

MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DO EFEITO DA INALAÇÃO DA
FUMAÇA DE CIGARROS EM RATOS SUBMETIDOS AO
TRAUMA OCLUSAL PRIMÁRIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, área de concentração em Peridontia,

Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum.

**Piracicaba
2009**

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

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

C157a	<p>Campos, Mirella Lindoso Gomes. Avaliação histométrica do efeito da inalação da fumaça de cigarros em ratos submetidos ao trauma oclusal primário. / Mirella Lindoso Gomes Campos. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Antônio Wilson Sallum. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Periodonto. 2. Tabagismo. I. Sallum, Antônio Wilson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Histometric analysis of cigarettes smoke inhalation influence in rats submitted to primary occlusal trauma

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontium. 2. Smoking

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Marcelo Rocha Marques, Giuseppe Alexandre Romito, Antonio Wilson Sallum

Data da Defesa: 17-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



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 MIRELLA LINDOSO GOMES CAMPOS aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "A. Sallum", written over a horizontal line.

PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "G. Romito", written over a horizontal line.

PROF. DR. GIUSEPPE ALEXANDRE ROMITO

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Marques", written over a horizontal line.

PROF. DR. MARCELO ROCHA MARQUES

Para:

*Minha mãe, Marinalva Lindoso Gomes;
Meu pai, Manoel Honorato Gomes Neto (I.M.);
Meu marido, Érico Bruno Viana Campos.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, por ter me guiado durante estes anos, apaziguado meus pensamentos diante dos obstáculos supostamente intransponíveis e por ter concedido a paz necessária ao meu equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Garcia Rodrigues, coordenadora do curso de Clínica Odontológica e ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador dos cursos de Pós-graduação.

A meu orientador, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, pela oportunidade de ter trilhado estes primeiros passos dentro da minha formação acadêmica, por toda confiança em mim depositada, por todo o carinho e entusiasmo que fizeram mais simples alguns dos caminhos mais árduos desta jornada.

Aos professores da Periodontia da FOP: Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior e Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati pela importante contribuição na minha formação, pelo conhecimento, experiência e pelo senso ético.

Aos professores da minha banca de qualificação que, com suas sugestões, me ajudaram na conclusão desta etapa: Profa. Dra. Cristiane Salmon, Prof. Dr. Marcelo Mesquita e Prof. Dr. Sergio de Toledo.

Aos professores da minha banca de defesa que tão prontamente aceitaram contribuir com este trabalho: Prof. Dr. Giuseppe Romito e Prof. Dr. Marcelo Marques.

À Profa. Dra. Gláucia Ambrosano, pelo auxílio no tratamento dos dados estatísticos.

Aos bioteristas da FOP-UNICAMP Wanderley Vieira e Fábio, com quem aprendi tudo que sei sobre manejo e condução de animais experimentais, por todo auxílio e paciência durante estes anos.

À Eliete Aparecida F. de Lima, pela amizade, carinho, competência e dedicação indispensáveis ao longo desses anos; à amiga Lia, por ter feito toda a diferença na minha vida.

À Mariana Fugolin, pela amizade, pela retidão na condução das eventualidades e pelo grande auxílio no processamento histológico.

À Daniela Feitosa pelo auxílio no processamento histológico de parte desta pesquisa.

A meu pai (*i.m*), Manoel, sempre presente, por ter sido meu maior incentivador e meu maior exemplo de ética; por todo amor a mim dedicado em vida.

À minha mãe, Marinalva, exemplo de força e determinação, por sempre ter me apoiado e acreditado em mim; por ter entendido desde sempre que a saudade, muitas vezes, é necessária para que haja realizações; por seu amor incondicional, alicerce de minha vida.

A meu marido, Érico, pela cumplicidade, amor, paciência, doação, incentivo e companheirismo; por ter vivido minhas alegrias e tristezas; por conseguir apaziguar meu espírito com um simples olhar; por acreditar e compartilhar dos meus sonhos e da minha vida, fazendo-os possíveis.

À Mônica Grazieli Corrêa, amiga-irmã presente em todos os momentos da minha vida e com quem tenho trilhado há 4 anos os meandros da pós-graduação, obrigada por existir; por todo carinho, compreensão e amizade; obrigada por ter me ajudado na realização deste trabalho.

À Beatriz Bezerra, grande amiga, por nunca ter tido receio de compartilhar e ensinar; obrigada por ter me ajudado em tantos obstáculos; obrigada por sua amizade.

Ao grande amigo Ezymar Cayana, com quem tenho aprendido a acreditar mais, a me desprender mais e a rir mais; obrigada por toda sinceridade, companheirismo e amizade cruciais nesses anos.

Às minhas queridas amigas e companheiras de mestrado Fernanda Velasco, Ana Paula Giorgetti, Tatiana Meulmann e Mônica Corrêa, pessoas com quem tive o privilégio de aprender e compartilhar tantos momentos; nossa turma aprendeu o verdadeiro valor da união, o que tornou nossa caminhada mais branda.

Aos amigos que fizeram e fazem toda a diferença: Alberto Guerreiro, Andréia da Silva, Fabrícia Suaid, Marcelo Marques, Saulo Cabral e Thaisângela Gomes; obrigada por todo incentivo, amizade e carinho.

A todos os funcionários que direta ou indiretamente tornaram possíveis estes dois anos de formação.

A cabeça é como uma taça: pode estar cheia ou vazia. Se a cabeça estiver cheia com suas próprias idéias, todas as maravilhas do mundo serão inúteis: elas derramarão pela borda, como água que derrama pelas bordas de um copo já cheio. É preciso que haja vazios...

Rubem Alves

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da inalação da fumaça de cigarros (IFC) na reabsorção óssea da região de furca de 1^{os} molares inferiores induzidas por trauma oclusal primário (TO) a partir do aumento da dimensão vertical (DV) unilateral em ratos Wistar, assim como a influência do período de indução do TO. Noventa e seis animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos (N=32), segundo o tratamento, e cada grupo foi aleatoriamente dividido em 4 subgrupos (N=8), segundo o período de indução. Grupo 1 (TO+IFC): animais submetidos durante 8 minutos à IFC, 3 vezes/dia, por 7, 14, 21 ou 28 dias. Os períodos de indução do TO foram semelhantes àqueles da IFC. Grupo 2 (TO): subgrupos submetidos a 7, 14, 21 ou 28 dias ao TO. Grupo 3 (Controle Negativo): semelhantes períodos para obtenção de dados iniciais. Para detecção de diferenças, foi aplicado o ANOVA *two way*. Verificando-se diferenças, aplicaram-se os testes de Tukey para os tratamentos e o de Regressão Polinomial para os períodos de indução. Aos 7 dias verificou-se lesão por TO no grupo TO+IFC ($p \leq 0,05$); aos 14 observou-se lesão por TO nos grupos TO+IFC e TO ($p \leq 0,05$), com maior extensão em TO+IFC ($p \leq 0,05$); aos 21 dias houve manutenção da lesão em TO+IFC e TO ($p \leq 0,05$), já não se verificando diferenças significativas intergrupos; aos 28 dias verificou-se presença de lesão em TO+IFC ($p \leq 0,05$), com maior redução de sua extensão, e a manutenção da lesão em TO ($p \leq 0,05$), sem diferença intergrupos quanto sua extensão. A Regressão Polinomial mostrou resultados significativos entre os períodos de indução do grupo TO+IFC e do grupo TO ($p < 0,0001$). Pôde-se concluir que a IFC atua sinergicamente com o TO, causando uma maior reabsorção óssea em 7 e 14 dias e que o período de indução influi significativamente na reabsorção óssea da região de furca dos grupos TO+IFC e TO.

Palavras-chave: Lesões; trauma; oclusão; periodonto; tabagismo

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cigarette smoke inhalation (CSI) effect on bone resorption of 1st molars furcation submitted to primary occlusal trauma (OT) induced by unilateral vertical dimension augmentation (VD) in Wistar rats, as the influence of OT induction period, using parallel time of CSI. Ninety six animals were randomly assigned to one of 3 groups of 32 animals per group, based on treatment type, and each group was divided in 4 subgroups of 8 animals, based on period of treatment induction. Group1 (OT+IFC) animals were exposed 3 times per day of CSI, during 8 minutes each exposition during 7, 14, 21 or 28 days and the OT periods were paralleled to CSI. Group2 (OT): each subgroup was submitted to 7, 14, 21 or 28 days of OT induction. Group3 (Negative Control): equal period subgroups to baseline values. ANOVA two way was applied to detect differences. Verifying differences, Tukey test was applied to treatments and Polynomial Regression to induction periods. Tukey test was statistically significant ($p \leq 0,05$) in 7 days between OT+CSI and Negative Control (NC), 14 days between OT+CSI and OT and between them and NC, 21 days between OT and NC and between OT e NC and on 28 days between OT+CSI and NC and between OT and NC. Polynomial Regression showed statistically significant results between the different induction periods from OT+CSI group and from OT group ($p < 0,0001$). The results shows that CSI acts sinergically with OT on early periods, 7 and 14 days, and resorption is time dependent, significantly influencing furcation bone resorption on OT+CSI and OT.

Key words: Wounds; trauma; occlusion; periodontium; smoking

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 TABAGISMO	4
2.1.1 Estudos in vitro	10
2.1.2 Estudos in vivo	15
2.2 TRAUMA OCLUSAL	20
2.2.1 Estudos experimentais	25
2.2.2 Estudos clínicos	29
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.3 EXPOSIÇÃO À FUMAÇA	35
4.4 INDUÇÃO DO TRAUMA OCLUSAL	36
4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	37
4.6 ANÁLISE HISTOMÉTRICA	39
4.6.1 Reabsorção óssea inter-radicular	39
4.6.2 Calibração da examinadora	40
4.6.3 Avaliação dos dados	41
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO1 – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	64
ANEXO2 – CORRELAÇÃO INTRA-CLASSE	65
ANEXO 3 - LEITURAS DE REABSORÇÃO ÓSSEA	66

1 INTRODUÇÃO

O trauma oclusal e o tabagismo são condições que contribuem para que haja uma alteração da homeostase óssea alveolar. Há, portanto, a possibilidade de que essas condições atuem sinergicamente no processo de perda óssea alveolar de dentes não acometidos por doença periodontal, podendo o tabagismo levar a um prognóstico menos favorável quanto à manutenção dos dentes frente à injúria traumática.

Trauma oclusal, terminologia segundo posicionamento científico de Cortelli *et al.* descrito no Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontologia (2005), é o termo utilizado para descrever a lesão que ocorre no periodonto de inserção dos dentes (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) como consequência da aplicação de forças oclusais que excedam a capacidade adaptativa do mesmo. Trauma oclusal, portanto, não inicia ou agrava gengivite ou leva a formação de bolsas periodontais (Ramfjord & Ash Jr, 1981), perda de inserção clínica (Jin & Cao, 1992) e recessões gengivais (Harrel & Nunn, 2004), sabendo-se que a lesão causada restringe-se ao periodonto de inserção.

No trauma oclusal há aplicação de forças alternadas, não havendo tempo para que os tecidos de sustentação dos dentes sejam reparados, diferentemente do trauma do tipo ortodôntico. Há, portanto, um desequilíbrio na formação e na reabsorção óssea, assim como na remodelação das fibras do ligamento periodontal. Os fenômenos verificados durante a movimentação ortodôntica, distinguidos em zonas de pressão e de tensão (Stahl, 1978; Moraes *et al.*, 1999), convergem em um mesmo sítio no trauma oclusal, levando a reações teciduais semelhantes àquelas percebidas na zona de pressão, porém havendo um alargamento do ligamento periodontal em toda sua extensão na tentativa de adaptação fisiológica frente à demanda traumatogênica, resultando na mobilidade dental (Hallmon, 1999; Lindhe *et al.*, 2005). No trauma oclusal primário, as forças

oclusais são aplicadas em um dente ou grupo de dentes que apresentam o periodonto de inserção de altura normal, ou seja, nos elementos que não perderam estruturas de sustentação (The American Academy of Periodontology, 1999).

O tabagismo, por sua vez, tem se mostrado um importante marcador de risco e, possivelmente, um verdadeiro fator de risco para o desenvolvimento de doença periodontal (Bosco *et al.*, 2007; Tonetti, 1998; Genco, 1996; César-Neto *et al.*, 2004). Segundo a Organização Mundial da Saúde, há cerca de 1,1 bilhão de fumantes no mundo e essa população está aumentando, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2003).

A nicotina (*Nicotiana tabacum*) é uma das substâncias tóxicas presentes na fumaça do cigarro. Tem meia-vida curta de aproximadamente 30 minutos e é convertida em cotinina, seu metabólito primário. A nicotina é o componente da fumaça que mais tem sido relacionado com danos periodontais e pode ser encontrada, assim como a cotinina, na saliva e no fluido crevicular de fumantes (MCGUIRE *et al.*, 1989). A presença de nicotina na superfície radicular de dentes periodontalmente envolvidos, em fumantes, também foi relatada (CUFF *et al.*, 1989). A nicotina pode levar à inibição da proliferação de células ósseas e da síntese de matriz extracelular (Akmal *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2001), retardando, assim, a remodelação óssea (Ueng *et al.*, 1997; Hollinger *et al.*, 1999, Gullihorn *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Silcox *et al.* (1995) sugere que o osso neoformado, na presença de nicotina sistêmica, tem propriedades mecânicas inferiores. Acredita-se que a densidade óssea e o conteúdo mineral sejam menores em animais tratados com nicotina (Broulik & Jarab, 1993) e que esta substância promova o aumento da produção de norepinefrina endógena, que regula o fluxo sanguíneo basal no osso, causando a redução crônica do fluxo sanguíneo ósseo ou vasoconstrição (Feitelson *et al.*, 2003). Estudos histométricos em ratos demonstraram que injeções de nicotina aumentaram a perda óssea na região da furca de dentes submetidos à indução de doença periodontal (Nociti *et al.*, 2000 e 2001) e ao trauma oclusal (Nogueira-Filho *et al.*, 2004). Porém, estudos

realizados por Stefani *et al.* (2002) por e Nociti *et al.* (2002a) demonstraram que injeções de nicotina não interfiram na cicatrização óssea ao redor de implantes osseointegrados em tíbias de coelhos, o que sugere que outras substâncias importantes além da nicotina estariam envolvidas nos fenômenos que tangenciam o *turn-over* ósseo.

Além da nicotina, a fumaça de cigarro contém outras substâncias tóxicas como o monóxido de carbono e o cianeto de hidrogênio, que estão relacionadas a uma menor reparação tecidual (Silverstein, 1992; Haverstoch & Mandrachia, 1998), enquanto a acroleína e o acetaldéido parecem estar relacionados com a diminuição da proliferação e da adesão de células importantes para o processo de cicatrização (Cattaneo, *et al.*, 2000). Portanto, um modelo experimental no qual os animais fossem expostos a todas essas substâncias tóxicas expressaria com maior fidedignidade os fenômenos séricos e sistêmicos passíveis de acontecer em humanos tabagistas.

O trauma oclusal crônico ainda é um paradigma na clínica odontológica, pois há caráter de irreversibilidade da lesão óssea e, portanto, sua dinâmica deve ser melhor entendida isoladamente ou conjuntamente a fatores de risco que levem à ruptura da homeostase do osso alveolar. Sabendo-se que a nicotina e os demais componentes da fumaça do cigarro agem diretamente sobre o tecido ósseo, pacientes fumantes apresentariam risco potencializado de perda óssea frente ao trauma oclusal. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da inalação da fumaça de cigarros (IFC) no osso alveolar da região de furca de molares de ratos submetidos a períodos semelhantes de trauma oclusal primário (TO) por interferência oclusal unilateral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tabagismo

O tabagismo é um fator de risco para 6 das 8 principais causas de morte no mundo (WHO, 2008) e vem sendo considerado um problema de saúde pública não somente em países desenvolvidos, mas também naqueles em desenvolvimento, como o Brasil (Brasil, 2004). Fumantes têm 70% maior risco de morte por câncer, doença cardiovascular ou pulmonar, quando comparados a não-fumantes (Beckers & Camu, 1991).

Estima-se que a população tabagista seja cerca de 1,2 bilhão de pessoas (McCrary & Epstein, 1999) e só no Brasil o número de fumantes atinja 35 milhões de indivíduos (Marques *et al.*, 2001). No *Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis*, realizado entre 2002-2003 pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2004), foi observada uma maior prevalência de indivíduos tabagistas no grupo populacional com menor escolaridade. Foi observado, ainda, que em pessoas com idade maior ou igual a 15 anos, residentes em 15 capitais brasileiras e no Distrito Federal, a prevalência de tabagismo variou entre 12,9% e 25,2%, havendo prevalência de tabagismo no gênero masculino em todas as capitais, atingindo um valor total de 16,7 milhões, enquanto um total de 11,2 milhões de tabagistas do gênero feminino foi observado (Brasil, 2004).

