células com arranjo desorganizado, sobreposições, anatomia alterada, vacuolização de citoplasma, redução do conteúdo protéico e destruição das membranas celulares (Raulin *et al.*, 1988; Tripton & Dabbous, 1995; Tanur *et al.*, 2000).

Em 2001, Liu *et al.* realizaram um experimento avaliando a ação direta da fumaça de cigarro sobre células osteoprogenitoras humanas. Para isso, as 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 cigarros impediu a diferenciação das células osteoprogenitoras em células tipo osteoblasto e que as culturas em monocamadas estavam mais suscetíveis aos efeitos adversos da fumaça de cigarro.

Peacock *et al.*, 1993 também avaliaram a influência da nicotina em cultura de fibroblastos gengivais. Entretanto, seus resultados são 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.

Em 1999, James *et al.* 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 ($> 1\text{mg/ml}$ e $> 0,5\text{mg/ml}$). Já a cotinina parece inibir o crescimento e adesão dos FLP na maior concentração estudada ($10\mu\text{g/ml}$), porém esse resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa.

No ano seguinte, Cattaneo *et al.* (2000) pesquisaram a ação de dois outros componentes da fumaça de cigarro, a acroleína e o acetaldeído, sobre os fibroblastos gengivais humanos (FGH) derivados de indivíduos saudáveis e sem inflamação gengival. Os resultados mostraram que as duas substâncias inibiam o crescimento e a proliferação dos FGH de maneira dose-dependente e que esses efeitos eram reversíveis quando ambas as substâncias eram removidas do meio de cultura, após 3 dias de exposição.

Lu *et al.* (2007) avaliaram e compararam a citotoxicidade e a expressão gênica em cultura de fibroblastos expostas à fumaça de cigarro com sabor (Teste 1), cigarro com baixa dose de tabaco (Teste 2) e cigarro com ultra-baixa dosagem de tabaco (Teste 3),

tendo como referência um cigarro com doses normais (2R4F). Encontraram que a citotoxicidade seguiu a seguinte ordem: Teste 1 > 2R4F $\approx$ Teste 2 > Teste 3. Alguns marcadores genéticos foram identificados para se avaliar e monitorar os efeitos do cigarro em modelos animais e humanos. Demonstraram que alguns genes expressos após exposição à fumaça podem estar relacionados com mecanismos de patogênese de doenças relacionadas ao fumo (Lu *et al.*, 2007).

2.8 Influência da fumaça de cigarros e seus componentes em 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, C - castração e D - castração e nicotina. Após 56 dias, os animais foram sacrificados e o fêmur analisado. Os resultados revelaram que os animais dos grupos B e D 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 grupo teste (fumaça de cigarro) e controle. A tíbia direita de cada animal foi alongada 5,0mm. Foram sacrificados 5 animais de cada grupo 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 foram prejudicadas.

Num estudo seguinte de metodologia similar, também de Ueng *et al.*, 1999 foi avaliado o efeito da fumaça de cigarro sobre a densidade óssea mineral em coelhos após um procedimento cirúrgico de alongamento de tíbia. Foram utilizados 12 coelhos divididos em grupo teste (fumaça de cigarro) e controle e sacrificados 6 semanas após a

realização das cirurgias. Os resultados mostraram que a fumaça de cigarro diminuiu a resistência à torção e a densidade mineral.

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 (4,0mm 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 (12,5mg/ml, 25mg/ml e 50mg/ml) e foi comparada com animais que não receberam nicotina. Os resultados revelaram que não houve diferença no reparo ósseo dos defeitos que receberam enxerto autógeno, entretanto a nicotina influenciou negativamente o reparo dos leitos doadores.

Também em 1999, Fung *et al.* investigaram o efeito da nicotina sobre o osso e os hormônios calciotrópicos de ratas adultas velhas. Foram utilizados no experimento 30 animais divididos em 3 grupos: A – solução salina fisiológica, B – nicotina numa dosagem de 3mg/Kg/dia através de bomba osmótica (n=10) e C – nicotina numa dosagem de 4,5mg/Kg/dia através de bomba osmótica (n=11). Após 3 meses de administração de nicotina, os ratos do grupo C mostraram uma menor área vertebral, menor densidade mineral e uma taxa de aposição óssea endocortical mais baixa quando comparados aos do grupo A.

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: 0,13µl, 0,19µl e 0,26µl. Concluiu-se que a nicotina potencializou a progressão da doença periodontal num padrão não dose-dependente.

Num estudo subsequente realizados 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 também observou-se que a nicotina parece ter uma ação deletéria direta sobre os tecidos periodontais.

Além disso, a fumaça de cigarros interfere negativamente no reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos analisadas histometricamente (Nociti *et al.*, 2002 a e b) e que a nicotina é responsável por parte deste efeito (César-Neto *et al.*, 2003).

Estudos radiográficos (César-Neto *et al.*, 2005 a e b) e histológico (César-Neto *et al.*, 2006) mostraram que além de influenciar negativamente o reparo ósseo, a fumaça de cigarro também promove uma diminuição na densidade do tecido ósseo que não sofreu nem um tipo de lesão e está em função normal, e que esse efeito é revertido com a interrupção da exposição à fumaça. A reversibilidade dos efeitos da fumaça de cigarro foi também observada no tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em tíbias de ratos (César-Neto *et al.*, 2005 c e d).

Apesar de todas as evidências, a influência da nicotina no reparo ósseo continua controversa. Zheng *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da nicotina na perfusão sanguínea, angiogênese e formação óssea de coelhos durante o procedimento de distração osteogênica. A perfusão sanguínea foi avaliada através do monitoramento do Laser Doppler e imunohistoquímica e a formação óssea foi avaliada por exames radiológico, histológico e imunohistoquímico. Os resultados mostraram que a exposição à nicotina aumentou a densidade dos micro-capilares, mas diminuiu o fluxo sanguíneo e a formação óssea. A expressão de BMP-2 nos osteoblastos também estava diminuída e o freqüente aparecimento de ilhas de cartilagem sugere isquemia e baixa tensão de oxigênio no reparo da distração. Sendo assim, os autores concluíram que a nicotina compromete a regeneração óssea possivelmente por causar isquemia e pelo efeito inibitório direto nas

células osteoblásticas. A exposição à nicotina aumenta a angiogênese, mas não consegue compensar o efeito adverso na vasoconstrição.

O número de evidências investigando os mecanismos pelos quais o tabagismo interfere sobre o reparo ósseo é limitado e, além disso, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão destes fenômenos, uma vez que outros genes podem estar envolvidos neste processo e outras substâncias presentes na fumaça do cigarro, além da nicotina, podem interferir em sua ação como um todo.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da inalação da fumaça de cigarros sobre o processo de reparo ósseo alveolar, em ratos, por meio de análise histométrica e da expressão de genes envolvidos nesse processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

Foram utilizados 40 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentos com Animais da UNICAMP N^o1572-1 (Anexo 3).

4.2 Delineamento Experimental

4.2.1 Exposição à fumaça

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais:

CONTROLE – 20 ratos machos que não foram expostos à fumaça de cigarros em nenhum momento durante todo o período experimental;

TESTE – 20 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 de 8 minutos cada, iniciando-se 3 dias antes das exodontias, sendo mantido durante todo o período pós-operatório (Figura 1).

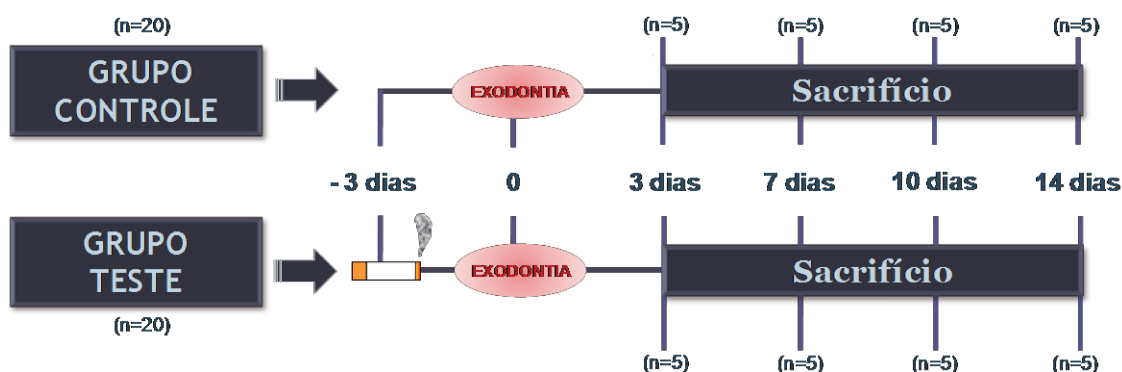


Figura 1: Demonstração do período experimental para os grupos controle e teste.

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier *et al.* (1981) e modificada no laboratório de pneumologia da Escola Paulista de Medicina (Cendon *et al.*, 1997). Esta metodologia foi adaptada por Nociti *et al.* (2002) para o uso nesta série de estudos. Observou-se em estudos prévios que ela promovia níveis séricos de cotinina semelhantes aos observados em fumantes que consomem cerca de 20 cigarros por dia (César-Neto *et al.*, 2003). Resumidamente, este modelo utiliza um recipiente de acrílico (45x25x20cm), onde 5 animais são 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 de 8 minutos cada. O recipiente é composto por 2 câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nesta parte há também uma entrada 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 (Figura 2).