Atualmente, estima-se que cerca de 4,9 milhões de morte por ano sejam provocadas devido ao consumo de tabaco (OMS, 2003) e que até 2020 esse número aumente para 8,4 milhões, sendo, pelo menos desses, 70% ocorridas em países em desenvolvimento (WHO, 2001). Percebeu-se, nas últimas décadas, uma redução percentual de tabagistas do gênero masculino nos países desenvolvidos e um aumento nos países em desenvolvimento. Quanto ao gênero

feminino, porém, pôde-se observar um aumento no número tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (WHO, 2001).

A fumaça dos cigarros é uma mistura complexa de gases e partículas provenientes da queima do tabaco, contendo mais de 4000 substâncias potencialmente tóxicas (Haverstoch & Mandracchia, 1998), incluindo 43 substâncias cancerígenas (U.S. Dept. of Health and Human Services, 1989). A fase gasosa é composta por monóxido e dióxido de carbono, nitrogênio, oxigênio, cianeto de hidrogênio, acroleína, acetaldeído, formaldeído (Silverstein, 1992). Na fase particulada encontram-se água, nitratos, nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos (Hanes *et al.*, 1991). A nicotina, por sua vez, é encontrada tanto na fase particulada quanto na fase gasosa. A nicotina livre, encontrada principalmente na fase gasosa, é a mais ativa, sendo rapidamente absorvida, o que intensifica o grau de dependência (Robertson & Richard, 1998). Dos 600 aditivos que a indústria emprega no tabaco a fim de torná-lo mais palatável, vários têm a função de liberar mais nicotina, sendo a amônia o mais importante (Kessler, 1994).

A nicotina é a razão primária pela qual a população fuma. Essa substância pode ser absorvida através da pele, das mucosas (estomacal e intestinal) e dos pulmões, sendo transportada pela corrente sanguínea. Chegando ao sistema nervoso central (SNC), atravessa a barreira hemato-encefálica e exerce seus efeitos em cerca de 7 segundos (Taylor, 1996; O'Brien, 1996). Cerca de 70% da nicotina inalada é metabolizada no fígado e, em menor proporção, nos pulmões e nos rins (Furtado, 2002). Sua distribuição nos tecidos é rápida e apresenta efeito cumulativo no organismo (Focchi, 2003).

O uso crônico da nicotina tem um efeito complexo no corpo humano, causando, quando de seu uso crônico, dependência psicológica e física (Benowitz, 1986; Robbers *et al.*, 1997), pois apresenta características neurobiológicas psico-estimulantes. Esse componente tóxico age, especialmente, sobre centros mesolímbicos, dopaminérgicos colinérgicos e *nucleus acumbens*, provocando aumento na produção de norepinefrina e na liberação de dopamina e

de outros hormônios psicoativos, levando à dependência pelas propriedades euforizantes e ansiolíticas (Rosemberg, s/d; Furtado, 2002). A Associação Americana de Psiquiatria classifica a nicotino-dependência como uma desordem mental de uso de substância psicoativa (American Psychiatric Association, 1980, 1987). Segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID 10) o tabagismo tem como principais categorias a Dependência de Nicotina (F17) e a Abstinência de Nicotina (OMS, 1993).

Benowitz & Hennigfield (1994) verificaram que a média de concentração da nicotina no sangue dos tabagistas dependentes é de 300ng por mililitro. Um cigarro produz no sangue concentração em torno de 14ng/ml, chegando a 70ng/ml nos que fumam cinco cigarros por dia. Desta forma, poderia se estimar níveis de 50 a 70ng/ml como mínimos para gerar dependência. Esses níveis correspondem à inalação diária de 4mg a 6mg de nicotina.

A nicotina é uma amina terciária composta de anéis de piridina e pirolidina e tem meia-vida curta (Rosemberg, 2004). Na *Nicotiana tabacum* encontram-se os estereoisómeros mais importantes farmacologicamente, como a anabasina, anabatina, nornicotina, miosina, N-metilanabasina nicotirina e a nornicotirina (Rosemberg, 2004). A Nornicotina e a anabasina possuem atividade semelhante à da nicotina (Rosemberg, 2004). O tipo do tabaco, o modo e a frequência das tragadas influem na quantificação desses alcalóides (Clark *et al.*, 1965, Grimes & Goddard, 1978). Os mais importantes metabólitos, quantitativa e qualitativamente, são a cotinina e o óxido-N-nicotina (Benowitz *et al.*, 1983; Benowitz, 1998).

Tanto a nicotina quanto a cotinina podem ser detectadas na urina, no sangue e na saliva. A detecção da nicotina é mais limitada, pois sua meia vida plasmática pós-inalação é de 30 a 60 minutos (Furtado, 2002), podendo chegar até 2 horas (Focchi, 2003). Já a meia vida plasmática da cotinina prolonga-se em média por 36 a 40 horas e às vezes até mais, podendo ser detectada muitas horas após a cessação do fumo (Armitage, 1965, Benowitz, 1998, Benowitz *et al.*, 1983). Em fumantes ativos ou passivos, os níveis de concentração de cotinina são

lineares com as quantidades de tabaco consumidas e com o grau de exposição à poluição tabágica ambiental pelos fumantes passivos (Armitage, 1965, Benowitz, 1998, Benowitz *et al.* 1983, Curvall *et al.* 1990, Davis *et al.* 1991, Feyerebend *et al.* 1985).

O Monóxido de carbono (CO) corresponde a cerca de 4% da fumaça de cigarro (Haverstoch & Mandracchia, 1998). É um gás tóxico inodoro, incolor, insípido e não-irritante que interfere no transporte de oxigênio sangüíneo e no seu aproveitamento. A afinidade da hemoglobina (Hb) pelo CO é cerca de 220 vezes maior do que pelo oxigênio (Klaassen, 1996). Mesmo em concentrações baixas de CO alveolar, fumantes apresentam níveis significativos de carboxihemoglobina (COHb) (5-15% em fumantes; 0,5 a 3% em não-fumantes), devido ao metabolismo da Hb e à poluição atmosférica (Beckers & Camu, 1991). O CO somente é eliminado através da respiração, compondo com a Hb uma ligação bastante estável, que pode ser detectada após o óbito do paciente (Klaassen, 1996). Esse conjunto de fenômenos, por reduzir a disponibilidade de oxigênio nos tecidos lesionados, pode interferir diretamente no reparo tecidual (Sherwin & Gastwirth, 1990).

O cianeto de hidrogênio é uma substância incolor e altamente tóxica presente na fumaça do cigarro. Foi utilizado na II Guerra Mundial como agente genocida (Martin, 2008) e é também usado como inseticida. Quando absorvido, reage com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria. A respiração celular é então inibida, resultando em acidose láctica e hipóxia citotóxica (Klaassen, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular podem prejudicar o processo de reparo dos tecidos (Mosely & Finseth, 1977)

Os aldeídos, componentes voláteis presentes na composição da fumaça de cigarros, são hidrocarbonetos formados a partir da combustão incompleta do tabaco e por oxidação pela luz solar (Klaassen, 1996). O acetaldeído, produto inicial da oxidação do etanol, e a acroleína, importante metabólito da ciclofosfamida (Brock, 1976), são potentes substâncias tóxicas, mesmo quando em pequenas quantidades (Huber *et al.*, 1991). Tais aldeídos mostraram-se

citotóxicos e genotóxicos em culturas de células bronquiais humanas e fibroblastos (Grafstrom *et al.*, 1994).

O tabagismo pode levar a diversas afecções como câncer de pulmão, acidentes vasculares cerebrais, aneurismas, doença arterosclerótica, úlceras, osteoporose, bronquite, redução do peso fetal, antecipação da menopausa, descolamento prematuro de placenta, sangramentos e aborto, entre outros (Orleans & Slade, 1993).

Em Odontologia, o tabagismo tem sido relacionado a diversos eventos negativos tais como: fator de risco para câncer bucal (Cruz *et al.*, 2002), maior severidade e incidência de doença periodontal (Kerdvongbundit & Wikesjo, 2002), menor ganho de inserção após terapia periodontal (Scabbia *et al.*, 2001), 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). Dentre esses eventos, destaca-se a influência do tabagismo sobre a doença periodontal, uma das patologias mais freqüentes em indivíduos adultos, e sobre o prognóstico dos implantes de titânio, uma vez que essa opção terapêutica é relativamente nova e tem sido amplamente utilizada como solução protética nos dias de hoje. Embora alguns estudos clínicos e histológicos já tenham relatado associações entre consumo de cigarros e uma maior severidade da doença periodontal e piores taxas de sucesso de implantes osseointegráveis, pouco foi estudado sobre a inter-relação do tabagismo com injúrias não-infecciosas do periodonto de inserção.

A fumaça ambiental de cigarros (FAC) é um dos principais contribuintes para o aumento da concentração e da exposição a partículas em ambientes fechados. É composta por uma mistura da fumaça produzida pela combustão do tabaco e por aquela exalada pelos fumantes. Comprovadamente, muitos de seus compostos químicos são tóxicos ou cancerígenos e sua inalação pode causar vários danos à saúde (Nazaroff & Klepeis, 2004; WHO, 2000). O ar poluído pela

FAC contém, em média, três vezes mais nicotina, três vezes mais monóxido de carbono, e até cinquenta vezes mais substâncias cancerígenas do que a fumaça que entra pela boca do fumante depois de passar pelo filtro do cigarro (INCA, 2008).

Estima-se que existam cerca de 2 bilhões de fumantes passivos no mundo, dos quais 700 milhões são crianças (Organización Panamericana de Salud, 2000). É comprovado que não existem níveis seguros de exposição à FAC e que mesmo contato por curtos períodos é capaz de desencadear lesões cardiovasculares e contaminação expressiva por substâncias cancerígenas entre não-fumantes.

A exposição à FAC pode causar doenças cardíacas, observando-se inflamação e alterações agudas no endotélio, vasoconstrição e aumento da capacidade de agregação das plaquetas. Isso pode desencadear manifestações agudas de doenças cardiovasculares, como infarto e trombozes, principalmente em pessoas que já sofrem de síndromes coronarianas agudas (Raupach *et al.* 2006). Os efeitos da FAC sobre o sistema cardiovascular geram riscos proporcionalmente altos para uma baixa exposição e são comparáveis ao tabagismo crônico, equivalente aos riscos de fumantes ativos consumidores de um a nove cigarros por dia (Pitsavos *et al.*, 2002, Barnoya *et al.*, 2005). Pode-se verificar, ainda, doenças pulmonares em adultos e uma piora nos riscos de infecções respiratórias agudas, otites médias, asma brônquica e problemas no desenvolvimento pulmonar em crianças, principalmente nas asmáticas. Verifica-se, também, o aumento do risco de morte súbita infantil e, em grávidas, a exposição está relacionada à diminuição do peso do recém-nascido. Há evidências de que a FAC esteja relacionada ao câncer nasal e há comprovada relação entre exposição e morbidade/mortalidade por câncer de pulmão e doenças cardiovasculares (WHO, 2007).

Substâncias cancerígenas como NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona), carcinógeno pulmonar específico do tabaco encontrado na urina de tabagistas, são detectadas na urina de não fumantes imediatamente após o

contato com a FAC e sua concentração aumenta em 6% por cada hora de exposição (Stark *et al.*, 2007). Segundo Seelig *et al.* (2005), uma exposição média a $75\mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas suspensas respiráveis da FAC, durante oito horas por dia, 260 dias por ano, ao longo de 40 anos (convivência contínua com fumantes, exposição profissional ou doméstica) corresponde a um risco de uma morte em mil por câncer de pulmão e de uma em cem por doenças cardiovasculares.

Estudos vêm sugerindo que a fumaça de cigarros pode levar a destruição tecidual devido a seus efeitos tóxicos diretos ou agindo indiretamente, sendo responsável pela iniciação da resposta inflamatória.

2.1.1 Estudos *in vitro*

Ramp *et al.* (1991) estudaram o efeito da nicotina sobre culturas de células do 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-colagênicas e os autores observaram uma estimulação da síntese de DNA.

Fang *et al.* (1991) examinaram os efeitos da nicotina sobre a proliferação de osteoblastos e sobre a atividade de fosfatase alcalina. Observaram que a nicotina inibiu a proliferação celular e estimulou, de forma dose-dependente, a atividade de fosfatase alcalina.

Yuhara *et al.* (1999) estudaram o efeito da nicotina sobre o metabolismo ósseo. Para tanto, os autores avaliaram culturas de células osteogênicas clonais da calvária de ratos (ROB-C26) e de células pré-osteoblásticas da calota de camundongos (MC3T3-E1), assim como células do tipo osteoclasto formadas durante a co-cultura de células da medula de camundongos e células clonais do estroma da medula de camundongos (ST2). A nicotina estimula, de forma dose-dependente, a proporção dos depósitos de cálcio através das células ROB-C26, assim como a atividade de fosfatase alcalina dessas células. Porém, ambas as

atividades mostraram-se reduzidas nas células MC3T3-E1 quando expostas à nicotina. Esses resultados demonstram que a nicotina afeta a diferenciação osteoblástica em células tipo osteoblasto. A nicotina reduz, de forma dose-dependente, a formação de células TRAP-positivas e a formação de buracos em discos de dentina, ambas características típicas de osteoclastos. Os resultados dos autores sugerem que a nicotina exerce efeitos significativos no metabolismo de osteoblastos e osteoclastos cultivados.

Liu *et al.* (2001) estudaram o comportamento de células osteoprogenitoras, colhidas por aspiração do osso medular da crista do íliaco, de 3 doadores saudáveis, em meios expostos a extratos da fumaça de cigarros (EFC). As células osteoprogenitoras foram separadas, isoladas e cultivadas em culturas de gel mono ou tridimensional de colágeno tipo I. Em ambas as culturas, através de suplementos osteogênicos, as células osteoprogenitoras poderiam ser estimuladas a se diferenciarem em células tipo osteoblasto. Os autores observaram que EFC inibiu a proliferação de células osteoprogenitoras incubadas em condições controle e naquelas incubadas na presença de suplementos osteogênicos em uma concentração dose-dependente. EFC foi capaz de inibir a diferenciação, monitorada pela atividade da fosfatase alcalina e pelo acúmulo de cálcio. Observaram, também, que os efeitos inibitórios observados na cultura do gel mono-dimensional foram mais pronunciados do que no gel tri-dimensional. Os efeitos observados foram reversíveis, mostrando que a inibição celular não foi desencadeada por toxicidade não-específica ou morte celular. Os mesmos efeitos foram observados quando usadas células do tipo osteoblasto obtidas de osteosarcomas.

Gullihorn *et al.* (2005) estudaram *in vitro* o efeito de diferentes doses de nicotina e de extrato condensado de fumaça de cigarro em células MC3T3-E1 tipo osteoblastos. Os autores verificaram variações no grau de resposta entre os preparos celulares. A nicotina estimulou de forma dose-dependente o metabolismo ósseo celular de todas as amostras, sendo detectado a partir do aumento dos níveis de atividade de fosfatase alcalina e aumento no total de proteínas e de

síntese de colágeno. As respostas foram verificadas já em baixas concentrações de nicotina (12,5ng/ml, metade da nicotina circulante encontrada em pacientes fumantes). Os preparos com extrato condensado de fumaça de cigarros que possuíam concentrações semelhantes de nicotina reduziram a todos os níveis de atividade metabólica, mostrando efeito inibitório. Os autores especulam em sua conclusão que o retardo observado na cicatrização clínica de traumas esqueléticos em pacientes fumantes pode ser em parte resultado da absorção de outros componentes do cigarro além da nicotina.

Tanaka *et al.* (2006) avaliaram o efeito da nicotina e do lipopolissacarídeo (LPS) sobre a expressão do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), da osteoprotegerina (OPG) e da prostaglandina E2 (PGE2) em osteoblastos e o efeito indireto da nicotina e do LPS de bactérias GRAM negativas sobre a formação de osteoclastos. Os osteoblastos humanos foram tratados somente com nicotina e com nicotina associada à LPS. A expressão gênica e protéica de M-CSF e OPG foram determinadas por PCR *real-time* e ELISA, respectivamente. A expressão de PGE2 foi determinada por ELISA. A expressão de osteoclastos foi estimada pelos níveis de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRAP) e pelo receptor solúvel do ativador NF-Kappa (RANKL). A expressão de M-CSF e PGE2 aumentou em células cultivadas com nicotina e LPS, quando comparadas com as que foram cultivadas apenas com nicotina. A expressão de OPG aumentou no estágio inicial da cultura com nicotina e LPS, mas diminuiu no estágio final. O meio contendo M-CSF e PGE2 produzido pelos osteoblastos humanos tratados com nicotina e RANKL solúvel, aumentou a marcação de osteoclastos TRAP positivos, comparados com aquele produzido pelo tratamento somente com nicotina. Os resultados sugerem que a nicotina e o LPS estimulam a formação de osteoclastos por meio de um aumento na produção de M-CSF e PGE2 e essa associação produz um maior estímulo quando comparado o efeito da nicotina isolada.

Kamer *et al.* (2006) investigaram duas formas pelas quais o tabaco poderia influenciar no metabolismo ósseo: proliferação de osteoblastos induzida

por nicotina e a secreção de citocinas induzida pela nicotina observada nos osteoblastos. Os autores usaram nesse estudo dois modelos de células osteoblásticas, um derivado do osso da calvária de camundongos e o outro de osteoblastos humanos. Ensaio imunes foram usados para avaliar a proliferação celular e a secreção de interleucina 6 (IL-6) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os resultados revelaram que a nicotina induziu estimulação e inibição nos dois modelos de células. Nos osteoblastos humanos, os efeitos proliferativos e inibitórios foram doador-dependentes. A secreção de IL-6 mostrou diferentes padrões nos diferentes tipos celulares. Nos osteoblastos originários de camundongos, a nicotina aumentou significativamente a secreção de IL-6. Nos osteoblastos humanos, as células derivadas de um dos indivíduos não responderam à nicotina. No entanto, na segunda amostra a nicotina aumentou a secreção de IL-6 e o tratamento com estradiol não inibiu o efeito da nicotina. Nessas células, a nicotina ainda induziu um aumento na secreção de TNF- α . Os resultados sugerem que a nicotina afeta o metabolismo ósseo modulando a proliferação celular e a secreção de IL-6 e TNF- α e ainda constitui uma possível explicação para as diferenças na taxa de perda óssea entre indivíduos tabagistas que recebem terapia de reposição hormonal.

Alguns estudos têm sido realizados a fim de investigar os efeitos da fumaça de cigarro e seus componentes sobre os fibroblastos, cuja função é crítica no metabolismo do tecido conjuntivo e na reparação tecidual.

Tipton & Dabbous (1995) estudaram o efeito da nicotina na proliferação de fibroblastos gengivais de indivíduos saudáveis e sem inflamação gengival, na produção de fibronectina e no *turnover* do colágeno tipo I. Os autores verificaram que a nicotina em concentrações maiores que 0,075% causa morte celular e em concentrações de 0,075-0,05% causa vacuolização transitória dos fibroblastos. Em concentrações de 0,001-0,075% a nicotina inibe a proliferação de fibroblastos significativamente. A produção de fibronectina e de colágeno tipo I foi significativamente inibida em concentrações $\geq 0,05\%$ e concentrações $\geq 0,025\%$ de nicotina foram capazes de aumentar significativamente a atividade de

colagenase. Os resultados desse estudo sugerem que mesmo em baixas quantidades, a nicotina consumida no tabaco é capaz de aumentar a destruição gengival nos pacientes fumantes com gengivite.

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

Giannopoulou *et al.* (1999) mostraram os efeitos adversos da nicotina sobre várias funções dos fibroblastos do ligamento periodontal. Os autores avaliaram o efeito de concentrações variadas de nicotina (5ng a 250µg/ml) sobre proliferação, inserção, produção de fosfatase alcalina e quimiotaxia. Foi verificada uma inibição dose-dependente da proliferação celular em concentrações ≥ 100 ng/ml. Resultados semelhantes foram verificados com relação à adesão das células na superfície plástica, sendo mais nítido após 6 horas de incubação. A atividade de fosfatase alcalina e a quimiotaxia decresceram significativamente de maneira concentração-dependente. Os resultados sugerem explicar em parte o aumento da incidência e da severidade da doença periodontal crônica em fumantes.

Cattaneo *et al.* (2000) avaliaram os efeitos de dois aldeídos encontrados na fumaça do cigarro: acetaldeído e acroleína. Cultivaram fibroblastos gengivais de pacientes sem sinais de inflamação gengival e incubaram as células na presença de diferentes concentrações desses aldeídos, avaliando as amostras após 3 horas e após 5 dias. A acroleína e o acetaldeído provocam uma inibição da adesão e da proliferação celular dose-dependentes. O efeito citotóxico, porém, foi revertido em média 3 dias após a remoção das substâncias.

Rota *et al.* (2001) avaliaram o efeito de componentes da fase volátil da fumaça de cigarro, acroleína e acetaldeído, sobre o citoesqueleto de fibroblastos

gingivais (FG). Para tanto, foram utilizados FG obtidos de indivíduos saudáveis com gengiva não inflamada. As células foram incubadas em 3 diferentes concentrações de acroleína e acetaldeído. Os autores verificaram que ambas as substâncias produziram efeitos similares, resultando numa inibição da adesão dos FG de forma dose-dependente. O dano ao citoesqueleto consistiu na alteração da forma celular. Os resultados sugerem que a acroleína e o acetaldeído dificultam a adesão celular em função de sua capacidade de ligação ao citoesqueleto.

Gamal & Bayomy (2002) cultivaram fibroblastos do LP de pacientes fumantes e com doença periodontal. Os autores cultivaram as células nos segmentos radiculares dos dentes extraídos e verificaram que as amostras de fibroblastos dos grupos que fumavam até 19 cigarros por dia e 20 ou mais cigarros mostraram-se menos aderidas à superfície da raiz quando comparada com os grupos controle positivo e não-fumantes.

2.1.2 Estudos *in vivo*

O tabagismo é considerado um fator de risco verdadeiro para o desenvolvimento da doença periodontal (Bosco *et al.*, 2007; Tonetti, 1998; Genco, 1996; César-Neto *et al.*, 2004). Existe na literatura uma relação clara entre severidade e extensão da doença periodontal e a influência direta do tabagismo no agravo dessa condição. Autores mostraram, em estudos clínicos, que pacientes fumantes e com doença periodontal possuem reabsorção óssea alveolar mais extensa e severa (Grossi *et al.*, 1995; Norderyd & Hugoson 1998), bolsas periodontais mais profundas e maior número de dentes com envolvimento de furca (Johnson & Bain, 2000; Peterse, 2003a) e apresentam maior perda de inserção clínica do que quando comparados a indivíduos não-fumantes e ex-fumantes, sugerindo, ainda, uma ação local dos cigarros, sendo os sítios mais acometidos a lingual dos dentes superiores e os dentes inferiores (Haffajee & Sockransky, 2001). Porém, estudos quanto ao mecanismo de ação dos cigarros sobre as

estruturas do periodonto, interferência no metabolismo desses tecidos e na resposta imune dessas estruturas enquanto da verificação da saúde periodontal são ainda pouco elucidadas.

Modelos animais têm sido propostos para avaliação histológica e celular das interações da IFC na resposta tecidual.

Terashima *et al.* (1997) estudaram o efeito da inalação da fumaça de cigarros (IFC) em coelhos sobre a taxa de produção e a disponibilização de leucócitos polimorfonucleares (PMN) da medula óssea até a circulação sangüínea periférica. Os animais foram expostos a IFC por 2 semanas. Os autores usaram para marcação celular 5-bromo-2-deoxiuridase, marcando-as em sua divisão. Os resultados mostraram que a exposição crônica a IFC promoveu uma redução significativa do tempo de trânsito dos PMN através da medula para a circulação periférica ($p < 0,001$) pela redução do tempo no trânsito da fase pós-mitótica ($p < 0,001$). Porém, tanto nos *pools* mitótico e pós-mitótico, observaram-se aumentos significativos no número de PMN. Os autores concluem que essas mudanças contribuem para a observação de leucocitose em fumantes.

Vanscheeuwijcka *et al.* (2002) avaliaram o potencial de toxicidade da inalação da fumaça principal da mistura dos cigarros com (teste) ou sem adição (controle) de ingredientes ao tabaco. No total, 333 ingredientes, utilizados comumente no manufaturamento de cigarros foram avaliados e distribuídos em 3 grupos diferentes. Dentre os ingredientes, foram estudados flavorizantes, corantes, mentol e invólucros. Cada grupo de ingredientes foi introduzido em baixa e alta dose para que os testes de toxicidade fossem realizados. Os autores não observaram quaisquer alterações da toxicidade da fumaça dos cigarros inalada pelos animais, mesmo com adição de altas doses dos ingredientes, quanto à produção de enzimas hepáticas ou quanto a desordens hematológicas, como redução de leucócitos. Os dados indicam que a adição desses 333 ingredientes comumente usados na indústria de tabaco não foi capaz de alterar a toxicidade da fumaça produzida pelos cigarros.

Benatti *et al.* (2005) estudaram histometricamente o impacto da IFC e da administração de nicotina injetável (NI) no processo de cicatrização periodontal na ausência de biofilme em ratos em que se confeccionaram defeitos do tipo fenestração, havendo exposição radicular e raspagem do cimento e do ligamento periodontal. Os autores dividiram 42 animais em 3 grupos: Grupo 1 (n=14), controle; Grupo 2 (n=14), com injeções subcutâneas de nicotina, 2 vezes por dia; Grupo 3 (n=14), com 3 exposições diárias à IFC, durante 8 minutos cada. Os defeitos foram criados após 30 dias prévios de IFC ou NI. O período experimental foi de 51 dias. Os autores verificaram que o grupo IFC foi associado a uma menor densidade óssea e a um menor preenchimento ósseo quando comparado ao grupo controle e NI, concluindo que a IFC reduz a capacidade de cicatrização periodontal.

César-Neto *et al.* (2006) avaliaram histometricamente a influência da inalação da fumaça de cigarros (IFC) sobre o osso alveolar da região de furca de ratos. Os autores utilizaram 60 animais, aleatoriamente divididos em um dos grupos: Grupo 1 (n=15) animais que não foram submetidos a IFC durante o período experimental; Grupo 2 (n=13) animais expostos a 2 meses de IFC; Grupo 3 (n=16) animais submetidos a 3 meses de exposição à IFC e 2 meses subsequentes sem exposição; Grupo 4 (n=16) animais submetidos a 5 meses de exposição à IFC. Os animais foram submetidos à IFC 3 vezes por dia, por períodos de 8 minutos em cada exposição. Os dados obtidos demonstraram que os animais que foram expostos continuamente a IFC apresentaram uma menor proporção de tecidos mineralizados (grupos 2 e 4) quando comparados aos animais dos grupos controle e suspensão da IFC (grupos 1 e 3). Níveis semelhantes de tecido mineralizados foram observados nos animais dos grupos 1 e 3, mostrando que a interrupção da exposição à IFC traz benefício à mineralização tecidual.

El-Zawawy *et al.* (2006) testaram a hipótese que a IFC atrasa a condrogênese após aplicação de um modelo de fratura de tíbia em ratos. Os animais foram expostos a IFC de 2 cigarros sem filtro por dia, iniciando 30 dias

prévios a confecção da fratura óssea e continuando segundo os períodos de sacrifício de cada grupo. Os animais foram sacrificados 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. O grupo exposto à IFC exibiu, no dia 7, uma redução na coloração para colágeno tipo II, quando comparado ao grupo controle. A partir do dia 14, houve uma reversão desses resultados, havendo uma maior expressão de colágeno tipo II no grupo exposto à IFC. Quanto à coloração para antígenos nucleares de células proliferativas, no dia 7, foram notados os mesmo valores quantitativos para ambos os grupos, mas mudanças celulares qualitativas foram observadas, mostrando-se maiores as células do grupo exposto à IFC. No dia 14 eram verificadas comumente essas células no grupo exposto à IFC, enquanto no grupo controle elas eram raras. Histologicamente e histometricamente, os autores verificaram que o calo ósseo observado nos animais expostos à IFC do grupo 7 dias era menor e com menos matriz cartilaginosa comparada ao controle; no dia 14, a condrogênese era mais evidente no grupo exposto à IFC e maiores quantidades de osso foram verificadas no grupo controle. Aos 28 dias, análise radiográfica mostrou uma maior extensão do calo ósseo nos animais expostos à IFC. Os resultados sugerem que os animais expostos à IFC sofrem um atraso na remodelação óssea quando comparados ao grupo controle.

Estudos radiográficos em humanos têm sido propostos para avaliação da influência do tabagismo nas estruturas ósseas.

Bergström *et al.* (1991) avaliaram radiograficamente, a partir da técnica interproximal, a influência do tabagismo na altura da crista alveolar de pacientes com saúde periodontal. Os autores avaliaram a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até o septo interdental (SI). Duas radiografias foram realizadas, uma no *baseline* e outra 3 anos após. Os dados obtidos mostraram que a distância da JCE ao SI foi significativamente maior nos pacientes fumantes e que parecia haver um efeito dose-dependente. Os autores concluíram que a reabsorção óssea observada em fumantes não estava correlacionada à infecção por biofilme.

Ward & Klesges (2001) fizeram uma metanálise de 86 estudos transversais e prospectivos em humanos que relatavam quantitativamente medidas ósseas (raios-x, absorpiometria ou tomografia computadorizada), objetivando determinar a magnitude e os mediadores de associação entre tabagismo e massa óssea (vertebral, quadril, antebraço e calcâneo). Pacientes fumantes apresentaram significativamente maior redução de massa óssea que os não-fumantes e os ex-fumantes em todos os sítios ósseos avaliados, observando-se um pronunciamento quando as comparações foram realizadas no osso do quadril. Os efeitos mostraram-se de forma dose-dependente e maiores no gênero masculino e em idosos, além de sugerirem que a suspensão do hábito tem uma influência positiva na massa óssea.

Baljoon *et al.* (2004) realizaram um estudo com radiografias periapicais de uma mesma população em um intervalo de 10 anos, avaliando a presença e a extensão de reabsorção óssea vertical, avaliando uma possível associação com o tabagismo. Os autores verificaram uma prevalência de defeitos verticais em 1982 de 47% para fumantes, 49% ex-fumantes e 24% não-fumantes. Em 1992, as prevalências foram de 42%, 28% e 19% para fumantes, ex-fumantes e não-fumantes, respectivamente. Em ambas as avaliações, a prevalência foi significativamente maior em fumantes. A severidade dos defeitos verticais, após o controle para idade, também foi significativamente associada ao tabagismo. Os autores concluíram que risco associado ao tabagismo aumentou significativamente de 1982 para 1992.

Rosa *et al.* (2008) avaliaram o efeito do tabagismo no osso alveolar de adultos jovens por meio de radiografias digitais pela técnica *bitewing*. Foram incluídos 81 alunos de Odontologia que não apresentavam periodontite, dos quais 42 eram fumantes. Quanto aos critérios clínicos avaliados, os autores verificaram que o índice de placa, o índice gengival, nível de inserção clínica e recessão gengival foram significativamente maiores nos fumantes. Os indivíduos fumantes apresentaram valores significativamente reduzidos quanto à análise densiométrica de imagem no *baseline*, 180 dias, 365 dias e 545 dias, decrescendo durante os

períodos avaliados. Através de subtração radiográfica, verificou-se que os pacientes fumantes apresentaram média percentual significativamente reduzida de sítios com diminuição da densidade óssea. Em fumantes, esses sítios com densidade reduzida aumentaram significativamente nas avaliações feitas em 365 e 545 dias. Os autores concluem que o tabagismo exerce efeitos clínicos periodontais na altura e na densidade óssea alveolares, atuando como um fator de risco potencial na reabsorção óssea, mesmo que em pacientes novos e com baixo consumo de cigarros.

Saldanha *et al.* (2006) investigaram radiograficamente o efeito do consumo de cigarros nas dimensões de processos alveolares maxilares de sítios submetidos a exodontias. As radiografias foram realizadas 7 e 180 dias pós-cirurgia. Seis meses após a intervenção, a avaliação intra-grupo mostrou que ambos os grupos apresentaram redução significativa na altura do processo alveolar. O grupo de pacientes fumantes apresentou redução significativa na densidade, espessura e extensão óssea apical pré-existente. Na avaliação intergrupo, foram verificados valores significativamente menores com relação à densidade e extensão óssea apical pré-existente no grupo de pacientes fumantes. Os autores verificaram que houve uma redução dimensional significativa no rebordo alveolar e que há um atraso no processo cicatricial do alvéolo pós-exodontia em fumantes.