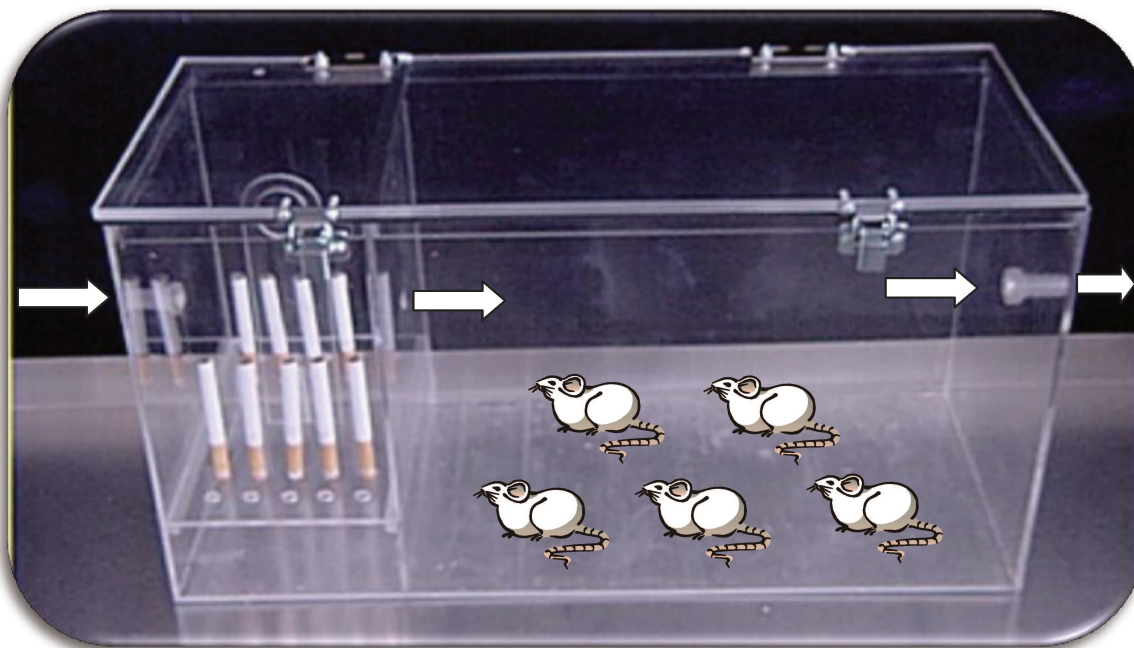


Figura 2: Imagem digital editada representando o mecanismo de exposição à fumaça.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Antes da cirurgia, os animais foram pesados e de acordo com seu peso corpóreo foram anestesiados com solução de ketamina (50mg/kg) (Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xylasina (15 mg/kg) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil). Cada animal foi posicionado em aparato de Doku modificado o que possibilita a abertura da boca e estabilização da cabeça. Com um hollemback infantil, o tecido gengival ao redor dos primeiros e segundos molares inferiores foi divulgionado. Um espaçador digital endodôntico foi, então, introduzido entre os dois molares inferiores para a luxação destes dentes. Uma pinça Kelly curva foi utilizada para a extração dentária. Em seguida os alvéolos foram curetados e os remanescentes do septo inter-radicular removidos. Após a extração, o tecido gengival foi suturado sobre os alvéolos através de suturas interrompidas simples com fio de Nylon 5.0 e as suturas removidas no 7º dia pós-operatório. No pós-operatório imediato, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (1 ml/Kg/IM) (Pentabiótico; Whitehall LTDA, São Paulo, S.P., Brasil) e na primeira semana após a cirurgia foram alimentados com ração moída. Nenhuma restrição de movimento foi feita aos animais após a cirurgia, os quais foram mantidos nas mesmas gaiolas plásticas.

4.4 Sacrifício dos Animais e Extração do RNA

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados aos 3, 7, 10 e 14 dias após a cirurgia, com uma dose letal de anestésico. Imediatamente após cada morte os alvéolos dentais dos primeiros molares foram curetados e o tecido obtido armazenado em eppendorfs contendo RNAlater[®] (Ambion Inc., Austin, TX, USA) para a preservação da integridade do RNA (Figura 3), permitindo assim o transporte e acondicionamento das amostras. O RNA total foi posteriormente extraído do tecido através do Kit Pure Link[™] MICRO-TO-MIDI / TOTAL RNA PURIFICATION SYSTEM (Invitrogen Corporation[™], Carlsbad,

CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante, descritas brevemente como se segue: a solução de RNAlater® foi aspirada e às biopsias ainda congeladas foi adicionada solução de lise. Após a completa lise do tecido, obtida com o auxílio de vigorosas e repetidas agitações (vortex), o conteúdo foi centrifugado (10.000 rpm por 2 minutos a 25°C) e o sobrenadante transferido para outro tubo ao qual foi adicionado etanol (70%) e agitado por 2 minutos. Depois de repetidas centrifugações (10.000 rpm, 2 minutos, 25°C), 30µl de água tratada com DEPC é adicionada à amostra. A concentração de RNA foi, então, determinada com a utilização de um espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e a integridade do RNA total das amostras foi comprovada através da eletroforese em gel de agarose a 1,6 %.

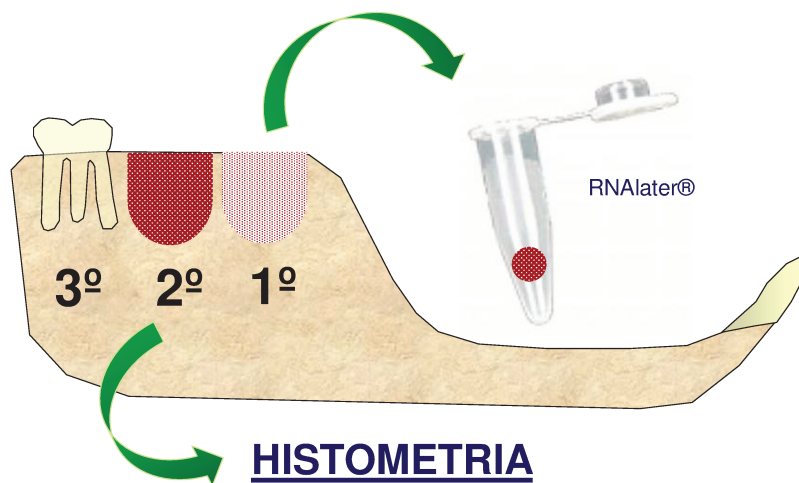


Figura 3: Representação esquemática da coleta dos tecidos dos alvéolos dentários e armazenamento em eppendorfs contendo RNAlater® e indicação do alvéolo analisado histometricamente.

4.5 Avaliação dos níveis de RNA_m por meio de PCR em tempo real

4.5.1 Síntese de cDNA

O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA) e 0,5 µg da amostra foi utilizada para a síntese do DNA complementar (cDNA). As reações foram realizadas utilizando-se o kit “first-strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20µl. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e então por 60 minutos a 42°C. Concluído o segundo ciclo de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 99°C e então incubadas por 5 minutos a 4 °C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl₂ (5mM), mistura de deoxinucleotídeos (1mM), “primers” randomizados - p[dN]₆ (3,2µg), inibidor de Rnase (50U), e transcriptase reversa – AMV (20U).

4.5.2 Desenho dos “Primers”

Os “primers” para Gapdh (gene de referência), ALP, BMP-2, BMP-3, BMP-7, RANKL, OPG e Atp6v0d2 (Tabela 1 em anexo 2) foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar “primers” para o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todos os “primers” foram verificados quanto a sua especificidade através da verificação da curva de Melting (obtida após reação de PCR) para a verificação dos produtos e as reações padronizadas individualmente para cada “primer” utilizado, sendo a água utilizada como controle negativo.

4.5.3 Reações de PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit *“FastStart DNA Master Plus SYBR Green I”* (Roche Diagnostics Co.). O perfil das reações foi determinado seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Gapdh foi utilizado como o gene de referência (*“housekeeping”*) para a normalização dos valores.

4.6 Processamento Histológico

Secções descalcificadas foram preparadas para a análise histométrica. Para isso, as mandíbulas foram dissecadas, divididas pela sínfise mandibular em hemimandíbulas e fixadas em formol a 4% com tampão fosfato (pH 7,2 - 7,4). A descalcificação foi realizada em solução de EDTA (10%; pH= 7,0). Segundo o procedimento laboratorial de rotina, o descalcificador foi renovado 1 vez por dia por 6 semanas. Ao final deste período, o osso já descalcificado foi desidratado em concentrações crescentes de álcool, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Secções longitudinais seriadas com 6 µm de espessura foram obtidas no sentido vestíbulo-lingual e coradas por hematoxilina e eosina. O corte mais central de cada alvéolo foi selecionado e serviu também como guia para a escolha dos outros cortes, e assim, dois cortes diretamente antes e dois cortes diretamente depois foram selecionados para a análise histométrica dos parâmetros pré-definidos usando um programa de análise de imagens (Image-Pro, ® Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Aos 3 dias, os parâmetros osteóide e defeito remanescente foram histometricamente analisados. E aos 7, 10 e 14 dias, os parâmetros tecido mineralizado, tecido medular e defeito remanescente foram histometricamente analisados.

4.7 Calibração do examinador

Para avaliar a calibração do examinador foi realizada, previamente às leituras finais, a correlação intra-classe. Vinte cortes foram aleatoriamente selecionados e suas medições foram feitas e repetidas 3 semanas após a primeira medição. O alto valor do coeficiente de correlação ($r = 0,989$; intervalo de Confiança 95% : $0,972 - 0,996$) mostra consistência na reprodutibilidade da leitura, mostrando boa calibração do examinador.

4.8 Análise Estatística

Uma vez obtidos os dados da análise histométrica, médias representativas de cada grupo foram submetidas a uma análise estatística com nível de significância de 5%. Para a análise intragrupo (efeito do tempo) foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA e, quando detectada diferença estatisticamente significativa, um teste de múltiplas comparações (Student-Newman-Keuls) foi utilizado. A análise intergrupo (efeito do tratamento) foi realizada utilizando o teste t de Student com nível de significância de 5%.

Comparações intragrupo avaliando a expressão dos genes em cada tempo de sacrifício foram realizadas através do teste paramétrico de análise de variância (One Way ANOVA), e quando detectada diferença estatística, o teste paramétrico de Tukey ($\alpha=0,05$) foi utilizado para detectar a diferença. Uma análise intergrupos testou a hipótese de que a inalação da fumaça de cigarros modifica a reparação óssea por meio da alteração do padrão de expressão gênica através do teste t de Student ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Histométricos

A análise intragrupo mostrou que tanto o grupo teste quanto o grupo controle tiveram uma sequência de reparo semelhante ao longo do tempo. O preenchimento ósseo do alvéolo foi diretamente proporcional ao tempo de sacrifício. De acordo com os parâmetros analisados, houve um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) de tecido mineralizado e uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos parâmetros tecido medular e defeito remanescente ao comparar os resultados de 3, 7, 10 e 14 dias, seqüencialmente.

A análise intergrupo demonstrou que a exposição à fumaça de cigarro resultou em uma menor proporção de tecido medular ($p \leq 0,001$) sendo este achado decorrente de uma maior proporção de defeito remanescente ($p \leq 0,05$) no grupo de animais expostos à fumaça de cigarros sacrificados no dia 7.

Achados histométricos são mostrados em detalhe nas figuras 1, 3, 5 e 7 e ilustrados nas figuras 2, 4, 6 e 8.