2.2 Trauma Oclusal

Trauma oclusal ou, como definido segundo posicionamento científico de Cortelli *et al.* descrito no Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontologia (2005), trauma oclusal é o termo utilizado para descrever a lesão que ocorre no periodonto de inserção dos dentes (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) como conseqüência da aplicação de forças oclusais que excedam a capacidade adaptativa do mesmo. Outras denominações terminológicas podem,

ainda, ser encontradas na literatura: oclusão traumática; oclusão traumatogênica; traumatismo periodontal; sobrecarga (Lindhe *et al.*, 2005).

Distinguem-se dois fenômenos no periodonto de inserção frente à força oclusal (Stahl,1978; Moraes *et al.*, 1999), sendo o ligamento periodontal e o osso alveolar os dois tecidos do periodonto de sustentação mais envolvidos (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 – Características das zonas de pressão (Fonte: Stahl, 1978; Moraes *et al.*, 1999).

ZONA DE PRESSÃO
Ligamento Periodontal
<ul style="list-style-type: none">▪ Diminuição do calibre dos vasos▪ Deslocamento dos vasos para a superfície óssea▪ Diminuição do número de fibroblastos▪ Redução do metabolismo celular, porém sem haver sua supressão▪ Desarranjo das fibras principais do ligamento periodontal na porção média e mais próxima ao osso▪ Fibras de Sharpey do cimento regulares▪ Se não houver tempo para remodelação periodontal quando da aplicação das forças, há obliteração dos vasos e ocorre o processo de hialinização e necrose das fibras periodontais, vasos, matriz e células, não permitindo que haja uma adaptação histofuncional do periodonto
Osso Alveolar
<ul style="list-style-type: none">▪ Migração de osteoclastos para a superfície do osso alveolar (reabsorção óssea direta)▪ Aumento da atividade metabólica dos osteoclastos (Figura 3)▪ Se não houver tempo para remodelação periodontal quando da aplicação das forças ocorre reabsorção óssea indireta, havendo proliferação de osteoclastos nos espaços medulares devido a menor pressão, levando a um “socavamento” ósseo, conhecido como reabsorção óssea indireta ou minante.
Cimento
<ul style="list-style-type: none">▪ Reabsorção frente à hialinização

Tabela 2 – Características das zonas de tensão (Fonte: Stahl, 1978; Moraes *et al.*, 1999).

ZONA DE TENSÃO
Ligamento Periodontal
<ul style="list-style-type: none">▪ Aumento do calibre dos vasos▪ Deslocamento dos vasos para a porção média do ligamento periodontal▪ Aumento do número de fibroblastos▪ Aumento do metabolismo celular, principalmente junto ao lado ósseo▪ Distensão das fibras do ligamento periodontal
Osso Alveolar
<ul style="list-style-type: none">▪ Aumento do número de osteoblastos▪ Aumento da atividade metabólica dos osteoblastos▪ Aposição óssea
Cimento
<ul style="list-style-type: none">▪ Por vezes, ocorre aposição de cimento

Dos três componentes do periodonto, como acima observado, o osso alveolar e o ligamento periodontal são os tecidos que mais sofrem remodelação. Graças aos fenômenos descritos, ocorre a remodelação periodontal, havendo constante reinserção das fibras de Sharpey frente às demandas mecânicas, o que permite a manutenção da articulação dento-alveolar quando mantida a homeostase funcional. No trauma oclusal, porém, são aplicadas forças alternadas, não havendo tempo para que os tecidos de sustentação sejam reparados, diferentemente do trauma do tipo ortodôntico. Há um desequilíbrio na formação e na reabsorção óssea, assim como na remodelação das fibras do ligamento periodontal. Portanto, os fenômenos verificados durante a movimentação ortodôntica, individualizados em zonas de pressão e de tensão, coincidem em um mesmo sítio no trauma oclusal, levando a reações teciduais semelhantes àquelas da zona de pressão. Entretanto, verifica-se um alargamento do ligamento periodontal em toda sua extensão na tentativa de adaptação fisiológica frente à

demanda traumatogênica, resultando na mobilidade dental (Hallmon, 1999; Lindhe *et al.*, 2005).

Trauma de oclusal, portanto, não inicia ou agrava gengivite ou leva a formação de bolsas periodontais (Ramfjord & Ash Jr, 1981), perda de inserção clínica (Jin & Cao, 1992) e recessões gengivais (Harrel & Nunn, 2004), sabendo-se que o dano causado restringe-se ao periodonto de suporte. A aplicação de forças oclusais excessivas também pode causar injúrias na articulação têmporo-mandibular, nos músculos mastigatórios e na polpa dental (Lindhe *et al.*, 2005). A American Academy of Periodontology (1999) classifica o trauma oclusal em primário e secundário.

Trauma oclusal primário é a injúria tecidual ocorrida no periodonto de inserção de um dente ou de um grupo de dentes com periodonto de altura normal frente a forças oclusais que excedam sua capacidade adaptativa. Ocorre, portanto, em dentes em que não houve perda de estruturas de sustentação.

Trauma oclusal secundário é a injúria tecidual ocorrida no periodonto de inserção de um dente ou de um grupo de dentes com periodonto de altura reduzida frente a forças oclusais que excedam sua capacidade adaptativa. Devido à perda de estruturas de sustentação, as forças oclusais necessárias para desenvolver injúria neste tipo periodonto seriam, muitas vezes, não-traumatogênicas em dentes com periodonto de altura normal. Essa injúria é, portanto, passível de ser desenvolvida em dentes com perda de parte do aparato de inserção.

Para que haja o diagnóstico definitivo do trauma oclusal, como comentado acima, há necessidade do processamento de blocos histológicos para confirmação dos fenômenos vasculares e celulares ocorridos, impraticável na clínica. Porém, existem sinais e sintomas detectáveis clinicamente durante o decorrer do fenômeno que viabilizam seu diagnóstico, além de indicadores radiográficos (Tabela 3):

Tabela 3 – Indicadores clínicos e radiográficos do trauma oclusal.

INDICADORES CLÍNICOS	
▪ Mobilidade progressiva	(Ramfjord & Ash Jr, 1981; Hallmon, 1999; Hallmon & Harrel, 2004; Lindhe <i>et al.</i> , 2005)
▪ Presença de frêmito	(The American Academy of Periodontology, 2000)
▪ Sensibilidade dolorosa à mastigação e à percussão	(The American Academy of Periodontology, 2000)
▪ Presença de interferências oclusais como fator de risco	(Harrel, 2003)
▪ Migração dentária	(Stahl, 1978; Hallmon, 1999; Harrel & Hallmon, 2004)
▪ Presença de facetas concomitantemente a outros indicadores	(Hallmon, 1999; Hallmon & Harrel, 2004)
▪ Fraturas dentárias	(Hallmon, 1999; Hallmon & Harrel, 2004)
▪ Sensibilidade térmica	(Hallmon, 1999; Hallmon & Harrel, 2004)
▪ Necrose pulpar	(Estrela & Figueiredo, 2001)
INDICADORES RADIOGRÁFICOS	
▪ Espessamento do ligamento periodontal;	(Hallmon, 1999; The American Academy of Periodontology, 2000)
▪ Descontinuidade da lâmina dura;	
▪ Presença de zonas radiolúcidas na furca ou no ápice do dente;	
▪ Reabsorção óssea e/ou radicular	

Frente ao paradigma de reprodutibilidade da dinâmica traumática, verificam-se, na literatura, diversos modelos experimentais de indução ao trauma oclusal que visam reproduzir o fenômeno clínico. Autores têm aplicado com êxito alguns modelos: aplicação de forças alternadas (Nyman *et al.*, 1978); aumento da dimensão vertical segundo a utilização de aparatos distintos (Budtz-Jorgensen,

1980; Kvinnsland *et al.*, 1992; Kawamoto & Nagoaka, 2000; Kaku, 2005); redução da dimensão vertical (Bani *et al.*, 1999; Nogueira-Filho *et al.*, 2004).

2.2.1 Estudos experimentais

Sallum, 1973 avaliou histomorfologicamente a influência do trauma oclusal sobre o periodonto de sustentação de macacos *Callithrix jacchus* (sagüis) sob condições normais e modificadas pela administração de dexametasona intra-peritoneal. Para reprodução da lesão, o autor cimentou com fosfato de zindo um arco em forma de U, confeccionado com fio ortodôntico, na oclusal dos dentes súpero-posteriores dos animais. Os autores verificaram uma predominância de processos destrutivos das estruturas periodontais nos períodos de 7 e 14 dias nos animais que não receberam injeções de dexametasona, verificando indícios de adaptação funcional às cargas oclusais nos períodos de 21 e 28 dias. No grupo tratado com o corticosteroide via administração sistêmica, os fenômenos destrutivos manifestaram-se mais tardiamente, sendo que não houve indícios de reparo da lesão aos 28 dias, observando-se o retardo na recuperação periodontal devido a um atraso na adaptação funcional à demanda oclusal.

Nyman *et al.* (1978) estudaram a influência das forças traumatogênicas nos terceiros e quartos pré-molares inferiores de cães adultos submetidos à doença periodontal induzida. Para tanto, cinco animais foram utilizados. Trezentos e trinta dias após a indução de doença periodontal por intermédio de ligaduras, foram realizadas cirurgias de acesso para confecção dos *nocthes* vestibulares imediatamente sobre o osso alveolar dos pré-molares. Novas ligaduras foram colocadas após a recolocação do retalho. Uma semana após a cirurgia, os dentes do lado teste foram submetidos à ação de forças alternadas vestibulo-linguais intermitentemente aplicadas por 30 segundos. Tais forças foram geradas por intermédio de um elevador, utilizando-se o segundo pré-molar e o

primeiro molar como suporte para o elevador. Essas forças foram aplicadas no *baseline*, 4º, 8º, 12º e 16º dias. O resultado do estudo demonstrou que frente às forças alternadas, os dentes submetidos à doença periodontal desenvolveram um aumento gradual e estatisticamente significativo da mobilidade ($p < 0,001$).

Budtz-Jorgensen (1980) desenvolveu um estudo para indução de bruxismo e trauma oclusal em macacos da espécie *Macaca irus*. Dispositivos oclusais de resina acrílica foram confeccionados de forma esplintada e colocados sobre os pré-molares e molares superiores, permitindo um aumento de 3-4mm na dimensão vertical. O *splint* direito recebeu um ajuste de forma a ficar com um grande número de pontos de contato e o do lado esquerdo foi ajustado de forma a apresentar poucos pontos de contato. O período experimental foi de 4 semanas e semanalmente os animais foram submetidos a avaliação intraoral. Após a remoção dos aparatos, foram realizados exames na 2ª e 4ª semanas e no 6º mês. Como resultado, os autores verificaram aumento da mobilidade 3 vezes maior no lado teste (direto), um aumento significativo no índice gengival no lado teste ($p < 0,01$). Radiograficamente, os autores verificaram reabsorção óssea angular adjacente aos dentes do lado teste e reabsorção da lâmina dura na região de furca. No lado controle (esquerdo) foi verificado um tênue aumento na espessura do ligamento periodontal. Na 4ª semana após a remoção dos *splints* já se verificava, radiograficamente, regeneração óssea, sendo que no 6º mês, os níveis interproximais, interradiculares e periapicais foram restabelecidos à normalidade. Histologicamente, não foram verificadas alterações no 6º mês após o período experimental. Os autores concluem que bruxismo não causa a progressão da gengivite em periodontite.

Kvinnslund *et al.* (1992) verificaram experimentalmente a influência do trauma oclusal no suprimento sangüíneo periodontal e pulpar de 45 ratos Wistar. Os autores acrescentaram à superfície oclusal do primeiro molar superior direito 1mm de resina e o lado contralateral serviu como controle. Nos 1º, 2º, 5º, 10º, 15º, 20º e 30º dias após a indução do trauma, animais foram re-anestesiados e uma solução

de micro-esferas fluorescentes (MF) diluída foi injetada no ápice do ventrículo e sacrificados em seguida. Nas primeiras 24 horas os autores verificaram um aumento no suprimento sanguíneo nos primeiros molares superiores do lado experimental comparado ao contralateral. O maior aumento foi verificado no segundo dia. A partir daí, verificou-se um decréscimo irregular durante todo o período experimental. A mesma tendência foi verificada no suprimento sanguíneo dos segundos e terceiros molares superiores do lado experimental, apesar de menos pronunciada. Na mandíbula, do lado teste, verificou-se a mesma tendência, porém mais tardia, havendo um aumento no fluxo sanguíneo do 5^o ao 10^o dias. Resultados semelhantes foram encontrados para o fluxo sanguíneo pulpar. Os autores concluem que os resultados indicam que a indução experimental unilateral do trauma oclusal em ratos inicia respostas no fluxo sanguíneo periodontal e pulpar em todos os molares dos animais.

Kawamoto & Nagoaka (2000) estudaram os efeitos da deficiência de estrogênio na reabsorção óssea alveolar causada pela deficiência de estrogênio em ratas Wistar submetidas à ovariectomia. Para tanto, utilizaram 132 animais que receberam ovariectomia bilateral (OVX) ou controle SHAM. Sete dias após a cirurgia, os autores dividiram aleatoriamente os animais em dois grupos: metade foi submetida ao trauma oclusal (TO); outra metade não foi submetida ao trauma oclusal. Por fim, tinham-se 4 grupos: OVX + TO (grupo 1); SHAM + TO (grupo 2); OVX (grupo 3); SHAM (grupo 4). Para promoção do trauma oclusal, os autores adotaram um modelo de sobrecarga oclusal baseado no aumento da dimensão vertical (DV), a partir da confecção de um dispositivo que permitiu o aumento da unilateral da DV a partir da adesão de um metal de 1mm de altura à superfície oclusal dos molares superiores esquerdos dos grupos 1 e 2. Quatro a sete animais de cada grupo foram sacrificados em períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a indução do trauma. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados no *baseline*. Os autores concluem da pesquisa que até o 7^o dia após a indução da ovariectomia há maior recrutamento de osteoclastos e de seus precursores junto ao ligamento periodontal e, como resultado, haveria uma grande ativação dos osteoclastos em

resposta à hiper-função do periodonto. Segundo os autores, essa especulação parece ser aceitável como explicação aos achados observados: a OVX, frente às forças traumatogênicas, aumenta a sensibilidade do osso alveolar, levando a maior reabsorção óssea. Os autores concluem que a dinâmica de reabsorção óssea alveolar induzida pelo TO é aumentada pela deficiência de estrogênio.

Nogueira-Filho *et al.* (2004) verificaram histometricamente o efeito da nicotina nas mudanças induzidas pelo trauma oclusal no osso alveolar de 30 ratos. Os animais foram divididos em um dos 3 grupos: solução de nicotina intra-peritoneal diária e trauma oclusal (A); solução salina intra-peritoneal diária e trauma oclusal (B); solução salina intra-peritoneal diária (C). O trauma oclusal foi induzido nos primeiros molares a partir de um modelo de redução da dimensão vertical. Para tanto, as cúspides dos segundos e terceiros molares superiores e inferiores foram desgastadas com auxílio de uma broca esférica diamantada. Um dos primeiros-molares inferiores recebeu ligadura. Trinta dias após a indução do trauma, os animais foram sacrificados, os blocos obtidos e processados e as avaliações histométricas posteriormente realizadas. A histometria foi feita na região de furca dos molares inferiores. A nicotina aumentou significativamente a perda óssea induzida pelo trauma oclusal nos dentes que receberam ligadura ($p < 0,001$) quando comparada aos grupos B e C. Reabsorção óssea estatisticamente significativa ($p < 0,01$) também foi verificada nos dentes contralaterais (que não receberam ligadura) dos grupos A e B quando comparados ao grupo C. Os autores concluem que a nicotina injetável pode aumentar o padrão de reabsorção do osso alveolar nos dentes submetidos ao trauma oclusal.