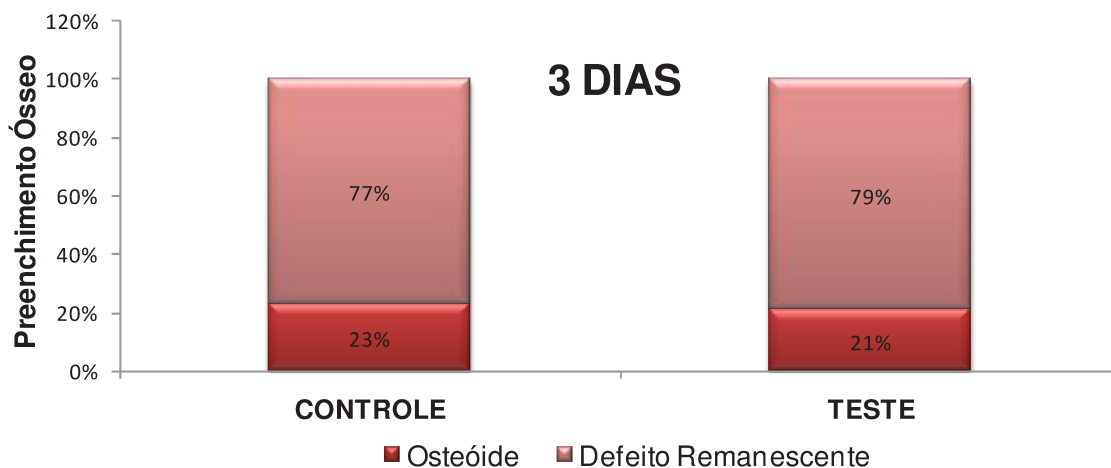
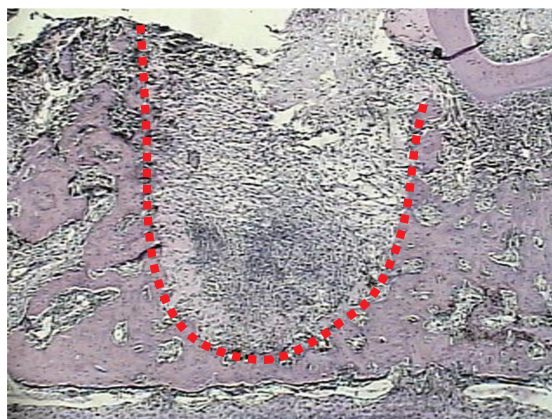
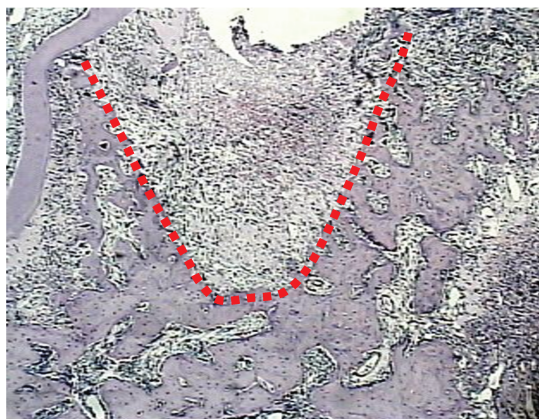


Figura 1: Média do preenchimento ósseo do alvéolo no período de 3 dias para os grupos controle e teste. Os resultados demonstram que a inalação da fumaça de cigarro não interferiu no preenchimento ósseo do alvéolo aos 3 dias, tanto para osteóide ($p=0,643$) quanto para o defeito remanescente ($p=0,683$). ANOVA e Student-Newman-Keuls, ($\alpha=0,05$) para a análise intragrupo e Teste t, ($\alpha=0,05$) para a análise intergrupo.



CONTROLE – 3 DIAS



TESTE – 3 DIAS

Figura 2: Fotomicrografia ilustrando o preenchimento ósseo no 3º dia de reparo ósseo alveolar, sobre as quais foram feitas as contagens histométricas. Representação dos grupos controle e teste. Linha pontilhada (.....) delimita a área do alvéolo dental. (Hematoxilina e Eosina; aumento de 100X).



Figura 3: Média do preenchimento ósseo do alvéolo no período de 7 dias para os grupos controle e teste. Os resultados demonstram que a inalação da fumaça de cigarro interferiu no preenchimento ósseo do alvéolo aos 7 dias reduzindo significativamente o tecido medular ($p \leq 0,001$) possivelmente em função da maior proporção de defeito remanescente ($p \leq 0,05$), mas não interferiu na formação de tecido mineralizado ($p=0,731$). ANOVA e Student-Newman-Keuls, ($\alpha=0,05$) para a análise intragrupo e Teste t, ($\alpha=0,05$) para a análise intergrupo.

* Estatisticamente significativa – Análise intergrupo (Teste t).

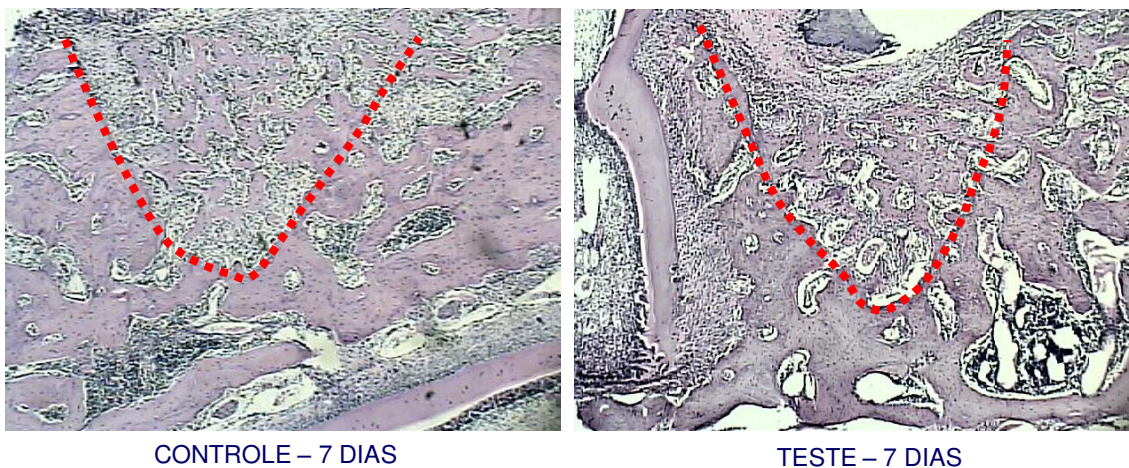


Figura 4: Fotomicrografia ilustrando o preenchimento ósseo no 7º dia de reparo ósseo alveolar, sobre as quais foram feitas as contagens histométricas. Representação dos grupos controle e teste. Linha pontilhada (.....) delimita a área do alvéolo dental. (Hematoxilina e Eosina; aumento de 100X).



Figura 5: Média do preenchimento ósseo do alvéolo no período de 10 dias para os grupos controle e teste. Os resultados demonstram que a inalação da fumaça de cigarros não afetou nenhum dos parâmetros avaliados aos 10 dias, tanto para tecido mineralizado ($p=0,123$) quanto para tecido medular ($p=0,100$) e para defeito remanescente ($p=0,522$). ANOVA e Student-Newman-Keuls, ($\alpha=0,05$) para a análise intragrupo e Teste t, ($\alpha=0,05$) para a análise intergrupo.

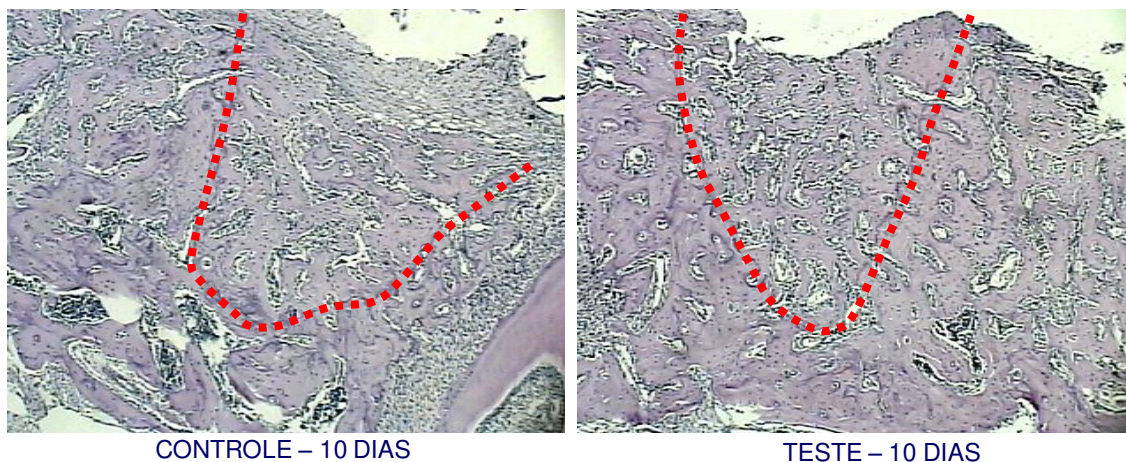


Figura 6: Fotomicrografia ilustrando o preenchimento ósseo no 10º dia de reparo ósseo alveolar, sobre as quais foram feitas as contagens histométricas. Representação dos grupos controle e teste. Linha pontilhada (.....) delimita a área do alvéolo dental. (Hematoxilina e Eosina; aumento de 100X).



Figura 7: Média do preenchimento ósseo do alvéolo no período de 14 dias para os grupos controle e teste. Os resultados demonstram que a inalação da fumaça de cigarro não afetou nenhum dos parâmetros avaliados aos 14 dias, tanto para tecido mineralizado ($p=0,920$) quanto para tecido medular ($p=0,348$) e para defeito remanescente ($p=0,443$). ANOVA e Student-Newman-Keuls, ($\alpha=0,05$) para a análise intragrupo e Teste t, ($\alpha=0,05$) para a análise intergrupo.

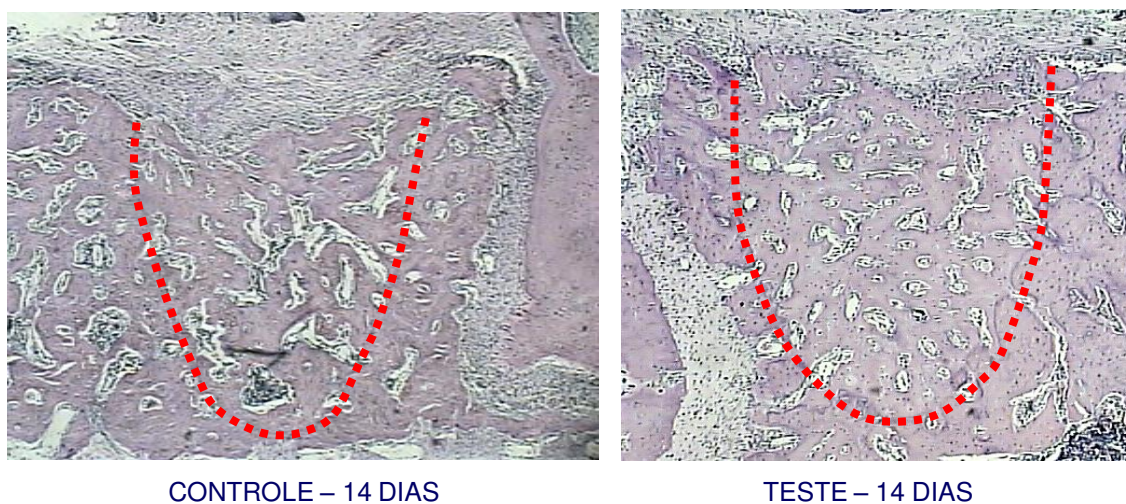


Figura 8: Fotomicrografia ilustrando o preenchimento ósseo no 14º dia de reparo ósseo alveolar, sobre as quais foram feitas as contagens histométricas. Representação dos grupos controle e teste. Linha pontilhada (.....) delimita a área do alvéolo dental. (Hematoxilina e Eosina; aumento de 100X).

5.2 Resultados de Expressão Gênica

Para a avaliação da influência da inalação da fumaça de cigarros sobre a expressão gênica durante o reparo ósseo alveolar, os níveis de RNA_m foram quantificados utilizando-se como referência a expressão do gene Gapdh, por meio de PCR quantitativo em tempo real para os grupos teste e controle. Observou-se que a inalação da fumaça de cigarros interferiu na expressão de alguns genes ao longo do período experimental de forma que para o gene Atp6v0d2 a análise intragrupo demonstrou que, para o grupo controle houve um abrupto e significativo aumento a partir do 7º dia e uma diminuição gradual nos períodos seguintes ($p \leq 0,001$) e que no grupo teste, também houve um significativo e abrupto aumento no 7º dia ($p \leq 0,05$) e uma abrupta diminuição nos níveis de RNA_m de Atp6v0d2 aos 10 dias ($p \leq 0,05$), mantendo-se aos 14 dias (Figura 9). Já a análise intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa para todos os períodos avaliados ($p \leq 0,05$), exceto para o período de 14 dias ($p = 0,279$).

A inalação da fumaça de cigarros também interferiu na expressão de outros genes ao longo do período experimental, entre eles, RANKL e OPG. A análise da razão entre RANKL/OPG demonstra que a fumaça de cigarros favorece a resposta de reabsorção óssea, pois a análise intragrupo demonstrou que no grupo controle houve, a partir dos níveis aos 3 dias, um abrupto aumento aos 7 dias ($p > 0,05$) seguida por uma diminuição gradual da razão entre RANKL/OPG a partir do 7º dia ($p = 0,016$). No grupo teste um aumento contínuo e gradual dessa razão pôde ser observada ao longo do período experimental ($p = 0,003$) (Figura 10). A análise intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa nos períodos de 7 dias ($p = 0,036$) e 14 dias ($p = 0,036$).

Em relação às proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), os resultados da análise intragrupo demonstram que os níveis de RNA_m de BMP-3 aos 3 dias estavam baixos, mas com um abrupto e significativo aumento aos 7 dias ($p \leq 0,001$). A partir daí, houve uma tendência de diminuição gradativa nos níveis de RNA_m ao longo do período experimental ,

tanto para o grupo controle quanto para o grupo teste ($p \leq 0,001$). Também apresentaram diferença estatisticamente significativa, na análise intergrupo, os dias 3 ($p = 0,001$), 10 ($p = 0,014$) e 14 dias ($p \leq 0,001$) (Figura 11).

A análise intragrupo demonstrou que para o gene BMP-2, os níveis de RNA_m do grupo controle aos 3 dias estavam baixos em relação aos períodos seguintes havendo um abrupto e significativo aumento nos níveis de RNA_m aos 7 dias ($p < 0,001$) com um sucessivo aumento aos 10 dias sem significância estatística. Aos 14 dias, há uma diminuição significativa ($p = 0,009$) nos níveis de RNA_m de BMP-2. No grupo teste, houve um aumento intenso e significativo nos níveis de RNA_m do dia 3 para o dia 7 ($p < 0,001$), seguida de abrupta diminuição aos 10 dias ($p < 0,001$) e um pequeno aumento aos 14 dias, sem significância estatística ($p = 0,189$). Através da análise intergrupo, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas no 10º dia ($p \leq 0,001$) (Figura 12).

Quando se observa a análise intragrupo para o gene BMP-7, houve uma tendência de aumento gradativa nos níveis de RNA_m ao longo do tempo, tanto para o grupo controle ($p \leq 0,001$) como para o grupo teste ($p \leq 0,001$). A análise intergrupo demonstrou uma diferença estatisticamente significativa para 3 dias ($p = 0,008$) e 14 dias ($p = 0,004$) (Figura 13).

Observou-se também que, para a análise intragrupo, a expressão da Fosfatase Alcalina (ALP) no grupo controle mostrou-se com níveis baixos de RNA_m aos 3 dias e níveis mais altos aos 7 dias ($p > 0,05$) e esse aumento nos níveis de RNA_m elevou-se significativamente aos 10 dias ($p > 0,05$), mas abruptamente foi diminuído aos 14 dias ($p < 0,05$). O grupo teste apresentou níveis bastante baixos de RNA_m em todos os períodos avaliados, sem diferença estatisticamente significativa na análise intragrupo ($p = 0,062$). A análise intergrupo revelou diferença estatisticamente significativa para 7 ($p = 0,010$) e 10 dias ($p \leq 0,001$) (Figura 14).

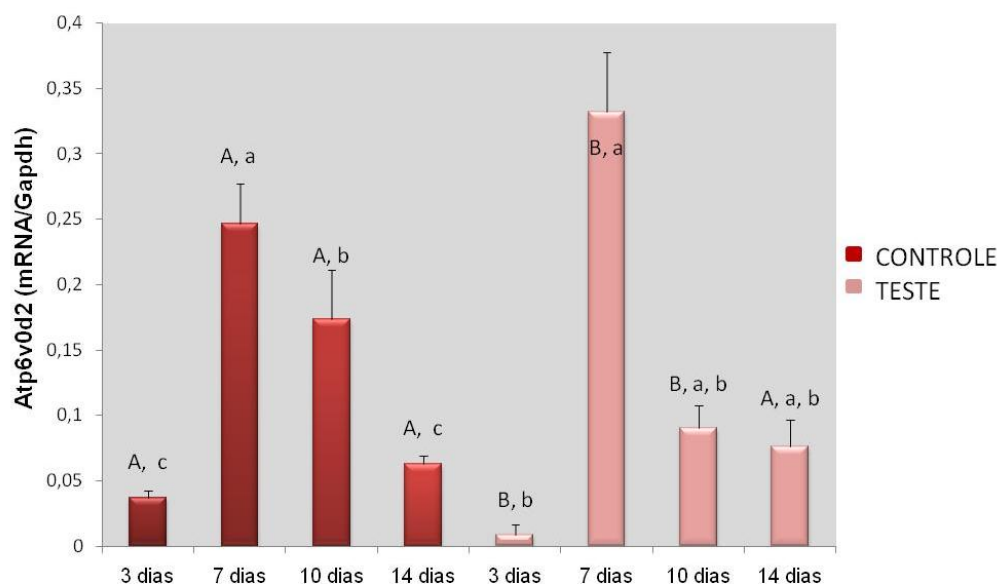


Figura 9: Média e desvio padrão dos níveis de RNA_m (RNA_m/Gapdh) de Atp6v0d2 para o grupo controle e teste ao longo dos períodos experimentais. A análise intragrupo demonstrou que, para o grupo controle houve um abrupto e significativo aumento a partir do 7º dia e uma diminuição gradual nos períodos seguintes ($p \leq 0,001$) e que no grupo teste, também houve um significativo e abrupto aumento no 7º dia ($p \leq 0,05$) e uma abrupta diminuição nos níveis de RNA_m de Atp6v0d2 aos 10 dias ($p \leq 0,05$). Houve pouca, mas significativa diminuição nos níveis aos 14 dias com diferença estatística ($p \leq 0,001$). Já a análise intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa para todos os períodos avaliados ($p \leq 0,05$), exceto para o período de 14 dias ($p = 0,279$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

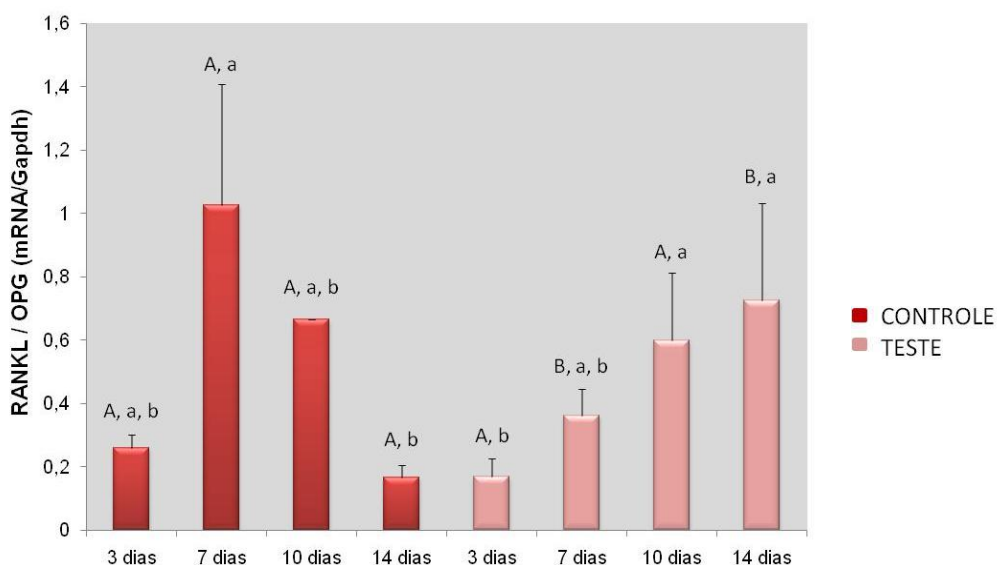


Figura 10: Média e desvio padrão da razão entre RANKL/OPG (RNA_m/Gapdh).. A análise da razão entre RANKL/OPG demonstra que a fumaça de cigarros favorece a resposta de reabsorção óssea, pois a análise intragrupo demonstrou que no grupo controle houve, a partir dos níveis aos 3 dias, um abrupto aumento aos 7 dias ($p > 0,05$) seguida por uma diminuição gradual da razão entre RANKL/OPG a partir do 7º dia ($p = 0,016$). No grupo teste um aumento contínuo e gradual dessa razão pôde ser observada ao longo do período experimental ($p = 0,003$). A análise intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa nos períodos de 7 dias ($p = 0,036$) e 14 dias ($p = 0,036$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