Kaku *et al.* (2005) investigaram a reação do ligamento periodontal (LP) frente às forças oclusais excessivas a partir da observação de mudanças histológicas e pela indução de osteopontina. Dezoito ratas Wistar foram submetidas ao trauma oclusal a partir de um modelo de aumento da dimensão vertical, utilizando-se um fio metálico de 1,24 mm de diâmetro aderido com resina de metilmetacrilato na superfície oclusal do primeiro molar superior esquerdo de

cada animal. Três ratas serviram como controle. Os animais foram sacrificados nos 1º, 3º, 5º, 7º e 14º dias após a indução do trauma. Os autores verificaram que a espessura do LP se mostrou extremamente reduzido do 1º ao 5º ($p < 0,05$), voltando à espessura controle no 7º dia. Quanto aos testes imuno-histoquímicos, não foram verificadas expressões de osteopontina nos fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos do grupo controle, sendo, porém, detectada na superfície da dentina que margeia a polpa, no osteóide e em pequena quantidade em alguns osteócitos na região do septo desse grupo. No grupo controle, não foi observada expressão de RANKL. No grupo teste, a osteopontina foi detectada, a partir do 3º dia, em alguns osteoclastos, ao redor de fibroblastos e em osteoblastos adjacentes a área de compressão. A expressão de RANKL foi observada, nesse grupo, ao redor de osteoblastos e osteoclastos do 1º ao 7º dia. Os autores concluem que seu método foi eficaz para a avaliação do colapso periodontal durante o trauma oclusal. Apesar da produção intracelular de osteopontina nos osteoclastos ter sido verificada na presença de trauma oclusal intermitente, o papel desta proteína nas células não foi claro. Não foi observada correlação entre a produção de osteopontina e a distribuição de RANKL nos osteoclastos.

2.2.2 Estudos clínicos

Assim como nos estudos experimentais, há uma dificuldade de apreciação de experimentos que avaliem o trauma oclusal como fenômeno isolado. Estudos em humanos e em material de autópsia têm correlacionado extensivamente a influência do trauma oclusal na doença periodontal, como passível de apreciação em revisões de literatura que abrangem o tema (Stahl, 1978; Anderegge & Meltzer, 2001; Harrel, 2003; Lindhe *et al.*, 2005). Além das limitações metodológicas, visto que não há possibilidade de realização de estudos histométricos *in vivo*, ainda há questões éticas relacionadas ao não tratamento das lesões, o que inviabiliza ou limita o estudo prospectivo em humanos.

Jin & Cao (1992) desenvolveram um estudo clínico que teve como objetivo determinar os sinais do trauma oclusal e sua relação com a severidade da doença periodontal. Trinta e dois pacientes diagnosticados com periodontite crônica participaram do estudo. Para correta avaliação, exames periodontal, de oclusão e radiográficos foram realizados. Os autores não encontraram relação estatisticamente significativa entre profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e altura óssea alveolar quando comparadas a dentes com relação oclusal desarmônica ($p>0,05$). Dentes que apresentavam significante mobilidade, mobilidade funcional ou aqueles que apresentavam radiograficamente espessamento do ligamento periodontal apresentaram maiores profundidades de sondagem e perda de inserção clínica ($p<0,01$) quando comparados àqueles sem essas características. Os autores propuseram, ainda, dois índices combinados: índice de trauma oclusal (ITO); índice de adaptabilidade (IA). Os dentes que apresentaram ITO positivo tiveram maiores profundidades de sondagem ($p<0,01$), maior perda de inserção clínica ($p<0,01$) e menor suporte ósseo do que os dentes ITO negativos. Quanto ao IA, os dentes IA positivos apresentaram menor perda de inserção clínica ($p<0,01$) e maior suporte ósseo ($p<0,01$) que os dentes IA negativos. Os autores concluem que para uma mesma perda de inserção clínica, dentes submetidos ao trauma oclusal mostraram ter menos suporte que àqueles não acometidos por trauma, além da magnitude das diferenças verificadas no suporte ósseo alveolar entre dentes traumatizados e não-traumatizados aumentarem à medida que houve aumento na perda de inserção clínica. Os autores sugerem que o trauma oclusal está positivamente relacionado à perda do suporte ósseo em pacientes com periodontite crônica moderada a avançada.

Harrel & Nunn (2004) verificaram retrospectivamente o efeito das forças oclusais nas recessões gengivais de pacientes tratados em consultório. Um total de 91 pacientes preencheu os requisitos do delineamento e foram divididos em 3 grupos: não-tratados (NT=30); parcialmente tratados (PT=20), em que se realizou somente a terapia básica; completamente tratados (CT=41), em que se realizou a terapia básica e a cirúrgica. Os autores não verificaram diferenças

estatisticamente significativas entre discrepâncias oclusais e espessura inicial dos tecidos gengivais ($p=0,414$) ou tratamento oclusal e mudanças na espessura da gengiva ($p=0,481$). Os autores concluem a partir dos resultados obtidos que parece não haver uma relação entre discrepâncias oclusais e recessões gengivais.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos avaliar histometricamente:

1. A influência da IFC na reabsorção óssea da região de furca de 1^{os} molares inferiores induzidas por TO primário a partir do aumento unilateral da DV de ratos Wistar machos adultos, criando-se uma interferência oclusal;
2. A influência do período de indução do TO primário (7, 14, 21 e 28 dias) na reabsorção óssea da região de furca de 1^{os} molares inferiores de animais submetidos à IFC em períodos semelhantes de duração do TO em cada subgrupo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Características da Amostra

Foram utilizados 96 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400g. Os animais foram acondicionados no biotério da FOP-UNICAMP, mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais passaram por um período de 5 dias para a aclimação ao ambiente do laboratório, a uma temperatura de 22º a 24º C. Esta pesquisa foi aceita pela Comissão de Ética em Experimentos com Animais sob protocolo de número 1245-1 (Anexo 1).

4.2 Delineamento Experimental

Os 96 ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos e cada grupo em 4 subgrupos:

Grupo 1 - Teste (TO+IFC n=32): Os animais foram submetidos à exposições diárias de 8 minutos à inalação da fumaça de cigarro (IFC), 3 vezes ao dia, durante 7, 14, 21 ou 28 dias. Essa determinação da exposição à fumaça de cigarros de cada subgrupo foi semelhante aos diferentes períodos de indução do trauma oclusal: 7 dias (n=8); 14 dias (n=8); 21 dias (n=8) e 28 dias (n=8). A divisão em subgrupos também foi realizada aleatoriamente.

Grupo 2 - Controle (TO sem fumaça n=32): Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 subgrupos. Cada subgrupo foi submetido a diferentes períodos de indução ao trauma oclusal: 7 dias (n=8); 14 dias (n=8); 21 dias (n=8) e 28 dias (n=8).

Grupo 3 - Controle negativo (n=32): os animais foram divididos aleatoriamente em 4 subgrupos. Cada subgrupo foi sacrificado em períodos pareados aos subgrupos que receberam tratamentos, com finalidade de se ter dados iniciais para confirmação do sucesso do modelo aplicado: 7 dias (n=8); 14 dias (n=8); 21 dias (n=8) e 28 dias (n=8).

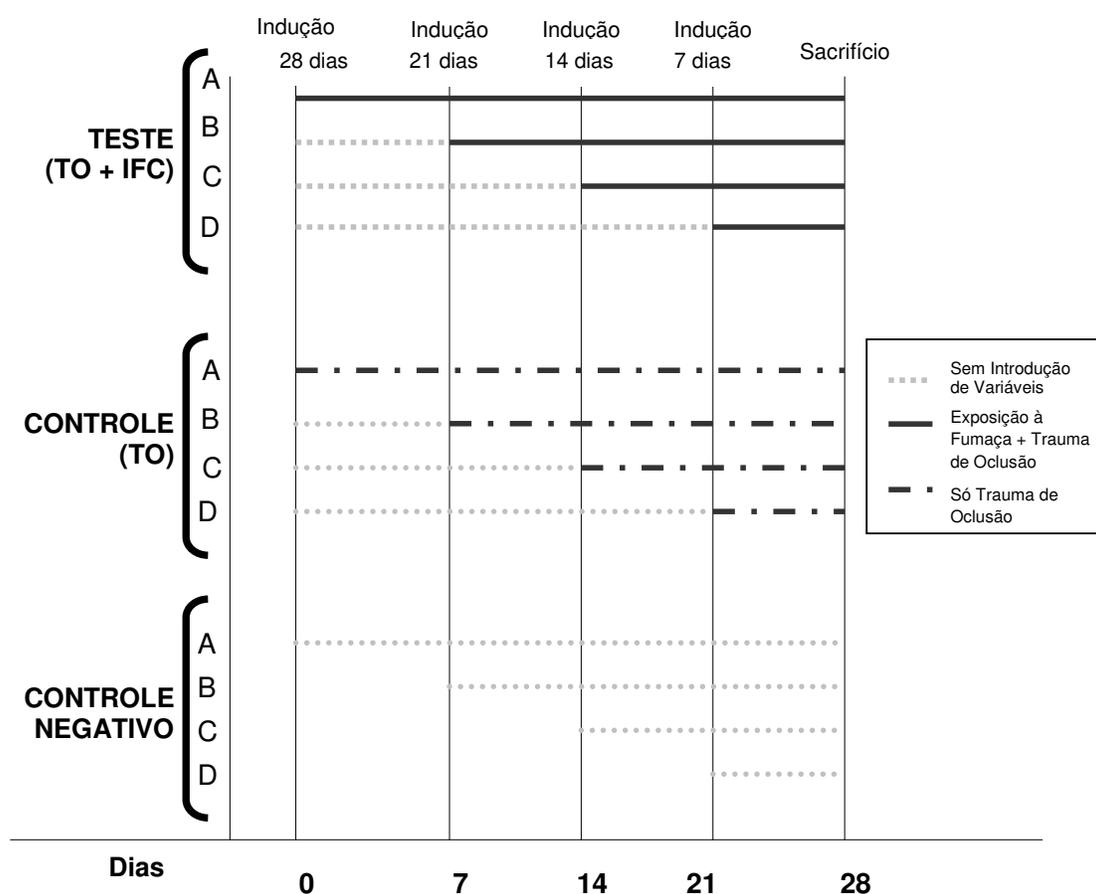


Figura 1 - Representação esquemática dos grupos experimentais e regimes de indução ao trauma oclusal e exposição à fumaça.

4.3 Exposição à Fumaça

Os animais dos grupo Teste (TO + IFC) foram submetidos à exposição de fumaça de cigarros de acordo com o modelo proposto por Nociti *et al.* (2002b). Esse modelo utiliza um recipiente de acrílico (45X25X20cm), no qual 5 animais são expostos a 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. 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). Inicialmente os animais passam por um período de adaptação de 2 dias. No primeiro dia estes foram expostos a 3 períodos de 5 minutos de IFC, no segundo dia, a 3 períodos de 7 minutos e a partir do terceiro dia os animais foram expostos a 3 períodos diários de 8 minutos cada.

César-Neto *et al.* (2003), investigaram a concentração sérica de nicotina e cotinina de animais submetidos a injeções intra-periotoneais de nicotina (3mg/kg, 2 vezes ao dia) e animais submetidos à inalação da fumaça de 10 cigarros contendo 1,3 mg de nicotina cada, durante 8 minutos cada exposição, sendo realizadas 3 exposições diárias. Para realização da exposição à fumaça desses cigarros, 5 animais foram colocados em uma caixa acrílica de 45x25x20 cm³ e o ar foi bombeado de uma câmara a outra, fazendo com que esses animais inalassem continuamente a fumaça durante o tempo determinado. Amostras de sangue foram coletadas antes da inserção dos implantes, 30 e 60 dias após, sempre 15 minutos após a realização de um dos dois procedimentos. Os resultados mostraram que os níveis séricos de cotinina dos ratos expostos à fumaça de cigarros foi semelhante àquele percebido em humanos que fumam 10 a 20 cigarros por dia, mostrando que há uma pertinência do modelo experimental quando feita a analogia em humanos.

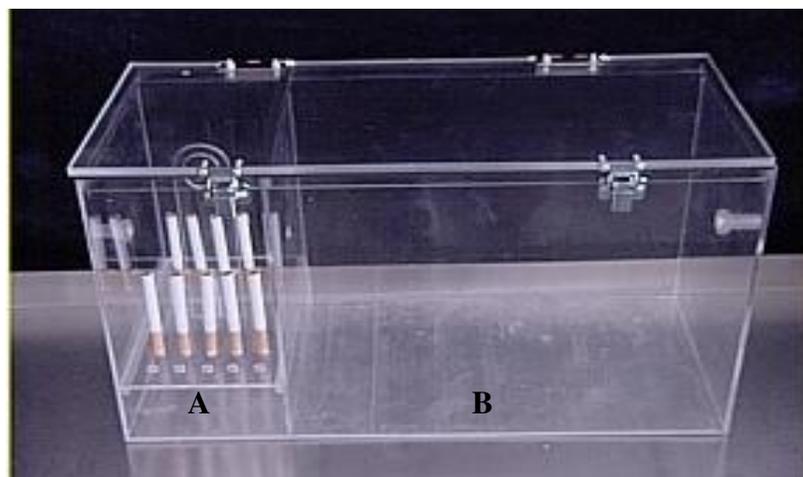


Figura 2 – Câmara acrílica de exposição à fumaça de cigarros. A) compartimento em que eram acesos 10 cigarros; B) compartimento em que eram acondicionados 5 ratos Wistar.

4.4 Indução do Trauma Oclusal

Os animais foram anestesiados por meio da administração intramuscular de ketamina (1ml/kg) (Dopalen[®]; Vetbrands LTDA, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil). Os maxilares foram abertos por meio do aparato de Doku (1966) para inserção de um segmento de fio ortodôntico (0,5 mm de diâmetro e aproximadamente 1 mm de comprimento) na face oclusal do primeiro molar inferior aleatoriamente escolhido (sorteio) de forma a criar uma interferência oclusal, utilizando-se incrementos de resina fotopolimerizável para sua fixação (Z100[®]; 3M, Sumaré, SP, Brasil). A superfície oclusal do molar selecionado foi previamente limpa com auxílio de um *microbrush*, seguindo-se de condicionamento da superfície oclusal com ácido fosfórico 37% (Villevie[®] Dentalville do Brasil, Joinville, SC, Brasil) e aplicação do adesivo (Single Bond[®]; 3M, Sumaré, SP, Brasil), segundo especificações dos fabricantes. O diâmetro do fio ortodôntico padronizou a altura da interferência oclusal, sendo a resina inserida

até o limite de altura do fio, não o ultrapassando. O período de indução do trauma seguiu a descrição do delineamento experimental.

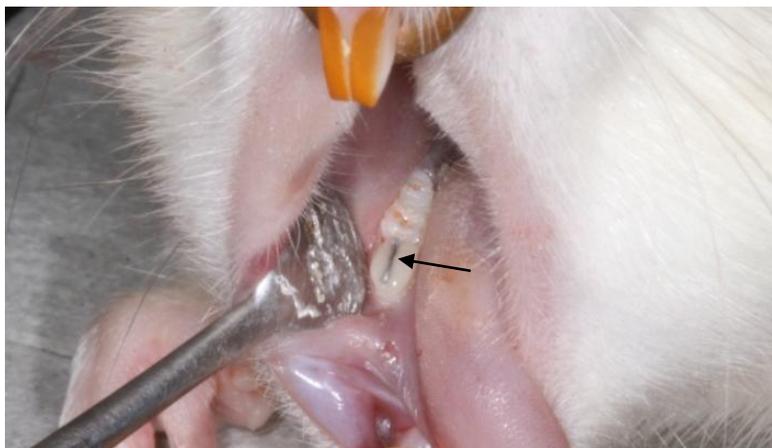


Figura 3 - Vista do fio ortodôntico (seta) aderido à superfície oclusal do 1º molar.

4.5 Sacrifício dos Animais e Processamento Histológico

Os animais foram submetidos à anestesia geral, como descrito no período de indução ao TO, e sacrificados por meio de perfusão transcardíaca de formol 10% em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,0) por aproximadamente 10 minutos cada animal (Figura 5). Essa técnica foi eleita por permitir uma melhor fixação das peças e, conseqüentemente, um melhor resultado do processamento histológico. Seguida à fixação, a mandíbula foi removida e hemi-seccionada em sua sínfise. O material obtido foi imerso em formol a 10% com tampão fosfato (pH 7,0) por 24 horas. As hemi-mandíbulas foram descalcificadas com EDTA 10% por 16 semanas, à temperatura ambiente, sendo a solução renovada diariamente. Após a desmineralização, os espécimes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Secções longitudinais méso-distais

de 6 μm de espessura foram obtidas por auxílio de um micrótomo (Leica RM2155, Germany) (Figura 4). As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina.