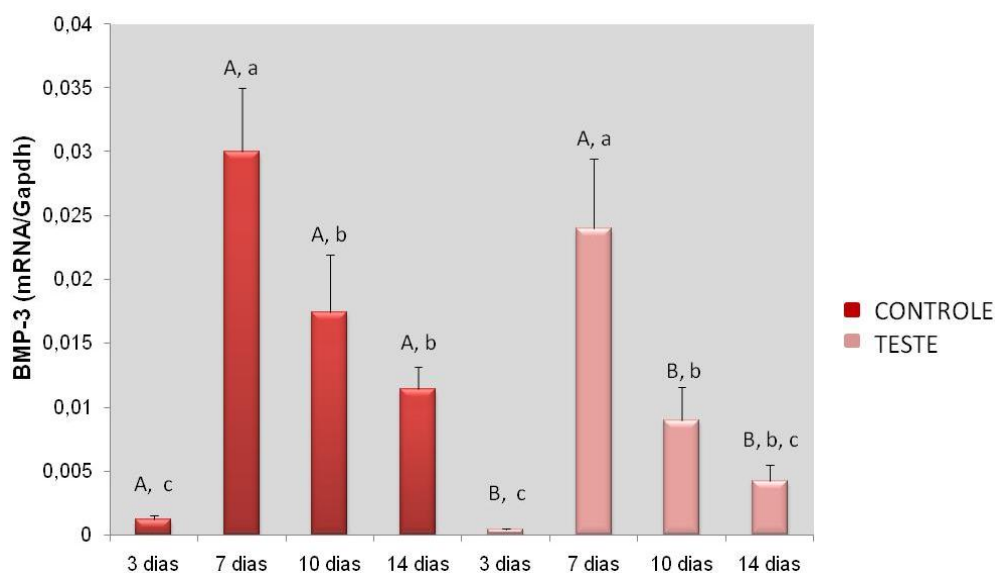


Figura 11: Média e desvio padrão dos níveis de RNA_m (RNA_m/Gapdh) da proteína óssea morfogenética - 3 (BMP-3). Os resultados da análise intragrupo demonstram que os níveis de RNA_m de BMP-3 aos 3 dias estavam baixos, mas com um abrupto e significativo aumento aos 7 dias ($p \leq 0,001$). A partir daí, houve uma tendência de diminuição gradativa nos níveis de RNA_m ao longo do período experimental, tanto para o grupo controle quanto para o grupo teste ($p \leq 0,001$). Também apresentaram diferença estatisticamente significativa, na análise intergrupo para os dias 3 ($p = 0,001$), 10 ($p = 0,014$) e 14 dias ($p \leq 0,001$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

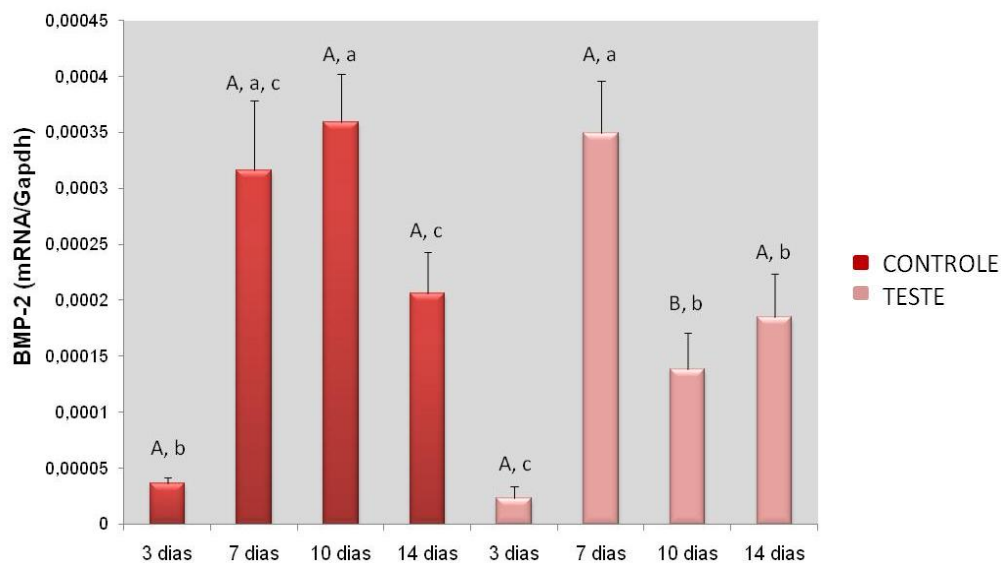


Figura 12: Média e desvio padrão dos níveis de RNA_m (RNA_m/Gapdh) da proteína óssea morfogenética - 2 (BMP-2). A análise intragrupo demonstrou que para o gene BMP-2, os níveis de RNA_m do grupo controle aos 3 dias estavam baixos em relação aos períodos seguintes havendo um abrupto e significativo aumento nos níveis de RNA_m aos 7 dias ($p < 0,001$) com um sucessivo aumento aos 10 dias sem significância estatística. Aos 14 dias, há uma diminuição significativa ($p = 0,009$) nos níveis de RNA_m de BMP-2. Já no grupo teste, houve um aumento repentino e significativo nos níveis de RNA_m do dia 3 para o dia 7 ($p < 0,001$), seguida de repentina diminuição aos 10 dias ($p < 0,001$) e um pequeno aumento aos 14 dias, sem significância estatística ($p = 0,189$). Através da análise intergrupo observou-se diferença estatisticamente significativa apenas no 10º dia ($p \leq 0,001$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

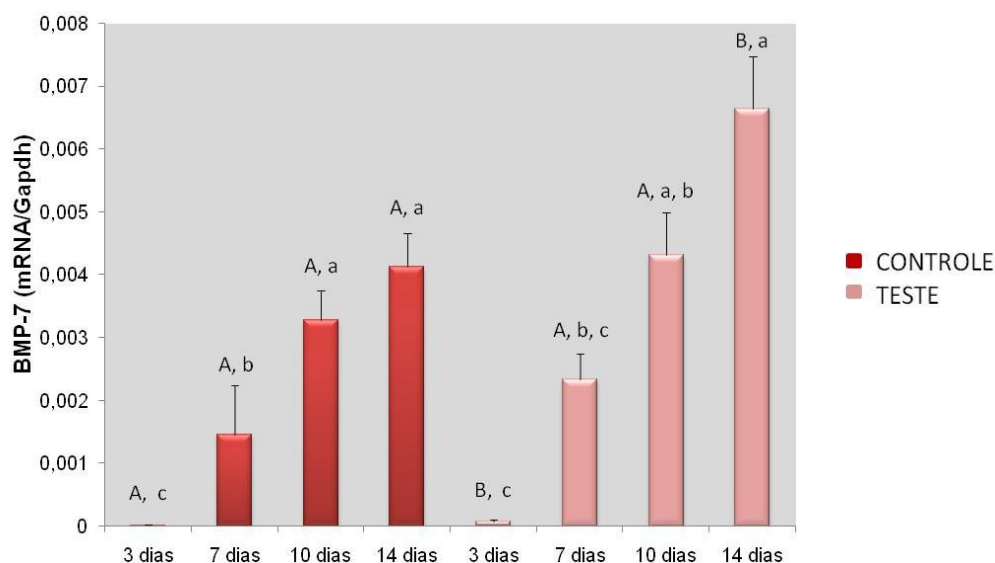


Figura 13: Média e desvio padrão dos níveis de RNA_m (RNA_m/Gapdh) da proteína óssea morfogenética - 7 (BMP-7). A análise intragrupo para o gene BMP-7 demonstra que houve uma tendência de aumento gradativa nos níveis de RNA_m ao longo do tempo, tanto para o grupo controle ($p \leq 0,001$) como para o grupo teste ($p \leq 0,001$). A análise intergrupo demonstrou uma diferença estatisticamente significativa para 3 dias ($p = 0,008$) e 14 dias ($p = 0,004$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

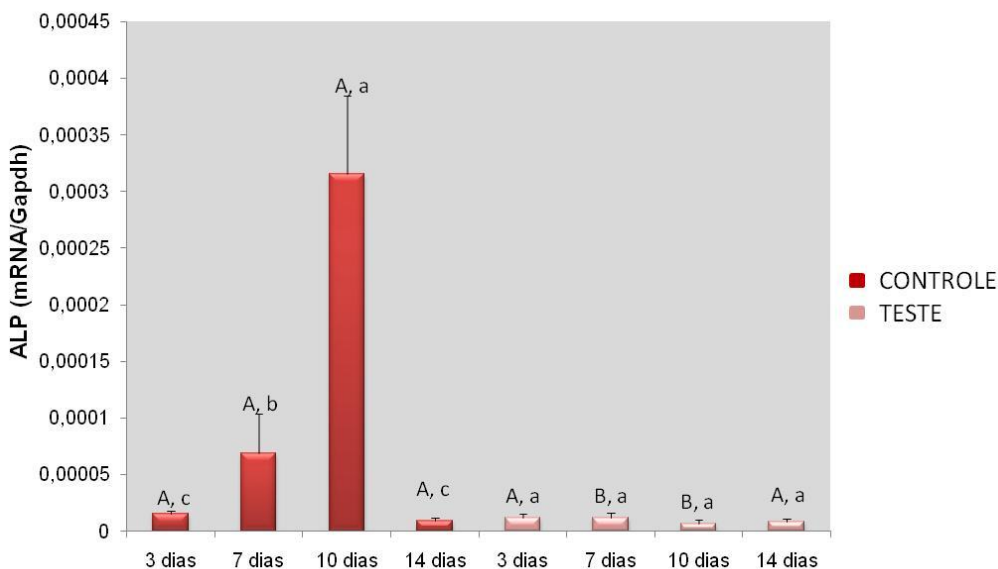


Figura 14: Média e desvio padrão dos níveis de RNA_m (RNA_m/Gapdh) de Fosfatase Alcalina (ALP). Os resultados demonstram que a inalação da fumaça de cigarros interferiu totalmente na expressão da Fosfatase Alcalina (ALP). Para a análise intragrupo, a expressão da Fosfatase Alcalina (ALP) no grupo controle mostrou-se com níveis baixos de RNA_m aos 3 dias e níveis mais altos aos 7 dias ($p > 0,05$) e esse aumento nos níveis de RNA_m elevou-se significativamente aos 10 dias ($p > 0,05$), mas abruptamente foi diminuído aos 14 dias ($p < 0,05$). O grupo teste apresentou níveis bastante baixos de RNA_m em todos os períodos avaliados, sem diferença estatisticamente significativa na análise intragrupo ($p = 0,062$). A análise intergrupo revelou diferença estatisticamente significativa para 7 ($p = 0,010$) e 10 dias ($p \leq 0,001$). Letras minúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intragrupo (ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$). Letras maiúsculas distintas representam diferenças estatisticamente significantes na análise intergrupo (Teste t, $\alpha=0,05$).

6 DISCUSSÃO

O efeito do cigarro no organismo humano tem sido um assunto vastamente investigado e de alto interesse na área da saúde pública e, inevitavelmente, leva a questões quanto à patofisiologia desse fenômeno. Desta forma, o presente estudo avaliou a influência da inalação da fumaça de cigarros sobre o início do processo de reparo ósseo alveolar, em ratos, tanto histometricamente quanto em relação à expressão de genes de relevância nesse processo. A análise histométrica deste trabalho confirma achados prévios mostrando que a inalação da fumaça de cigarros pode influenciar negativamente a reparação óssea (Mosely & Finseth, 1977; Jones & Triplett, 1992; Silverstein, 1992; Fung *et al.*, 1999; Hollinger *et al.*, 1999; Iwaniec *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2002; Nociti *et al.*, 2002a; Nociti *et al.*, 2002b; César-Neto *et al.*, 2003; Saldanha *et al.*, 2004; César-Neto *et al.*, 2005a; Kanis *et al.*, 2005; César-Neto *et al.*, 2006a). A redução significativa de tecido medular no 7º dia de reparo ósseo alveolar, possivelmente em função da maior proporção de defeito remanescente sugere que a fumaça de cigarros pode interferir na neoformação óssea logo no início do reparo ósseo alveolar.

Resultados semelhantes foram observados por Saldanha *et al.* (2006) num estudo que avaliou radiograficamente o efeito do consumo de cigarros sobre o remodelamento ósseo alveolar após extração dentária. Os resultados de 6 meses mostraram que os pacientes fumantes tiveram uma maior redução da altura óssea alveolar, da densidade óssea radiográfica no centro do alvéolo, e da densidade radiográfica do osso pré-existente quando comparados aos não-fumantes.

A influência da fumaça de cigarros sobre o metabolismo ósseo foi relatada por César-Neto *et al.* (2003) mostrando que a inalação da fumaça de cigarros tem uma maior influência, quando comparada com injeções subcutâneas de nicotina, no reparo ósseo cortical e medular ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos. Esse mesmo modelo de inalação da fumaça de cigarros mostrou um efeito negativo no osso

pré-existente da tíbia (Pan *et al.*, 2000) e no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio (Motohashi *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2000; Nociti *et al.*, 2002) sendo que o impacto negativo do cigarro na qualidade óssea também foi observada numa análise radiográfica de tíbias e mandíbulas de ratos (Ueng *et al.*, 1997; Ueng *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram encontrados ao avaliar histometricamente o osso alveolar de suporte (César- Neto *et al.* 2006a). Tendo em vista as similaridades dos resultados de estudos prévios (Ueng *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000) com os resultados histométricos do presente estudo, pode se sugerir que o reparo ósseo alveolar é significativamente afetado pela inalação da fumaça de cigarros.

Levando-se em consideração os mecanismos pelos quais o cigarro afeta o metabolismo ósseo, estudos *in vitro* têm demonstrado que os componentes da fumaça de cigarros produzem efeitos citotóxicos nas células responsáveis pelo remodelamento ósseo. A nicotina mostrou-se com um efeito dependente da sua concentração, ou seja, em cultura de células osteoblásticas, a presença da nicotina em altos níveis provocou efeito antiproliferativo das células e em baixos níveis provocou efeitos estimulatórios (Liu *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que o acetaldeído e a acroleína, componentes voláteis da fumaça de cigarros, produzem efeitos citotóxicos em cultura de fibroblastos (Cattaneo *et al.*, 2000; Rota *et al.*, 2001; Poggi *et al.*, 2002).

Adicionalmente, considerando que o monóxido de carbono tem uma afinidade 200 vezes maior com a hemoglobina do que a molécula de oxigênio (Silverstein, 1992), as áreas em cicatrização do organismo, cujas células têm um alto metabolismo e necessitam de uma grande quantidade de oxigênio, podem ser prejudicadas. O cianeto de hidrogênio, outro componente volátil da fumaça de cigarros, inibe as enzimas necessárias para o metabolismo oxidativo e o transporte de oxigênio às células (Mosely & Finseth, 1977). Esses eventos metabólicos, juntamente com outros eventos celulares e moleculares podem interferir de maneira negativa no reparo ósseo, pois como sugerem Devlin & Sloan (2002), as células osteoprogenitoras presentes no ligamento periodontal residual e

também no osso medular podem contribuir para a regeneração óssea após a extração dentária. Outros estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a nicotina e outras substâncias tóxicas encontradas na fumaça de cigarros (Jones & Triplett, 1992; Ward & Klesges, 2001; Nociti *et al.*, 2002a; Nociti *et al.*, 2002b; César-Neto *et al.*, 2003; Henemyre *et al.*, 2003; César-Neto *et al.*, 2005a; César-Neto *et al.*, 2005b; Kanis *et al.*, 2005; César-Neto *et al.*, 2006a; César-Neto *et al.*, 2006b) podem inibir a revascularização (Daftari *et al.*, 1994), tem um efeito negativo no reparo ósseo (Hollinger *et al.*, 1999), promove inibição do reparo ósseo após regeneração óssea guiada (Saldanha *et al.*, 2004) e inibe a expressão de muitas citocinas incluindo aquelas associadas com a neovascularização (Theiss *et al.*, 2000; Henemyre *et al.*, 2003; César-Neto *et al.*, 2006a) e diferenciação osteoblástica (Theiss *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2008). Henemyre *et al.* (2003) observaram que, num nível clinicamente relevante, a nicotina não é tóxica para os osteoclastos, mas parece estimular a diferenciação osteoclástica e a reabsorção de fosfato de cálcio, componente em maior quantidade no osso. Esses estudos acima citados demonstram que, tanto a nicotina quanto outras substâncias tóxicas encontradas na fumaça de cigarros, interferem no metabolismo das células ósseas podendo inibir a proliferação das células e a diferenciação das células osteoprogenitoras em células tipo osteoblasto (Liu *et al.*, 2001) podendo provocar os efeitos observados histometricamente e clinicamente.

A nicotina também promoveu um aumento na constrição da vasculatura óssea intacta (Feitelson *et al.*, 2003) e prejudicou a angiogênese (Daftari *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 2002) e a osteogênese em áreas de ossificação (Pinto *et al.*, 2002). Esses dados podem estar relacionados com os nossos resultados histométricos e explicar possíveis mecanismos envolvidos no presente estudo. No entanto, embora seja extremamente relevante, muito pouca informação está disponível em relação aos mecanismos envolvidos na modulação gênica do reparo ósseo alveolar. Desordens inflamatórias, neoplásicas e fatores do meio ao longo da vida, como idade, dieta e fumo podem provocar efeitos profundos na expressão de genes específicos. Essas modificações epigênicas são reconhecidas como fatores permissivos ou supressivos no controle das expressões do genoma através da

transcrição gênica e é o regulador central do desenvolvimento e ativação celular (Wilson, 2008).

Como visto neste estudo, a inalação da fumaça de cigarros pode provocar modificações epigênicas e assim promover a modulação de genes envolvidos no processo de homeostasia óssea. Por meio da análise dos resultados do presente estudo, pôde-se observar que a inalação da fumaça de cigarros afetou o padrão de expressão para os genes *Atp6v0d2*, *RANKL*, *OPG*, *ALP* e *BMP-2*, mas não afetou o padrão de expressão de *BMP-3* e *BMP-7*, apesar de apresentar diferença estatística.

A expressão gênica e os efeitos de *RANKL* (fator pro-reabsorção) e *OPG* (fator anti-reabsorção) no remodelamento ósseo têm sido demonstrados *in vivo* e *in vitro*.

Observando-se os dados do presente estudo, percebe-se que na relação entre *RANKL* e *OPG* (*RANKL/OPG ratio*) há uma tendência de aumento gradual nos níveis de *RNA_m* no grupo teste e no grupo controle há uma tendência de diminuição dessa razão ao longo do tempo. Isso sugere uma interferência da fumaça de cigarro na expressão dos genes *RANKL* e *OPG*. A razão entre *RANKL* e *OPG* também é aumentada e correlaciona-se com marcadores de reabsorção óssea e marcadores de atividade de doença no mieloma múltiplo (Terpos *et al.*, 2003) e também com diversas formas de doença periodontal (Bostanci *et al.*, 2007). Lappin *et al.* (2007) demonstraram diminuição nos níveis de *OPG* e uma relação maior entre *RANKL/OPG* da saliva de fumantes em terapia de manutenção quando comparados com não fumantes. O fumo pareceu suprimir os níveis de *OPG* nos fumantes e pode contribuir para um aumento da destruição óssea. Apesar de a relação média entre *RANKL/OPG* não ter mostrado diferença significativa, os fumantes não tratados tiveram baixa concentração de *OPG* e alta concentração de *RANKL*, o que pode indicar que fumantes não tratados podem possivelmente apresentar um maior risco de perda óssea do que fumantes em terapia de manutenção (Lappin *et al.*, 2007).

Em relação ao gene Atp6v0d2, duas isoformas de v-ATPase V_0 subunidade d, d1 e d2, têm sido identificadas em camundongos e em humanos (Lee *et al.*, 2006). Os dados do atual estudo demonstram que há uma tendência de diminuição gradual ao longo do tempo em ambos os grupos, embora a análise intergrupo revele níveis significativamente maiores aos 7 dias e menores aos 3 e 10 dias. Lee *et al.* (2006), examinando como os osteoclastos se desenvolvem através da fusão de células precursoras, identificaram uma proteína chave para esta atividade – um componente da bomba de próton, Atp6v0d2. Os autores mostram que Atp6v0d2 promove a fusão dos precursores e a atividade osteoclástica, mas também de alguma maneira inibe os osteoblastos (Boyce & Xing, 2006). Ao relacionar esses achados com os dados do atual estudo, percebe-se que Atp6v0d2 foi mais expresso no 7º dia no grupo teste o que pode sugerir que haja realmente uma maior indução da atividade osteoclástica com a inalação da fumaça de cigarro podendo levar a uma maior resposta pró-reabsorção óssea. Entretanto, esse é o único estudo que avalia a interação da fumaça de cigarros sobre a expressão desse gene durante o processo de formação óssea e, portanto, estudos adicionais são necessários para se estabelecer conclusões mais consistentes.

Tem sido demonstrado que as proteínas ósseas morfogenéticas apresentam uma variedade de funções. Elas não apenas induzem a formação de cartilagem e osso como também têm papéis importantes sobre processos de desenvolvimento não-osteogênico (Xiao *et al.*, 2007). A análise dos dados demonstrou que, no grupo controle, houve uma diminuição gradativa na expressão de BMP-3 a partir do 7º dia e esse padrão de distribuição dos dados se repete para o grupo teste. Apesar disso, há uma diminuição nos níveis de RNA_m de BMP-3 no grupo teste em relação ao grupo controle aos 10 e 14 dias, o que sugere que a inalação da fumaça de cigarros pode não influenciar o padrão de expressão gênica de BMP-3, mas pode diminuir os níveis de RNA_m desse gene. Segundo Zheng *et al.* (2005), BMP-3 é mais intensamente expressa durante o desenvolvimento das camadas periosteais do que durante o remodelamento da superfície óssea. Os autores encontraram também que a expressão de BMP-3 foi maior no 7º dia após a fratura óssea

e foi gradualmente diminuída com a ossificação, indicando que a expressão de BMP-3 é ativada durante a formação dos tecidos periosteais e está de acordo com os resultados do presente estudo. No entanto, BMP-3 parece representar uma exceção. Bahamonde & Lyons (2001) sugerem que BMP-3 é o antagonista dos receptores de BMP-2 e inibe a indução osteogênica (Xiao *et al.*, 2007) e a diferenciação *in vitro* (Bahamonde & Lyons, 2001). Camundongos “Knockout” para BMP-3 exibiram densidade óssea aumentada, o que indica que BMP-3 antagoniza a via de sinalização de BMP *in vivo* (Zhang *et al.*, 2002).