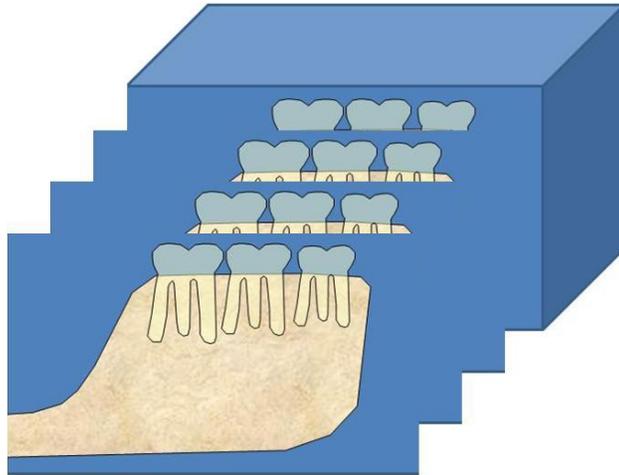


Figura 4 - Esquema mostrando a orientação do corte histológico.

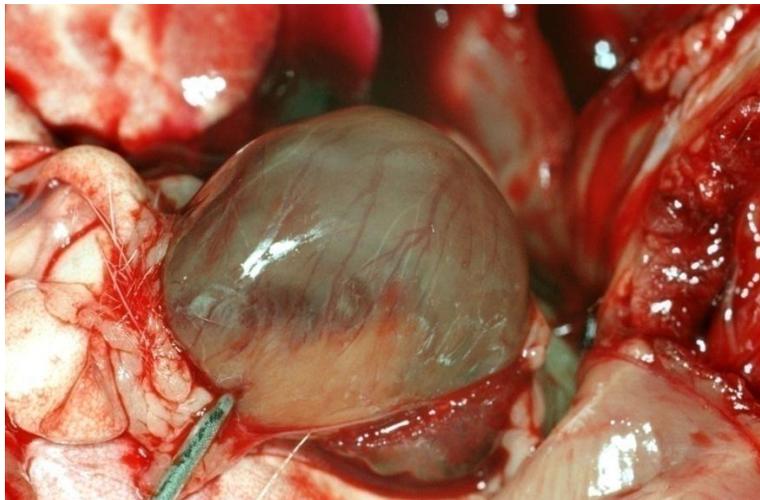


Figura 5 - Punção de um ventrículo com um butterfly na perfusão transcardíaca com formol 10%.

4.6 Análise Histométrica

4.6.1 Reabsorção óssea inter-radicular

Escolhida a orientação de corte mais conveniente para a delimitação da região da bifurcação dos primeiros molares mandibulares, foram obtidos cortes seriados de 6 µm de espessura a partir da tábua óssea vestibular e foram separados os cortes nos quais a região de bifurcação foi identificada. Para a estimativa de volume, foi desprezado o primeiro corte, selecionando-se os demais cortes de forma equidistante segundo o número total de cortes histológicos obtidos por dente. Desse modo, 10 cortes histológicos equidistantes foram selecionados por dente para avaliação histométrica e digitalizados em um aumento de 50X (5X objetiva e 10X ocular). Para capturar as imagens dos cortes, foi utilizado o programa Computer Eye (Digital Vision, Dedham, MD, USA). Utilizando-se o sistema de pontos de um retículo quadriculado com auxílio do programa Image-Pro[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), foi mensurada a área de tecido conjuntivo proveniente da reabsorção do tecido ósseo da região inter-radicular. O retículo foi constituído de quadrados de 0,08mm de aresta e 0,0064mm² de área (Figura 6). O retículo foi posicionado de maneira que sempre incluísse dentina coronária e radicular e o tecido ósseo, sendo computados os pontos que coincidiram com as intersecções das arestas dos quadrados adjacentes que estavam dentro da área de tecido conjuntivo presente na região inter-radicular em consequência da perda óssea. A área de reabsorção óssea foi calculada utilizando-se a fórmula *Área reabsorvida = N^o de pontos x Área do quadrado*. A área de reabsorção óssea da região de furca foi determinada a partir da média das leituras dos 10 cortes equidistantes por dente, expressa em mm².

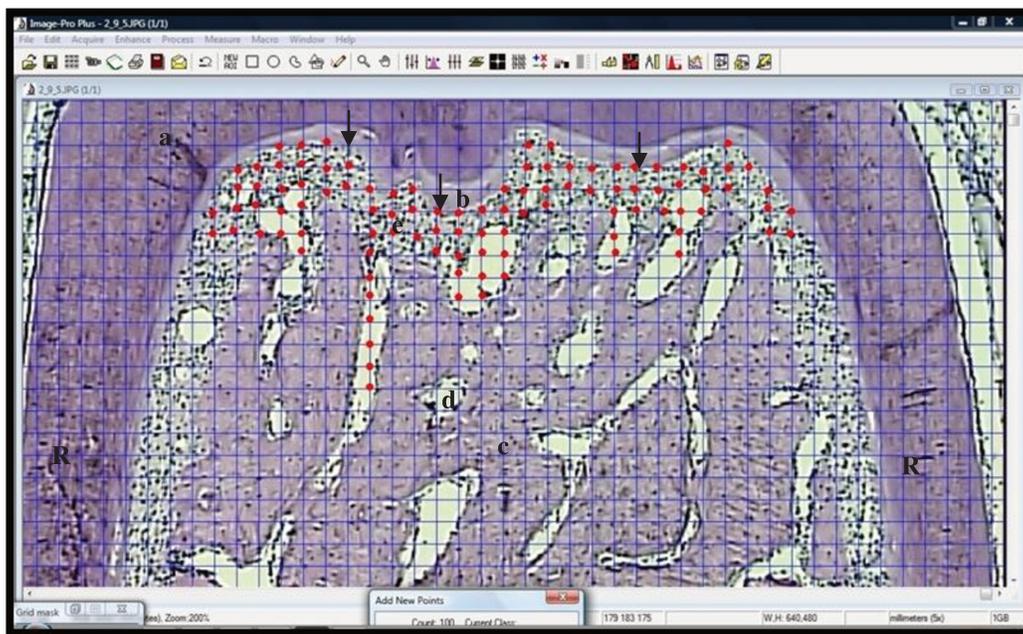


Figura 6 - Corte histológico aberto no programa de leitura Image Pro® com o retículo posicionado e contagem de pontos realizada. a) dentina; b) cimento; c) osso alveolar da região de furca; d) vaso sangüíneo; e) região delimitada por pontos vermelhos descrevendo a área preenchida por tecido conjuntivo do ligamento periodontal ou devido à reabsorção óssea causada pelo TO. Setas pretas indicam o teto da furca. R indica os cones radiculares.

4.6.2 Calibração da examinadora

Para avaliar a calibração da examinadora 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 (Anexo 2). 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 da examinadora.

4.6.3 Avaliação dos dados

Foi realizada análise exploratória dos dados (Anexo 3) a qual indicou que os mesmos atendem às pressuposições de uma análise paramétrica. A seguir foi aplicada análise de variância (ANOVA) *two-way*. Para avaliação dos tempos foi utilizada regressão polinomial e para avaliação dos tratamentos o teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

5 RESULTADOS

A avaliação dos cortes histológicos mostrou que no grupo TO+IFC as mudanças são notadas já aos 7 dias, sendo possível observar uma área de reabsorção óssea alveolar preenchida por tecido conjuntivo na região do teto da furca (Fig 7A), mostrando já uma lesão por TO instalada, quando comparado ao grupo CO Negativo (Fig 7C, Tabela 4, Fig 8). Histologicamente, o grupo TO aos 7 dias apresentou um espessamento do ligamento periodontal (Fig 6B), porém, não foi verificada diferenças estatisticamente significativas entre os grupos TO e CO Negativo (Tabela 4, Fig 8) neste período, não caracterizando ainda uma lesão traumática instalada.

Aos 14 dias, verificou-se histologicamente no grupo TO+IFC (Fig 7D) aumento da área de reabsorção, verificando-se uma maior área de tecido conjuntivo, quando feita a comparação histológica intragrupo com 7 dias (Fig 7A) e observando-se, também, maior reabsorção óssea e, conseqüentemente maior área de tecido conjuntivo, quando feita a comparação intergrupo aos 14 dias (Tabela 4, Fig 8) com TO (Fig 7E) e CO Negativo (Fig 7F). Aos 14 dias, no grupo TO, verifica-se, histologicamente, uma lesão mais acentuada, caracterizada por uma maior área de reabsorção óssea e maior área de tecido conjuntivo de preenchimento, que aquela observada aos 7 dias (Tabela 4, Fig 8), observando-se, aqui, uma lesão já característica de TO (Fig 7E), quando comparada ao grupo CO Negativo (Fig 7F).

Aos 21 dias, observa-se, histologicamente, uma tendência de regressão da lesão no grupo TO+IFC (Fig 7G), quando feita a comparação intragrupo aos 14 e 7 dias, observando-se uma redução na área de tecido conjuntivo de preenchimento (Tabela 4, Fig 8). Fazendo-se a comparação intergrupos, é verificado, histologicamente, uma lesão ainda maior que em TO (Fig 7H). A extensão da lesão no grupo TO, por sua vez, mostrou-se aparentemente

semelhante à lesão encontrada nesse grupo aos 14 dias (Fig 6E) e aparentemente estagnada (Tabela 4, Fig 8).

Histologicamente aos 28 dias, a lesão do grupo TO+IFC (Fig 7J) apresenta-se ainda mais tênue quando comparada com as lesões de 14 e 21 dias (Tabela 4, Figura 8), não havendo, porém, sua total reversão. Verificam-se menores áreas de reabsorção óssea tecido e de conjuntivo que aos 21 (Fig 7G) e 14 dias (Fig 7D). Comparado ao grupo TO, nesse mesmo período, vê-se lesões de áreas semelhantes (Fig 7H). No grupo TO, por sua vez, verifica-se histologicamente, neste período, uma maior reabsorção óssea que aquela verificada em 14 (Fig 7E) e 21 dias (Fig 7H).

O grupo Controle Negativo apresentou-se sem grandes diferenças detectáveis histologicamente ao longo dos períodos avaliados, verificando-se apenas o espaço pertinente ao ligamento periodontal, sem detecção de tecido conjuntivo de preenchimento proveniente do reparo causado pela reabsorção óssea frente à demanda traumatogênica (Fig 7C, 7F, 7I, 7M).

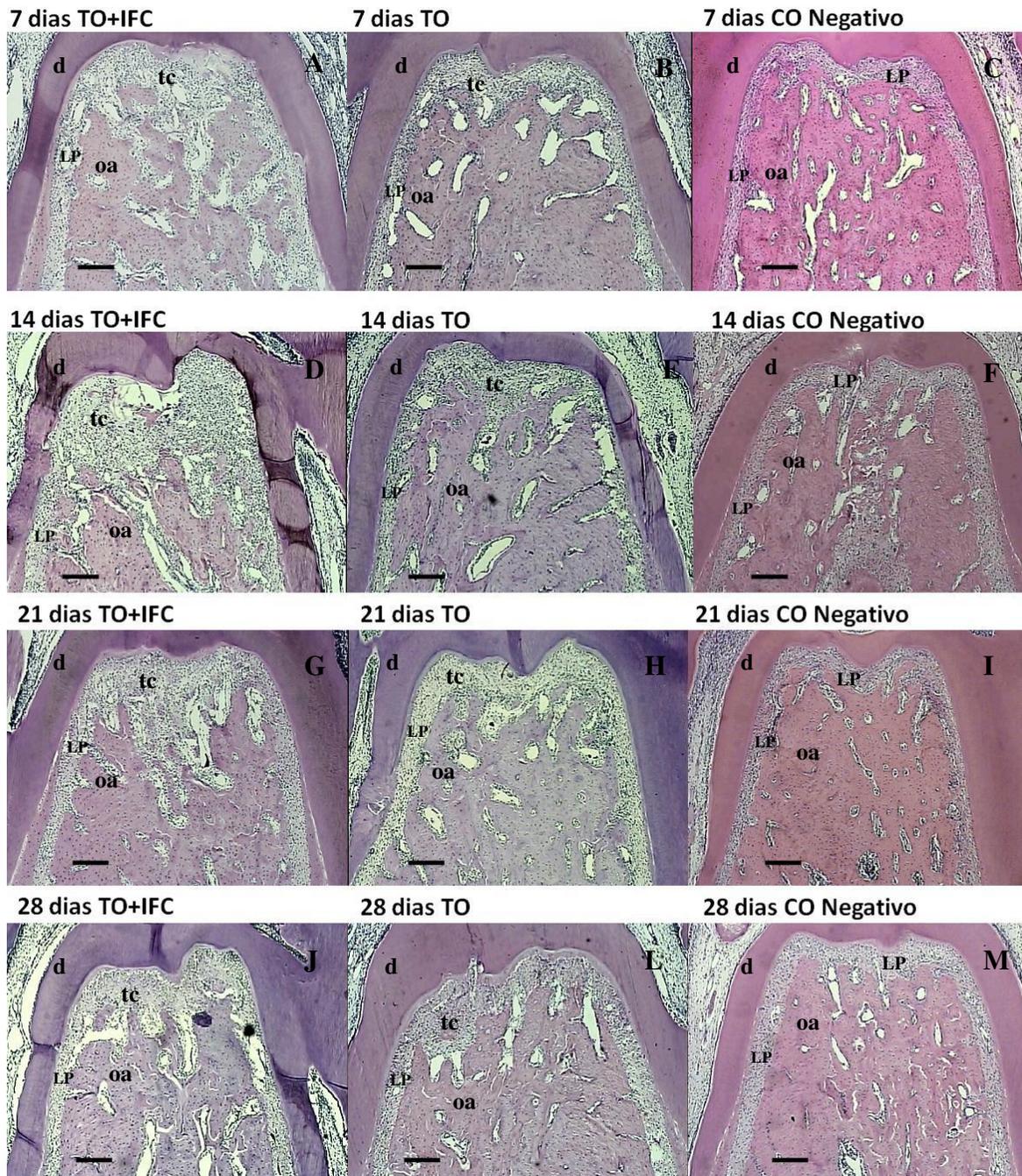


Figura 7 – Cortes histológicos em aumento de 5X dos tratamentos aplicados nos diversos períodos de avaliação. d- dentina; tc- tecido conjuntivo proveniente da reabsorção óssea; oa- osso alveolar da furca; LP- ligamento periodontal; Barra= 200µm.

Pela análise de variância observou-se diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$), entre os tempos ($p < 0,0001$) e a interação grupo x tempo foi significativa ($p < 0,0001$). Assim, a interação foi desdobrada e foi aplicado o teste de Tukey para tratamentos e Regressão Polinomial para tempos, cujos resultados são apresentados na Tabela 4 e nos gráficos das Figuras 8 e 9.

Tabela 4 - Distribuição das médias de reabsorção óssea em mm^2 segundo o tratamento e o período de indução.

Tempo (Dias)	Tratamento		
	TO + IFC	TO	Controle Negativo
7	$0.54 \pm 0.20A$	$0.42 \pm 0.15AB$	$0.30 \pm 0.04B$
14	$0.93 \pm 0.16A$	$0.62 \pm 0.14B$	$0.29 \pm 0.02C$
21	$0.78 \pm 0.13A$	$0.63 \pm 0.15A$	$0.22 \pm 0.03B$
28	$0.67 \pm 0.12A$	$0.72 \pm 0.11A$	$0.33 \pm 0.04B$
p (linear)	$0,2342^{NS}$	$<0,0001$	0.9794^{NS}
p (quadrático)	$<0,0001$	$0,2142^{NS}$	0.1532^{NS}
R2	0,80	0,86	-

Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NS= não significativo

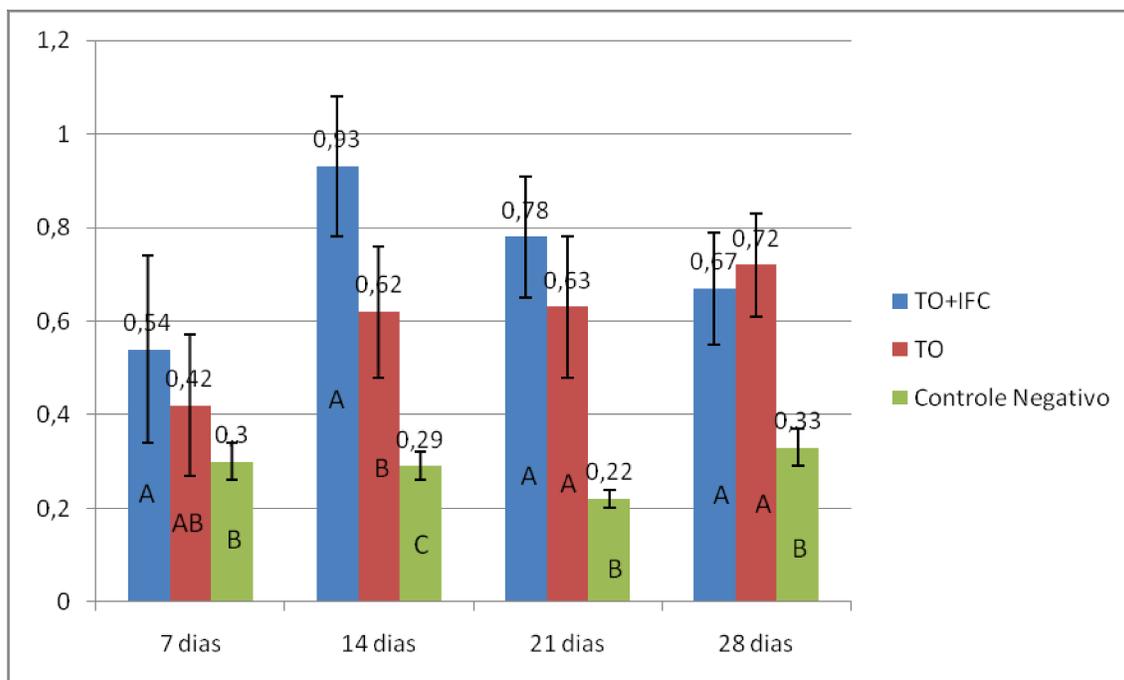


Figura 8 - Gráfico de distribuição das médias dos grupos segundo períodos de indução (Médias por período de indução seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)).