Analisando os dados da expressão gênica de BMP-2, observa-se que, no presente estudo, houve um aumento gradual e significativo na expressão de BMP-2, mas esse aumento foi interrompido por uma significativa redução no dia 14, no grupo controle, enquanto que no grupo teste essa diminuição parece ter sido antecipada para o dia 10 e mantida aos 14 dias sugerindo que a fumaça de cigarros pode influenciar a expressão do gene BMP-2 a partir do dia 10 após a extração dos dentes, e não no início do reparo ósseo, quando a sua disponibilidade é mais importante (Tsuji *et al.*, 2006). Esses resultados corroboram com os achados de Tsuji *et al.* (2006) que quantificaram a atividade de BMP presentes em sítios com fratura em camundongos “Knockout” para BMP-2 através da análise dos RNA_m de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 aos 3 e 10 dias após a fratura, período em que a sinalização de BMP é crítica para o início do reparo e foram comparados com os níveis de BMP no osso intacto. Como esperado, nos camundongos do grupo controle (+/+) e do grupo heterozigótico (+/-), ou seja, ratos não-transgênicos para BMP-2, os níveis de BMP-2, -4 e -7 estavam elevados logo após a fratura e permaneceram elevados até 10 dias de reparo ósseo, o que indica que a cascata de reparo da fratura estava em progresso. Quando BMP-2 estava ausente (-/-), os níveis de BMP-4 e BMP-7 estavam presentes em níveis comparáveis em camundongos do grupo controle aos 3 dias, mas com diminuição significativa aos 10 dias. Esse resultado mostra que BMP-2 é especificamente recrutada para a iniciação do reparo ósseo. Sugerem, portanto, que BMP-2 é um componente necessário para a capacidade regenerativa inerente do osso e promove o primeiro sinal molecular para a iniciação do reparo esquelético endógeno,

como também sugerem Bandyopadhyay *et al.* (2006) demonstrando que BMP-2 e BMP-4 são pré-requisitos para a osteoblastogênese e menos importante para a condrogênese.

Alguns estudos demonstraram que a nicotina, mesmo por outras vias de administração, com níveis séricos de cotinina diferentes dos apresentados pelo atual trabalho e com diferentes modelos animais, pode interferir na expressão gênica de BMP-2. Zheng LW *et al.* (2008) demonstraram que a nicotina induz mudanças na perfusão sanguínea e na expressão de BMP-2, que foi significativamente reduzido nas células osteoblásticas durante o período de regeneração óssea na distração osteogênica de coelhos e Theiss *et al.* (2000), também em coelhos, mostrou que a presença de nicotina mudou significativamente a expressão de BMP-2. Kim *et al.* (2003) demonstraram que a nicotina contribui para o processo de degeneração do disco possivelmente por antagonizar o efeito de BMP-2.

Conjuntamente, os dados do presente trabalho sugerem a modulação dos genes BMP-2 e BMP-3 (antagonista de BMP-2) pela fumaça de cigarros. No grupo controle, a partir do 10º dia após a extração dos dentes, observam-se maiores níveis de RNA_m para BMP-2 em relação à BMP-3 caracterizando maior neoformação óssea. No grupo teste ocorre a diminuição dos níveis de BMP-2 a partir do dia 10 o que leva a uma maior ação da BMP-3, processo inverso ao do grupo controle.

A proteína óssea morfogenética-7 (BMP-7) também tem um papel chave durante a diferenciação e o comprometimento osteoblástico e leva a uma forte resposta osteogênica, mas o seu papel é mais importante durante o processo endocondral do que no início do processo, onde agem BMP-2 e BMP-4 (Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2006). Para o gene BMP-7 há um aumento gradual ao longo do tempo no grupo controle e que se repete na análise dos dados do grupo teste. Apesar dessa igualdade no padrão de distribuição dos dados nos dois grupos há uma diferença estatística significativa para os dias 3 e 14 dias comparando-se o grupo teste e o grupo controle. Isso sugere que

pode haver uma influência da fumaça de cigarros para a expressão gênica de BMP-7 no início e no final do reparo ósseo alveolar, o que pode modular a osteoblastogênese.

Tem sido sugerido que a formação óssea requer uma cascata de sinalizações moleculares de várias BMPs, mas que não se inicia se BMP-2 estiver ausente. Parece, portanto, que outras BMPs presentes no desenvolvimento dos membros podem compensar a diminuição nos níveis de BMP-2 (Lyons *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 1998; Solloway *et al.*, 1998; Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Poderíamos especular que um fenômeno similar pode ser observado no grupo teste do atual estudo, pelo fato de haver baixos níveis de BMP-2 a partir de 10 e 14 dias e que coincide com altos níveis de BMP-7 no mesmo período, o que pode sugerir que BMP-7 é mais expressa quando há uma diminuição de BMP-2 pela influência da fumaça de cigarros, e por isso os níveis de RNA_m de BMP-7 serem mais altos no grupo teste.

O fumo também influencia enzimas envolvidas com a regulação óssea sendo a fosfatase alcalina (ALP) uma delas (Gordon *et al.*, 1993) e a sua expressão no grupo controle segue um aumento gradual até o 7º dia com um significativo aumento aos 10 dias e com uma abrupta diminuição no 14º dia. No grupo teste percebe-se que a inalação da fumaça de cigarros influencia fortemente a expressão desse gene levando a uma significativa redução dos níveis de RNA_m nos dias 7 e 10. A fosfatase alcalina (ALP) tem seu papel no metabolismo ósseo e tem sido usada como marcador de células osteoblásticas diferenciadas (McCauley & Nohutcu, 2002). É encontrada em muitas células do periodonto incluindo osteoblastos, fibroblastos e neutrófilos (Shibata *et al.*, 1994). A diminuição do nível de fosfatase alcalina ao longo das exposições à fumaça de cigarro indica uma redução da formação óssea no grupo exposto à fumaça de cigarro. O nível da fosfatase alcalina sérica, que é um marcador de formação óssea, diminui quando a atividade osteoblástica é diminuída (Lafage *et al.*, 1995; Frolik *et al.*, 1996; Siris *et al.*, 1996; Tucci *et al.*, 1996; Sass *et al.*, 1997) o que confirma que a exposição à fumaça de cigarro indiretamente diminui a formação óssea.

No entanto, no presente estudo não houve uma correlação entre os dados histométricos e a expressão de ALP no grupo teste, pois a formação óssea só difere do controle aos 7 dias em todos os períodos observados, sendo que a expressão de ALP, marcador de formação óssea, é fortemente diminuída. Hoemann *et al.* (2008) fizeram uma análise comparativa de estudos osteogênicos *in vitro* usando células da calvária, linhagem celular derivada da calvária e células da medula óssea. Em todos os tipos celulares, a atividade de ALP tem uma progressão parecida ao longo do tempo por meio de uma variedade de meios osteogênicos e meios com condições de mineralização. Todavia, os níveis de atividade de ALP não foram proporcionais com os níveis de mineralização observados.

Igualmente, os níveis de RNA_m de ALP do atual trabalho, também não foram proporcionais à mineralização observada através da histometria no grupo teste. E talvez devêssemos analisar com mais cuidado o papel de ALP como marcador de formação óssea.

Já foi demonstrado previamente que o regime de exposições à fumaça de cigarros usado nesse estudo pode promover um nível sérico de cotinina diretamente correlacionado com os níveis obtidos de pacientes fumantes que consomem entre 10 e 20 cigarros por dia (Gonzalez *et al.*, 1996). No entanto, como existem diferenças anatômicas e fisiológicas entre ratos e humanos, principalmente em relação às suas idades cronológicas e biológicas, futuras comparações entre os achados do presente estudo e outros resultados obtidos de estudos com animais deveriam ser analisadas com cautela.

7 CONCLUSÃO

A inalação da fumaça de cigarros pode modular o padrão de reparo ósseo alveolar observado histometricamente, provavelmente devido ao efeito observado sobre a expressão de genes envolvidos nesse processo.

REFERÊNCIAS*

1. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. JADA 1960; 61:32-44.
2. Bahamonde ME, Lyons KM. BMP3: To be or not to be a BMP. J Bone Joint Surg 2001; 83A – Suppl 1:s1-56-s1-62.
3. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. Int J Oral Maxillofac Implants. 1993; 8(6):609-615.
4. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4 and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. PLoS Genet 2006; 2(12): e216.
5. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addition. N Engl J Med 1988; 319(20):1318-1330.
6. Benowitz NL. Health and public policy implications of the “low-yield” cigarette. N Engl J Med 1989; 320(24):1619-1621.
7. Bodner L, Kaffe I, Cohen Z, Dayan D. Long term effect of desalivation on extraction wound healing: a densitometric study in rats. Dentomaxillofac Radiol 1993; 22:195-198.
8. Bodner L, Kaffe I, Littner MM *et al.* Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 75:367-372.
9. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, *et al.* Differential expression of receptor activator of nuclear factor –B ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. J Periodont Res 2001; 42:287-293.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Boyce BF, Xing L. Osteoclasts, no longer osteoblast slaves. *Nature Medicine* 2006; 12(12):1356-1358.
11. Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21:805-813.
12. Broulik PD, Jarab J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. *Horm Metab Res* 1993; 25(4):219-2221.
13. Cattaneo V, Cetta G, Rota C *et al.* Volatile components of cigarette smoke: Effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 2000; 71:425-432.
14. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GM, Beppu OS, Saldiva PH. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Oct;30(10):1241-1247.
15. César-Neto JB, Benatti BB, Manzi FR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH. The influence of cigarette smoke inhalation on bone density. A radiographic study in rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2005; 19(1):47-51.
16. César-Neto JB, Benatti BB, Neto FH, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH. Smoking cessation may present a positive impact on mandibular bone quality and periodontitis-related bone loss: a study in rats. *J Periodontol.* 2005; 76(4):520-525.
17. César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati, Nociti FH Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006; 41(2):118-123.
18. César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Bone filling around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *J Periodontol.* 2005; 76(9):1476-81.
19. César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH. Bone filling around titanium implants may benefit from smoking cessation: A histologic study in rats. *J Periodontol* 2005; 76:1476-1481.

20. 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(10):1454-1459.
21. Daftari TK, Whitesides TE Jr, Heller JG, et al.; Nicotine on the revascularization of bone grafts. *Spine* 1994; 19:904.
22. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, *et al.* Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature Genetics* 2001; 27:84-88.
23. De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 1994; 5(4):260-264.
24. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54:1087-1091.
25. Devlin H, Sloan P; Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:641.
26. Devlin H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. *Cells Tissues Organs* 2000; 167:33-37.
27. Feitelson JB, Rowell PP, Roberts CS, Fleming JT. Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. *J Orthop Res* 2003; 21:497-502.
28. Fleisch H. New biphosphonates in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1993;2:15-22.
29. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP-7. *J Cell Biochem* 2000; 78: 476-486.
30. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. Time dependent-changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized

- rats: Effect of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. *Bone* 1996; 18:621-627.
31. Fung YK, Iwaniec U, Cullen DM, Akhter MP, Haven MC, Timmins P. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85:168-187.
 32. Gennaro AR. Remington farmacia. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana 1998; 19ª ed:3020.
 33. Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardim E. Serum cotinine levels, smoking and periodontal attachment loss. *J Dent Res* 1996; 75: 796-802.
 34. Gordon T. Factors associated with serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 187-190.
 35. Green LJ, Gong JK, Neiders ME. Relationship between Sr85 uptake and histological changes during healing in dental extraction wounds in rats. *Arch Oral Biol* 1969; 14: 865-872.
 36. Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43 (5):359-364. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43 (5):359-364.
 37. Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent*. 1996; 76(6):592-596.
 38. Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periododntol* 1991; 62(1):147-152.
 39. Haverstoch BD, Mandrachia VJ. Cigarette smoking and wound healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg* 1998; 31(1):69-74.
 40. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, Brewer PD, Chuang AH. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003; 74(10):1440-6.