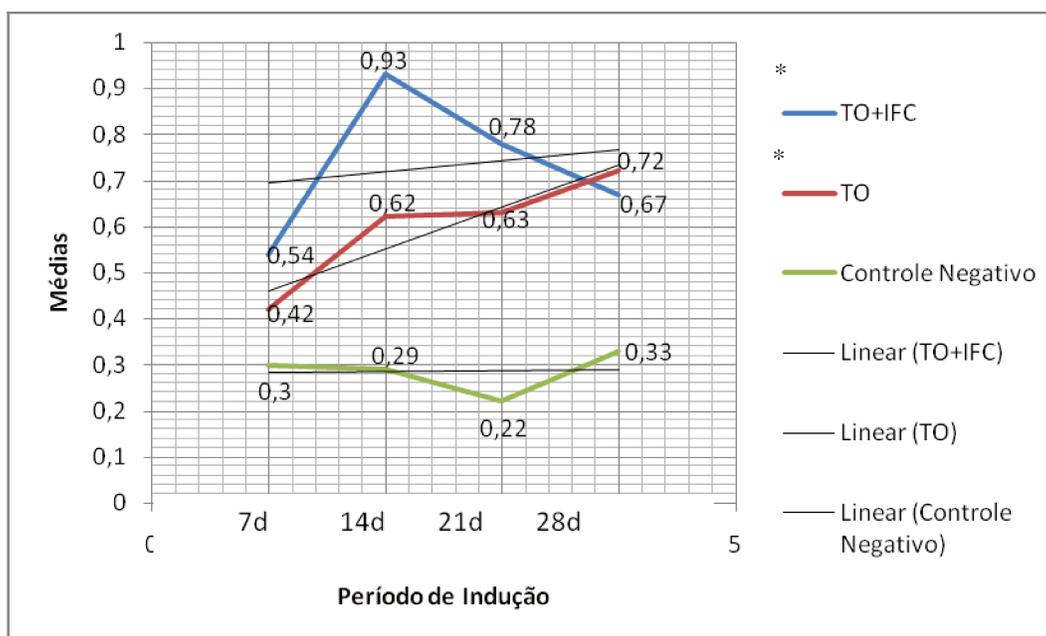


Figura 9 – Gráfico de dispersão das médias dos grupos (* Valores estatisticamente significantes para o teste de Regressão Polinomial; TO+IFC: P (linear) $< 0,0001$; TO: P (quadrático) $< 0,0001$).

O teste de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) no período de 7 dias entre os tratamentos TO+IFC e Controle Negativo ($0.54 \pm 0.20 \text{ mm}^2$, $0.3 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ respectivamente), mostrando a presença de uma lesão já instalada nesse grupo, no período de 14 dias entre os tratamentos (TO+IFC e TO) e o grupo Controle Negativo ($0.93 \pm 0.16 \text{ mm}^2$, $0.62 \pm 0.14 \text{ mm}^2$, $0.29 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ respectivamente), mostrando uma lesão por TO bem caracteriza no grupo TO+IFC e uma lesão inicial no grupo TO, no período de 21 dias entre o grupos TO+IFC e CO Negativo ($0.78 \pm 0.13 \text{ mm}^2$, $0.22 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ respectivamente) e entre TO e Controle Negativo ($0.63 \pm 0.15 \text{ mm}^2$, $0.22 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ respectivamente) e no período de 28 dias entre o grupos TO+IFC e Controle Negativo ($0.67 \pm 0.12 \text{ mm}^2$, $0.33 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ respectivamente) e entre TO e Controle Negativo ($0.72 \pm 0.11 \text{ mm}^2$, $0.33 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ respectivamente). Esses resultados expressam a eficácia do aparato aplicado para confecção da interferência oclusal no desenvolvimento do TO e a influência negativa da IFC promovendo maior reabsorção óssea em 7 e 14 dias. Quando aplicada a análise polinomial nos tempos de cada grupo do experimento, os resultados mostraram-se estatisticamente significativos entre todos os tempos do grupo TO+IFC e do grupo TO ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a influência da IFC na reabsorção óssea da região de furca de 1^{os} molares inferiores induzidas por TO primário a partir do aumento unilateral da DV de ratos Wistar machos adultos, criando-se uma interferência oclusal, assim como a influência do período de indução do TO sobre a reabsorção. A FAC é sabidamente nociva e apresenta-se potencialmente mais tóxica que a fumaça tragada durante o hábito de fumar (INCA, 2008). César-Neto *et al.* (2003), verificaram previamente a viabilidade do modelo de IFC aplicado neste estudo, observando que os níveis séricos de cotinina dos ratos é semelhante àquele percebido em humanos que fumam 10 a 20 cigarros por dia, mostrando que há uma pertinência do modelo experimental quando feita a analogia com humanos.

A análise dos dados deste estudo mostrou a eficácia do modelo quanto ao desenvolvimento do TO e quanto à influência da IFC na instalação e no desenvolvimento da lesão. A avaliação intergrupos mostrou que no grupo tratado com IFC observa-se, já no período mais curto de avaliação (7 dias), uma alteração na resposta à injúria tecidual causada pela interferência oclusal, mostrando nesse período uma lesão inicial de trauma oclusal quando comparado ao grupo controle negativo ($p \leq 0,05$), dando-nos indícios que uma alteração no metabolismo ósseo causada pela IFC poderia alterar o curso da lesão óssea, tornando a reabsorção mais pronunciada nos estágios iniciais de indução. Aos 14 dias, essa lesão óssea foi significativamente maior no grupo TO+IFC quando comparado ao grupo TO ($p \leq 0,05$), mostrando um efeito adicional da IFC na reabsorção óssea nesse período. No período de 21 dias foi observada uma maior reabsorção óssea numérica no grupo TO+IFC quando comparado ao grupo TO, mas sem se verificar diferenças estatisticamente significativas, observando-se uma redução da área reabsorvida do grupo tratado com IFC quando comparado ao período de 14 dias.

No período de 28 dias, a tendência foi de se igualar a área reabsorvida dos grupos TO+IFC e TO ($p>0,05$).

Estudos em modelo animal têm sido realizados para melhor entender a dinâmica de interação da nicotina e da fumaça de cigarros sobre o processo cicatricial do periodonto de inserção. Benatti *et al.* (2005) estudaram histometricamente o impacto da IFC e da de nicotina injetável (NI) na cicatrização periodontal de defeitos do tipo fenestração na ausência de biofilme. Os autores verificaram que o grupo IFC foi associado a uma menor densidade óssea e a um menor preenchimento ósseo quando comparado ao grupo controle e NI, indicando que outras substâncias além da nicotina poderiam influenciar negativamente o processo de cicatrização periodontal. César-Neto *et al.* (2006) verificaram histometricamente que animais expostos continuamente a IFC apresentaram uma menor proporção de tecidos mineralizados na região de furca quando comparados aos animais dos grupos controle e suspensão da IFC. Essa redução da densidade verificada nos animais submetidos à IFC poderia, em parte, explicar os resultados verificados neste estudo. Um osso menos denso, com uma maior área do trabeculado poderia responder de forma inicialmente exacerbada frente à demanda traumatogênica, por apresentar características mecânicas inferiores, o que podia ser explicado pela verificação inicial de uma maior área óssea reabsorvida. Por outro lado, Kamer *et al.* (2006), por sua vez, verificaram *in vitro*, que a produção de TNF α e IL-6, ambas citocinas pró-inflamatórias relacionadas ao aumento de atividade de reabsorção óssea, é doador-dependente. Isso poderia ter influenciado, a nível bioquímico individual, a resposta dos animais dos grupos deste estudo, podendo ter havido interferência nos níveis de reabsorção observados. Porém, os dados obtidos não nos permitem categorizar os resultados encontrados.

Quanto à avaliação intragrupo do tempo de indução dos tratamentos, observaram-se influências estatisticamente significantes de todos os períodos de indução dos grupos TO+IFC e TO. Em concordância com os resultados deste estudo, Kawamoto & Nagoaka (2000) verificaram alterações ósseas tempo-

dependentes nos grupos de animais submetidos ao TO. O grupo TO+IFC mostrou uma distribuição quadrática das médias de área óssea reabsorvida, informando que houve, num primeiro momento, um aumento da reabsorção óssea em função do tempo e, posteriormente, uma redução desses valores em função do tempo ($p < 0,0001$), tendendo as médias do grupo TO+IFC e TO se igualarem no período de 28 dias, sugerindo uma adaptação funcional do LP à exposição da IFC. Talvez, devido à extensão da lesão e à capacidade endógena de reparo desses animais, os sinalizadores pró-inflamatórios tenham regredido a níveis menos danosos, havendo uma tentativa de retornar a homeostase celular e tecidual, podendo ter ocorrido redução nos níveis, por exemplo, de IL-1, IL-6, RANKL. Outra hipótese que pode ser levantada é a de que o grupo exposto à IFC tenha tido uma maior proliferação de osteoblastos, visando o reequilíbrio celular, visto que a extensão da injúria era significativamente maior. Kawamoto & Nagoaka (2000), porém, verificaram que outra condição que altera sistemicamente a homeostase óssea, a deficiência de estrogênio, não influenciava na quantidade de osteoblastos, mas somente no aumento de osteoclastos.

Semelhante ao fenômeno avaliado no grupo TO+IFC, Sallum (1973) verificou em estudo experimental maior destruição periodontal em animais submetidos ao TO nos períodos de 7 e 14 dias, verificando que havia adaptação funcional do periodonto frente à demanda traumatogênica em 21 e 28 dias no grupo que não recebeu tratamento com corticosteróides. No grupo TO, também foi verificado diferença estatisticamente significante entre todos os tempos, porém a distribuição das médias deu-se de forma linear, informando que houve uma tendência de aumento da lesão em função do tempo ($p < 0,0001$). Talvez esses resultados tenham sido observados devido a utilização de um aparato que criava interferências bilaterais, havendo um plano de distribuição das forças e, portanto, incidindo com menor intensidade em cada alvéolo, permitindo a adaptação prematura do LP. Esses dados divergem daqueles encontrados por Kaku *et al.* (2005) que verificaram adaptação funcional da espessura do ligamento periodontal na região de furca de molares superiores de ratas no 14º dia de indução do

trauma. Porém, o *N* utilizado por esses autores foi muito pequeno, criando vieses na interpretação dos dados. Em 1966, Dotto *et al.* verificaram, experimentalmente em ratos, que em 28 dias as características da lesão oclusal traumática no periodonto era, ainda, predominantemente destrutiva, não observando sinais de adaptação frente ao trauma oclusal. Isso faz-nos crer que além das características individuais imuno-inflamatórias de cada animal em responder à demanda traumatogênica, os diferentes métodos de reprodução da lesão e a adição de fatores outros que possam alterar o metabolismo ósseo poderiam condicionar diferentes graus de alterações teciduais e, portanto, influenciar diferentemente a progressão da lesão. Isso levaria à constatação de diferentes períodos de verificação de destruição e reparo segundo a técnica utilizada para promoção do trauma oclusal, havendo, assim, alterações temporais da restauração da homeostase tecidual.

Mais estudos deverão ser realizados, inclusive a nível imuno-histoquímico, para que melhor se entenda o papel da IFC sobre a reabsorção óssea da região de furca. Para isso, períodos mais longos de indução deverão ser aplicados para se entender a evolução do processo de reabsorção óssea e a interação com o TO, avaliando-se o comportamento de distribuição dessas médias em função do tempo, permitindo melhores especulações do efeito da IFC no metabolismo ósseo ou mesmo elucidando essa dinâmica.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que:

1. A fumaça de cigarros atua sinergicamente com o trauma oclusal nos primeiros períodos de indução (7 e 14 dias), proporcionando uma maior reabsorção óssea da região de furca de 1^{os} molares inferiores. A diferença entre os grupos TO+IFC e TO, porém, tende a se extinguir aos 28 dias de indução;
2. Os períodos de indução (7, 14, 21 e 28 dias) mostraram influir significativamente na reabsorção óssea dos grupos TO+IFC e TO.

REFERÊNCIAS¹

Akmal M, Kesani A, Anand B, Singh A, *et al.* Effect of nicotine on spinal disc cell: a cellular mechanism for disc degeneration. *Spine*. 2004; 1(29): 568-75.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, 1980.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM III-R. 3rd Ed. Washington, 1987.

Anderegg CR, Metzler DG. Tooth mobility revisited. *J Periodontol*. 2001; 72(7): 963-7.

Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8(6): 609-15.

Baljoon M, Natto S, Bergstrom J. The association of smoking with vertical periodontal bone loss. *J Periodontol*. 2004 Jun; 75(6): 844-51.

Bani D, Bani T, Bergamini M. Morphologic and biochemical changes of the masseter muscles induced by occlusal wear: studies in a rat model. *J Dent Res*. 1999; 78(11): 1735-44.

Barnoya J, Glantz SA. Cardiovascular Effects of Secondhand Smoke . Nearly as Large as Smoking Circulation. 2005; 111: 2684-2698. [acesso em 2008 Out 01]. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/111/20/2684>

Beckers S, Camu F. The anaesthetic risk of tobacco smoking. *Acta Anaesthesiol Belg*, 1991; 42: 45-56.

Benatti BB, César-Neto JB, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci*. 2005 Oct; 113(5): 400-3.

Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med*. 1986; 37: 21-32.

Benowitz NL. Nicotine safety and toxicity. Ed Oxford Univ Press New York. 1998.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P *et al.* Cotinine dispositions and effects. *Clin Pharmacol Therap.* 1983; 139: 309.

Benowitz NL, Hennigfield JE. Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. *N Eng J Med.* 1994; 331:123.

Bergström J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol.* 1991 Apr; 62(4):2 42-6. Erratum in: *J Periodontol.* 1991 Dec; 62(12): 809.

Bosco AF, Bonfante F, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol.* 2007; 78(3): 527-32.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 186p.

Brock N. Comparative pharmacologic study in vitro and in vivo with cyclophosphamide (NSC-26271), cyclophosphamide metabolites, and plain nitrogen mustard compounds. *Cancer Treat Rep.* 1976 Apr; 60 (4): 301-8.

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

Budtz-Jogensen E. Bruxism and trauma from occlusion: an experimental model in Macaca monkeys. *J Clin Periodontol.* 1980; 7(2): 149-62.

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

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 Oct; 74(10): 1454-9.

Cesar Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol.* 2004; Jul; 75(7): 995-1000.

César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, 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 Apr; 41(2): 118-23.

Clark PBS, Rand MJ, Vanov S. Comparison of pharmacological activity of nicotine and related alkaloids occurring in cigarette smoking. *Arch Inter Pharmacol Therapeut.* 1965; 156: 363.

Commerce. US Food and Drug Administration. Tobacco Control. 1994; 3: 362-369. [acesso 2008 Out 10]. Disponível em <http://tobaccocontrol.bmj.com/cgi/reprint/3/4/362>

Cortelli JR, Lotufo RFM, Oppermann RV, Sallum AW, organizadores. Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontologia. SOBRAPE. 2005; 15(04).

Cruz GD, Le Geros RZ, Ostroff JS, Hay JL, Kenigsberg H, Franklin DM. Oral cancer knowledge, risk factors and characteristics of subjects in a large oral cancer screening program. *J Am Dent Assoc.* 2002 Aug; 133(8):1064-71.

Cuff MJA, McQuade MJ, Scheidt ML, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol.* 1989; 60: 564-569.

Curvall M, Elwin CE, Kasemi V E *et al.* The pharmacokinetics of nicotine in plasma and saliva from non-smoking health volunteers. *Europ J Clin Pharmacol.* 1990; 38: 281.

Davis RA, Stiles MF, deBethizy JD, Reynolds JH. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Food Chem Toxicol.* 1991; 29 (12): 821-7.

De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec; 5(4): 260-4.

Dotto CA, Carranza FA, Itoiz ME. Efectos mediator Del trauma experimental em ratas. *Ver Asoc Argent.* 1966. 54:48-51.

El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res.* 2006 Dec; 24(12): 2150-8.

Estrela C, Figueiredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 2001.

Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone.* 1991;12(4):283-6.

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(3): 497-502.

Feyerebend C, Ings RMJ, Russel MAN. Nicotine pharmacokinetics and its application to intake, from smoking. *Brit J Clin Phamacol.* 1985; 19: 239.

Focchi GRA. Tobacco use: a review. *Psychiatry On-Line Brazil* (8) Março, 2003. [acesso 2008 Out 10]. Disponível em: http://www.polbr.med.br/arquivo/artigo0303_2.htm

Furtado RD. Implicações anestésicas do tabagismo. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002; 52: 354-67.

Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol.* 2002 Aug; 29(8):763-70.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases, *J Periodontol.* 1996; 67 (Suppl.): 1041-1049.

Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999 Jan; 26(1): 49-55.

Grimes DS, Goddard J. Effect of cigarette smoking on gastric emptyng. *Brit Med J.* Aug, 1978. 12: 460.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995 Jan; 66(1): 23-9.

Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma.* 2005; 19(1): 17-22.

Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma.* 2005 Jan;19(1): 17-22.

Grafström RC, Dypbukt JM, Sundqvist K, Atzori L, Nielsen I, Curren RD, Harris CC. Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis.* 1994 May; 15 (5): 985-90.

Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent.* 1996 Dec; 76(6): 592-6.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr; 28(4): 283-95.

Hallmon WW. Occlusal trauma: effect and impact on the periodontium. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 102-8.

Hallmon WW, Harrel SK. Occlusal analysis, diagnosis and management in the practice of periodontics. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 151-64.

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

Harrel SK. Occlusal forces as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32: 111-7.

Harrel SK, Nunn ME. The effect of occlusal discrepancies on gingival width. *J Periodontol*. 2004; 75(1): 98-105.

Haverstoch BD, Mandracha VJ. Cigarette smoking and wound healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg*. 1998; 31(1): 69-74.

Hollinger JO, Schimitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Ompact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45(4): 294-301.

Huber GL, First MW, Grubner O. Marijuana and tobacco smoke gas-phase cytotoxins. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Nov; 40 (3): 629-36.

Instituto Nacional do Câncer. Tabagismo passivo. s/d. [acesso 2008 Out 30]. Disponível em <http://www.fumozero.med.br/fumo/Tabagismo%20passivo.htm>.

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

Jin LJ, Cao CF. Clinical diagnosis of trauma from occlusion and its relation with severity of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(2): 92-7.

Johnson NW, Bain CA. Tobacco and oral disease. EU-Working Group on Tobacco and Oral Health. *Br Dent J*. 2000 Aug 26;189(4): 200-6.

Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992 Mar; 50(3): 237-9; discussion 239-40.

Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, Miura H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load: osteopontin induction among periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2005; 40(1): 59-66.

Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone JE 3rd, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *nt J Mol Med.* 2006 Jan;17(1):121-7.

Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL, Goodacre CJ. Effects of smoking on implant success in grafted maxillary sinuses. *J Prosthet Dent.* 1999 Sep; 82(3): 307-11.

Kawamoto S, Nagaoka E. The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *J Oral Rehabil.* 2000; 27(7): 587-94.

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

Kerdvongbundit V, Wikesjo UM. Prevalence and severity of periodontal disease at mandibular molar teeth in smokers with regular oral hygiene habits. *J Periodontol.* 2002 Jul; 73(7): 735-40.

Kessler DA. The control and manipulation of nicotine and cigarettes. Subcommittee on Health and the Environmental Committee on Energy and

Kvinnslund S, Kristiansen AB, Kvinnslund I, Heyeraas KJ. Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontol Scand.* 1992; 50(4): 211-9.

Lindhe J, Karring T, Lang N, editores. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Dec; 7(4): 329-36. Erratum in: *Clin Oral Implants Res.* 1997 Aug; 8(4): 342.

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 Mar; 137(3): 208-19.

Marques ACPR; Campana A, Gigliotti AP, Lourenço MTC, Ferreira, MP, Laranjeira R. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. Rev Bras Psiquiatr. 2001; 23(4): 200-14.

Martin T. Hydrogen cyanide in cigarette smoke. 2008. [acesso 2008 Out 20]. Disponível em: <http://quitsmoking.about.com/cs/nicotineinhaler/a/cyanide.htm>

McCrary BS, Epstein EE. Addiction - A comprehensive guidebook. New York: Oxford, 1999.

McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, *et al.* Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. J Periodontol. 1989; 60: 176-181.

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 Oct; 26(5): 402-9.

Moraes FF, Chavez A, Fava M. Fundamentos histológicos aplicados à ortodontia. *In*: Interlando S, organizador. Ortodontia: bases para a iniciação. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p. 42-52.

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

Nazaroff W, Klepeis N. Environmental tobacco smoke particles. In Morawska L & Salthammer T, editores. Indoor environment: airborne particles and settled dust. Wiley: Hoboken, 2004. p. 245-274.

Nociti Jr FH, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Tramontina VA, Machado MA, 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.

Nociti Jr, FH, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado, MA, Stefani CM, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. J Periodont Res. 2001; 36(6): 361-366.

Nociti Jr FH, Stefani CM, Sallum EA, Duarte PM, Sallum AW. Nicotine and bone density around titanium implants: a histometric study in rabbits. Implant Dent. 2002a; 11: 176-182.

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

Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR *et al.* Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol.* 2004; 75(3): 348-52.

Norderyd O, Hugoson A. Risk of severe periodontal disease in Swedish adult population. A cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 1998; 28: 1022-1028.

Nyman S, Lindhe J, Ericsson I. The effect of progressive tooth mobility on destructive periodontitis in the dog. *J Clin Periodontol.* 1978; 5(3): 213-25.

O'Brien CP. Dependência e uso abusivo de drogas, em: Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 1996. p. 405-420.

Organização Mundial de Saúde. *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10.* Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

Organização Mundial da Saúde. *Tabagismo e saúde nos países em desenvolvimento.* Instituto Nacional do Câncer. 2003. 15p. [acesso 2008 Out 01]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tabagismo_saude.pdf

Organización Panamericana de la Salud. World Bank. *La epidemia del tabaquismo: los gobiernos y los aspectos económicos del control del tabaco.* Washington, DC; 2000. Publicación Científica 577.

Orleans CT, Slade J. *Nicotine Addiction: principles and management.* New York: Oxford University Press; 1993.

Petersen PE. Global framework convention on tobacco control: the implications for oral health. *Community Dent Health.* 2003 Sep; 20 (3): 137-8.

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Skoumas J, Tzioumis K, CStefanadis C, Toutouzas P. Association between exposure to environmental tobacco smoke and the development of acute coronary syndromes: the CARDIO2000 case-control study. *Tobacco Control.* 2002; 11: 220-225. [acesso 2008 Set 18]. Disponível em: <http://tobaccocontrol.bmj.com/cgi/content/abstract/11/3/220>

Ramfjord SP, Ash MM Jr. Significance of occlusion in the etiology and treatment of early, moderate, and advanced periodontitis. *J Periodontol.* 1981; 52(9): 511-7.

Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNS synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Biol Med.* 1991. May; 197(1); 36-43.

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

Robertson CR, Richard, HD. Health law and ethics. Prying open the door to the tobacco industry's secret about nicotine: The Minnesota tobacco trial. JAMA. 1998. 280:1173.

Rosa GM, Lucas GQ, Lucas ON. Cigarette smoking and alveolar bone in young adults: a study using digitized radiographs. J Periodontol. 2008 Feb; 79(2): 232-44.

Rosemberg J. Nicotina Droga Universal. Instituto Nacional de Câncer. [acesso 2008 Set 30]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>.

Rota MT, Poggi P, Boratto R. Human gingival fibroblast cytoskeleton is a target for volatile smoke components. J Periodontol. 2001 Jun; 72(6): 709-13.

Saldanha JB, Casati MZ, Neto FH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimensions and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans. J Oral Maxillofac Surg. 2006 Sep; 64(9): 1359-65.

Sallum AW. Traumatismo periodontal em condições normais e modificadas pela administração sistêmica do corticosteróide dexametasona: estudo experimental em sagüis (*Clithrix jacchus*). [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 1973.

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

Seelig MF, de Campos CRJ, Carvalho JC. A ventilação e a fumaça ambiental de cigarros. Ciênc. saúde coletiva. 2005 set/dez; 10 (0 suppl).

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

Silcox DH 3rd, Daftari T, Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Whitesides TE Jr. The effect of nicotine on spinal fusion. Spine. 1995; 20(14): 1549-53.

Silverstein P. Smoking and wound healing. Am J Med. 1992; 93: 22-24.

Stahl SS. Accommodation of the periodontium to occlusal trauma and inflammatory periodontal disease. Periodontics. 1978 May; 68(5): 35-38.

Stark MJ, Rohde K, Maher JE, Pizacani BA, Dent CW, Bard R, Carmella SG, Benoit AR, Thomson NM, Hecht SS. The impact of clean indoor air exemptions and preemption policies on the prevalence of a tobacco-specific lung carcinogen among nonsmoking bar and restaurant workers. *American Journal of Public Health*. 2007 aug; 97 (8): 1457-63. [acesso em 2008 Out 01]. Disponível em: <http://www.ajph.org/cgi/content/abstract/97/8/1457>

Stefani CM, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW, Nociti Jr FH. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol*. 2002; 73: 206-212.

Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S, Motohashi M, Maeno M. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci*. 2006 Mar 6;78(15):1733-40.

Taylor P. Agentes que Atuam na Junção Neuromuscular e nos Gânglios Autônomos. In: Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996; p. 131-145.

Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF. The effect of cigarette smoking on the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar; 155(3): 1021-6.

The American Academy of Periodontology. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-112.

The American Academy of Periodontology. Parameter on occlusal traumatism in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71 (5 suppl): 873-875.

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

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

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

U.S. Dept. of Health and Human Services. *Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General*. U.S. Dept. of

Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. Rockville, 1989. 712p. [acesso 2008 Out 15]. Disponível em: http://profiles.nlm.nih.gov/NN/B/B/X/S/_/nnbbxs.pdf

Vanscheeuwijcka PM, Teredesaib A, Terpstra PM, Verbeeck J, Kuhl P, Gerstenberg B, Gebel S, Carminesc EL. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40: 113–131.

Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 2001 May; 68(5): 259-70.

Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. Nicotine regulation of c-fos and osteopontin expression in human derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone*. 2001; 28: 603-608.

World Health Organization. Tobacco Free Initiative. 2003. [acesso em 2008 Out 10]. Disponível em: <http://tobacco.who.int/index.cfm>

World Health Organization. Institute for Global Tobacco Control Johns Hopkins School of Public Health. Woman and the tobacco epidemic: challenges for the 21th century. Canada; 2001.

World Health Organization. Air quality guidelines for Europe. World Health Organization. Copenhagen; 2000.

World Health Organization. Policy recommendations on protection from exposure to second-hand tobacco smoke. Geneva: 2007. [acesso em 2008 Out 20]. Disponível em: http://www.who.int/tobacco/resources/publications/wntd/2007/pol_recommendation_s/en/index.html

World Health Organization. Report on the global tobacco epidemic. Switzerland. 2008. 329p. [acesso 2008 Out 30]. Disponível em: http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf

Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. 1999 Nov 3; 383(3): 387-93.

ANEXO1 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

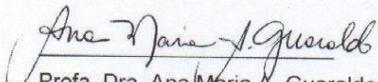
CERTIFICADO

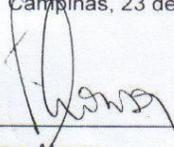
Certificamos que o Protocolo nº 1245-1, sobre "Avaliação da inalação da fumaça de cigarro sobre as alterações ósseas indizadas por trauma oclusal. Estudo histométrico em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum / Mirella Lindoso Gomes Campos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 23 de abril de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1245-1, entitled "The influence of cigarette smoke inhalation on alveolar bone lesion induced by occlusal trauma: a histometric study in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on april 23, 2007.

Campinas, 23 de abril de 2007.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

ANEXO2 – Correlação Intra-Classe

Respectivas leituras de 20 cortes escolhidos aleatoriamente para determinação do coeficiente de correlação intra-classe.

Lâmina	1a leitura	2a leitura
68_6_4	72	71
28_4_3	61	63
4_1_2	156	153
72_3_5	94	115
44_8_4	115	113
35_8_5	93	103
36_10_2	151	149
32_10_3	98	98
20_6_4	114	106
15_4_2	64	63
28_4_3	61	73
37_8_5	80	92
45_2_1	216	215
18_2_3	154	153
10_10_6	119	108
5_9_4	74	72
4_8_4	124	114
3_4_2	124	121
2_8_4	107	102
1_1_1	116	115

ANEXO 3 - Leituras de Reabsorção Óssea

Médias de áreas de reabsorção óssea em mm² de cada animal e do grupo.

Grupo/Período	Animal	Média área reabsorvida por animal	Média Grupo
28 dias IFC+TO	37	0,496	0,6692745
	44	0,77888	
	26	0,77696	
	13	0,81856	
	57	0,49984	
	1	0,64512	
	61	0,71872	
	35	0,620116	
21 dias IFC+TO	22	0,89984	0,78184
	25	0,72896	
	30	0,49856	
	40	0,9056	
	64	0,85824	
	69	0,73216	
	71	0,78656	
	85	0,8448	
14 dias IFC+TO	4	0,8256	0,927098125
	11	0,87168	
	24	0,88064	
	41	0,83072	
	63	0,82816	

	80	0,820945	
	42	1,13536	
	45	1,22368	
7 dias IFC+TO	18	0,81408	0,54368
	29	0,31232	
	31	0,29248	
	39	0,416	
	66	0,75712	
	79	0,67136	
	83	0,52608	
	0	0,56	
28 dias TO	33	0,69696	0,721963625
	36	0,80128	
	81	0,69184	
	78	0,4896	
	51	0,841309	
	55	0,78272	
	21	0,752	
	32	0,72	
21 dias TO	7	0,4864	0,62712
	8	0,46848	
	20	0,6656	
	47	0,81344	
	54	0,63552	
	58	0,43328	
	75	0,8288	
	56	0,68544	
14 dias TO	3	0,64064	0,6188
	5	0,54784	
	6	0,39232	

	12	0,67264	
	17	0,84864	
	43	0,7008	
	68	0,48256	
	73	0,66496	
7 dias TO	48	0,72512	0,41568
	50	0,43648	
	59	0,20032	
	87	0,42944	
	90	0,43328	
	82	0,39232	
	60	0,29248	
	38	0,416	
28 dias	P	0,32	0,3288
	N	0,416	
	L	0,288	
	K	0,3648	
	J	0,3008	
	I	0,2752	
	F	0,32	
	A	0,3456	
21 dias	44B	0,2304	0,22
	46B	0,2112	
	48B	0,288	
	51B	0,224	
	54B	0,192	
	60B	0,1856	
	63B	0,224	
	66B	0,2048	
14 dias	7B	0,2752	0,288435

	8B	0,288	
	17B	0,2688	
	18B	0,3008	
	19B	0,2688	
	20B	0,30372	
	59B	0,32	
	68B	0,28216	
7 dias	16B	0,2688	0,30432
	13B	0,30464	
	4B	0,33024	
	61B	0,2752	
	48B	0,25216	
	45B	0,37248	
	41B	0,32256	
	16B	0,30848	