41. Hoemann CD, *et al.* In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cells source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie* 2008, doi:10.1016/j.patbio.2008.06.004
42. Hollenbach KA, Barrett-Connor E, Edelstein SL, Holbrook T. Cigarette smoking and bone mineral density in older men and women. *Am J Public Health.* 1993; 83(9):1265-70.
43. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, *et al.*; Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294.
44. Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol* 1994; 39:425-428.
45. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000; 41:48-72.
46. Iwaniec UT, Fung YK, Cullen DM, Akhter MP, Haven MC, Schmid M. Effects of nicotine on bone and calcitropic hormones in growing female rats. *Calcif Tissue Int* 2000, 67:68-74.
47. James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999; 70:518-525.
48. 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(3):237-40
49. Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL, Goodacre CJ. Effects of smoking on implant success in grafted maxillary sinuses. *J Prosthet Dent.* 1999; 82(3):307-311.
50. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005; 16(2):155-62.

51. Katagiri T, *et al.* Skeletal abnormalities in doubly heterozygous BMP-4 and BMP-7 mice. *Dev Genet* 1998; 22: 340-48.
52. Kim KS, Yoon ST, Park JS, Li J, Park MS, Hutton WC. Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine. *J Neurosurg* 2003; 99: 291-7.
53. Klaassen CD. Agentes ambientais não-metálicos. Poluentes atmosféricos, solventes e vapores e pesticidas. *In*: Goodman LS. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana 1996; 9ª ed:1240-1257.
54. Lafage MH, Balene R, Battle MA, Shea M, Seedor JG, *et al.* Comparison of alendronate and sodium fluoride effect on cancellous and cortical bone in minipigs. *J Clin Invest* 1995; 95:2127-2133.
55. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 271-277.
56. Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ* 1997; 315:841-846.
57. 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.
58. Lee S-H, Rho J, Jeong D, Sul J-Y, Kim T, Kim N, *et al.* v-ATPase V₀ subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature Medicine* 2006; 12(12):1403-1409.
59. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(2): 64-81.
60. Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 345-350.

61. 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 Oct;76(10):1667-1674.
62. 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 monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med*. 2001; 137(3):208-219.
63. Lu B, Kerepesi L, Wisse L, Hitchman K, Meng QR. Cytotoxicity and gene expression profiles in cell cultures exposed to whole smoke from three types of cigarettes. *Toxicol Sci* 2007; 98: 469-478.
64. Lu H-K, Chen Y-L, Chang H-C, Li C-L, Kuo MY-P. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006; 41:354-360.
65. Lyons KM, *et al*. Colonization of BMP-7 and BMP-2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* 1995; 50: 71-83.
66. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: Principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 1377-1391.
67. 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 Oral Maxillofac Surg*. 1988; 26(5):402-409.
68. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:610-615.

69. Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: Impairment of digital blood flow and wound healing in hand. *Hand* 1977; 9: 97-101.
70. Motohashi M, Shirota T, Tokugawa Y, Ohno K, Michi K, Yamagushi A. Bone reactions around hydroxiapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87: 145-152.
71. Nakajima M, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 2000; 742: 211-215.
72. 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*. 2002; 17(3):347-52.
73. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000; 71(9): 1460-1464.
74. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an *in vivo* study. *J Periodontal Res* 2001; 36(6): 361-366.
75. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002; 73(9):982-987.
76. Ortego-Centeno N, Munoz-Torres M, Jodar E, Hernandez-Quero J, Jurado-Duce A, de la Higuera Torres-Puchol J. Effect of tobacco consumption on bone mineral density in healthy young males. *Calcif Tissue Int*. 1997; 60(6):496-500
77. Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxiapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 877-882.

78. Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, *et al.* The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts *in vitro*. J Periodontol 1993, 64: 658.
79. Pietrokovski J, Masslaer M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. J Prothet Dent 17: 21, 1967.
80. 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.
81. Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. J Periodon Res 2002; 37: 230-235.
82. 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.
83. 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; 59(5):318-325.
84. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. A review of the literature. J Periodontol 1990; 57: 617-624.
85. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Alcalóides de pirina-piridina. *In*: Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. São Paulo, Editorial Premier, 1997; 1^a ed:166-168.
86. Rosemberg J. Nicotina: Droga Universal. Organização Mundial da Saúde 2006.
87. Rosen PS, Marks MH, Reynolds MA. Influence of smoking on long-term clinical results of intrabony defects treated with regenerative therapy. J Periodontol 1996; 67(11):1159-1163.
88. Rota MT, Poggi P, Boratto R. Human gingival fibroblast cytoskeleton is a target for volatile smoke components. J Periodontol 2001; 72: 709-713.

89. Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, et al.; Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: A histologic study in dogs. *J Periodontol* 2004; 75: 565.
90. Sass DA, Bowman AR, Yuan Z, Ma Y, Jee WSS, Epstein S. Alendronate prevents cyclosporine A induced osteopenia in the rat. *Bone* 1997; 21:65-70.
91. Scabbia A, Cho KS, Sigurdsson TJ, Kim CK, Trombelli L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. *J Periodontol* 2001; 72(1):43-49.
92. Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J Foot Surg* 1990; 29(1):84-87.
93. Shibata Y, Yamashita Y, Miyazaki H, Ueno S, Takehara T. Effective method for discriminating between oral bacterial and human alkaline Phosphatase activity. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 35-39.
94. Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med* 1992; 93:22S-24S.
95. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chung R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
96. Siris E, Weinstein RS, Altman R, et al. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 961-967.
97. Smith N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. *Aust Dent J*, 1974; 19:250.
98. Solloway MJ, et al. Mice lacking BMP-6 function. *Dev Genet* 1998; 22: 321-39.
99. Sridhar S, Schembri F, Zeskind J, Shah V, Gustafson AM, et al. Smoking-induced gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium. *BMC Genomics* 2008; 9:259.

100. Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, *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 Sciences* 2006; 78:1733-1740.
101. Tanur E, McQuade MJ, McPherson JC, Al-Hashimi IH, Rivera-Hidalgo F. Effect of nicotine on strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol* 2000; 71:717-722.
102. Teitelbaum SL, Ross P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews/Genetics* 2003; 4:638-649.
103. Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2000; 289:1504-1508.
104. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, *et al.* Soluble receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand – osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102: 1064 – 1069.
105. Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine*. 2000; 25(20):2588-2594.
106. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1995; 22(3):229-234.
107. Tripton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995; 66(12):1056-1064.
108. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol* 2008; 35(7):630-639.
109. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, *et al.* BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetics* 2006; 38(12):1424-1429.

110. Tucci JR, Tonino RP, Emkey RD, Peverly CA, Kher U, Santora AC. Effect of three years of oral alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Am J Med* 1996; 101: 488-501.
111. Ueng SWN, Lee M-Y, Li AFY, Lin S-S, Tai C-L, Shih C-H. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: Experimental study on rabbits. *J Trauma* 1997; 42:231-238.
112. Ueng SWN, Lin S-S, Wang C-R, Liu S-J, Tai C-L, Shih C-H. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: Study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma* 1999; 46:110-115.
113. Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68(5):259-70.
114. WHO - (World Health Organization) Tobacco Free Initiative. [on line] Url: "<http://www.who.int/tobacco/research> 2008.
115. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol* 2008; 79:1514-1519.
116. Xiao Y-T, Xiang L-X, Shao J-Z. Bone Morphogenetic Protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362:550-553.
117. 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.
118. Zhang D, Fergusson CM, O'Keefe RJ, Puzas JE, Rosier RN, Reynolds PR. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 293-300.
119. Zheng L, Yamashiro T, Fukunaga T, Balam TA, Takano-Yamamoto T. Bone morphogenetic protein 3 expression pattern in rat condylar cartilage, femoral cartilage and mandibular fracture callus. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 318-325.

120. Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. Bone (2008).04.002.

ANEXOS

Anexo 1

Esquema de Rankl e OPG. Adaptado de Teitelbaum & Ross (2003)



Anexo 2

Tabela 1: Sequência dos “primers” utilizados, temperatura de anelamento e tamanho do produto.

Gene	Seqüência (5' → 3')	Amplificação [temperatura (°C)/ tempo (s)]	Tamanho do Produto (pb)
Gapdh	GCCTTCTCTTGACAAAGTG TGGTGATGGGTTTCCCG	95/0; 55/3; 72/6	163
Atp6v0d2	CACTGAACTGAGCAAAGAAGACA CTACGGCGTCAAACAAAGG	95/0; 55/3; 72/6	158
RANKL	AGCGCTTCTCAGGAGTT TACCAAGAGGACAGACTGACTTTA	95/0; 55/3; 72/6	151
OPG	AGTGAAGATAAGCTGCTTATAGTTAGG GCTGGAGGATCTTCATTCCC	95/0; 55/3; 72/6	151
ALP	CTCTTTGTAGAAGGAGGTCGTATTGA GAGTGGTCCGCAGTGAT	95/0; 55/3; 72/6	155
BMP-2	GTTTCCAGCACCGAATTAATATTATGA ATGGTTGGTGTGCCCT	95/0; 55/3; 72/6	176
BMP-3	AGACATCACTCAGCTCTTACG ACGCTTTCAGGCTCACAA	95/0; 55/3; 72/6	165
BMP-7	CAAGAAACACGAGCTGTATGTTAG GTTGATGAAGTGAACCAAGTGTC	95/0; 55/3; 72/6	165
Gapdh: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Atp6v0d2: v-ATPase V0 subunidade d2; RANKL: ligante ativador do receptor do fator-kappaB; OPG: osteoprotegerina; ALP: fosfatase alcalina; BMP: proteína óssea morfogenética			

Anexo 3



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

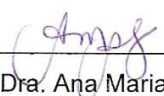
CERTIFICADO

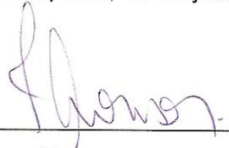
Certificamos que o Protocolo nº 1572-1, sobre "Influência da inalação da fumaça de cigarros sobre a expressão gênica durante o reparo ósseo alveolar. Estudo em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior / Ana Paula Oliveira Giorgetti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 10 de julho de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1572-1, entitled "Experimental study and genetic expression on wound healing of alveolar bone sockets after cigarette smoke inhalation 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 July 10, 2008.

Campinas, 10 de julho de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva