



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



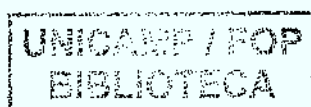
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

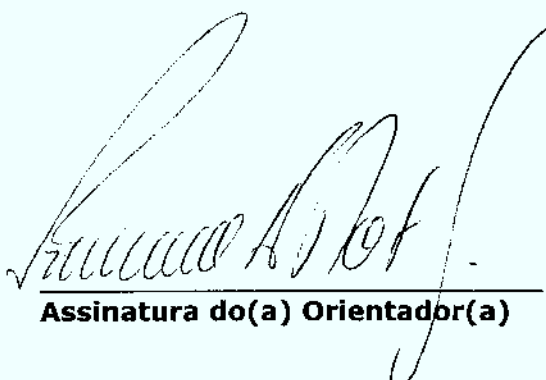
Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Mayra Laino Albiero

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior

Ano de Conclusão do Curso: 2009




Assinatura do(a) Orientador(a)

12-35-3



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



Mayra Laino Albiero

“Efeito da nicotina sobre as células do ligamento periodontal de humanos”

**Monografia apresentada ao Curso
de Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para a obtenção do
Diploma de cirurgião-dentista.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior

**Piracicaba
2009**

Unidade - FOP/UNICAMP

700 / UNICAMP

AL14e Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4948

C ☐ D ☒

Per 16P-134/10

Pl R\$ 11,00

D. 12/08/10

R 771513

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

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

AL14e Albiero, Mayra Laino.
Efeito da nicotina sobre as células do ligamento periodontal de humanos. / Mayra Laino Albiero. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
30f. : il.

Orientador: Francisco Humberto Nociti Junior.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Proliferação celular. 2. Cultura de células. I. Nociti Junior, Francisco Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)



1290004948

TCC/UNICAMP
AL14e
FOP

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem responsáveis por mais esta conquista em minha vida, sempre demonstrando força, me incentivando a superar todos os obstáculos e me impulsionado a alcançar os mais distantes objetivos.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr pela oportunidade concedida durante o curso de graduação de trabalhar com sua pessoa, contribuindo imensamente em minha formação acadêmica.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Karina Gonzales Silvério Ruiz e à Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes pela contribuição científica, apoio, incentivo, paciência e auxílio prestado durante todos os momentos de execução deste trabalho e pela amizade conquistada neste período.

Agradeço aos meus pais José Urbano e Maria Teresa, e à minha irmã Thays por terem sempre me apoiado e por terem me proporcionado a força necessária para seguir em frente sempre, sem vocês nada disso teria sentido, muito obrigada.

Agradeço ao meu namorado, Wellington, que sempre me apoiou em minhas decisões, esteve ao meu lado nos momentos difíceis, comemorou minhas conquistas e sem o qual eu nunca teria conseguido vencer esta etapa da minha vida. Obrigada.

Agradeço às minhas queridas amigas, que fizeram desta jornada um lindo caminho, cheio de companheirismo e amizade, uma amizade que nasceu aqui, mas que florescerá por toda a vida, não importa a distância.

Sumário	Página
1. Resumo.....	5
2. Abstract.....	6
3. Introdução.....	7
4. Objetivos.....	9
5. Materiais e Métodos.....	10
6. Análise Estatística	13
7. Resultados	14
8. Discussão	15
9. Conclusões	17
10. Referências Bibliográficas	18

Lista de Ilustrações

Figura 1. Aparência microscópica das células do ligamento periodontal.....	20
Figura 2. Gráfico de Proliferação celular	21
Figura 3. Gráfico dos Ensaios de Vermelho de Alizarina e von Kossa.....	22

Resumo

Introdução: A regeneração dos tecidos periodontais de suporte depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente. *In vitro*, essas células têm apresentado alterações em relação à sua capacidade proliferativa e redução na atividade da fosfatase alcalina, quando cultivadas na presença de diferentes concentrações de nicotina. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da nicotina nas concentrações de 50ng a 5µg/ml sobre a proliferação e viabilidade celular e formação de nódulos minerais. **Métodos:** Cultura primária de células do ligamento periodontal foram obtidas a partir de molares inclusos de 5 doadores do sexo masculino e cultivadas na presença ou ausência das concentrações de nicotina e avaliadas quanto a proliferação e viabilidade celular por meio do reagente MTS, e formação de nódulos minerais pelo ensaio de von Kossa. **Resultados:** A análise dos dados mostrou que todas as concentrações de nicotina testadas estimularam a proliferação celular, não havendo diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle ($p=1,00$). Adicionalmente, as 5 populações celulares mantiveram o mesmo padrão de formação de nódulo mineral comparadas ao grupo controle. **Conclusão:** Os resultados preliminares sugerem que as concentrações de nicotina testadas não influenciaram na capacidade proliferativa e de mineralização das células.

Palavras-chave: mineralização, proliferação celular, regeneração periodontal, cultura de células, diferenciação celular.

Abstract

Introduction:The periodontal support tissue regeneration depends on the migration and proliferation of the remanescant periodontal ligament cells. In vitro, these cells have shown alterations in their capacity of proliferation and alkaline phosphatase activity reduction if cultivated in the presence of different nicotine concentrations. **Objectives:**The aim of this work was to evaluate the nicotine effect in concentrations from 50ng to 5µg/ml upon cells proliferation and viability and mineral nodules formation. **Methods:**Primary culture of the periodontal ligament cells were obtained from impacted molars of 5 male donors and cultivated in the presence or absence of nicotine concentrations and evaluated the cells proliferation and viability with MTS reagent, and the formation of mineral nodules through Von Kossa assay. **Results:**The data analysis showed that all of the tested nicotine concentrations promoted cell proliferation, not showing statistically significant difference when compared to control group ($p=1,00$). Additionally, the 5 populations maintained the same patterns of mineral nodules formation when compared to control group. **Conclusion:** The preliminary results suggest that the tested nicotine concentrations didn't influence the proliferation and mineralization cells capacity.

Key-words: mineralization, cell proliferation, periodontal regeneration, cell culture, cell differentiation.

INTRODUÇÃO

O tabagismo consiste em um dos fatores de risco mais significativo para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal inflamatória (Genco 1996). Diversos estudos têm demonstrado haver uma forte associação entre fumo e aumento da incidência e severidade da doença periodontal destrutiva (Haber & Kent 1992, Grossi et al. 1994), perda óssea alveolar (Feldman et al. 1983, Bergstrom et al. 1991, Grossi et al. 1995) e pobre resposta à terapia periodontal (Preber & Bergstrom 1990, Newman et al. 1994, Bergstrom & Preber 1994).

Localmente, o uso do tabaco causa uma redução na circulação sanguínea gengival, com conseqüente diminuição da oxigenação e do número de células circulantes (Bergstrom & Preber 1986, Bergstrom et al. 1988). Sistemicamente, o tabagismo pode afetar a resposta imune celular e humoral por meio da redução na produção de anticorpos (Finklea et al. 1971) e pela inibição da função dos neutrófilos sanguíneos periféricos (MacFarlane et al. 1992, Nowak & Ruta 1990), afetando principalmente, suas atividades quimiotática e fagocitária. Esse conjunto de alterações local e sistêmica encontra-se associado ao enfraquecimento das respostas de defesa e de reparo dos pacientes com doença periodontal inflamatória (Bridges et al. 1977, Corberand et al. 1979).

Dentre os vários componentes do tabaco, a nicotina parece ser a principal responsável por essas alterações. A nicotina ganha acesso na circulação sanguínea através da absorção direta pelos tecidos mole da cavidade bucal, pela liberação tardia da nicotina aderida à superfície dental, mas principalmente, pelos pulmões (Cuff et al., 1989). No plasma sanguíneo o nível de nicotina pode variar de 15 ng a 2 µg/ml, e diversos fatores influenciam nessa ampla variação tais como: tipo de tabaco utilizado, a frequência e tempo de início do hábito, o metabolismo e a capacidade de absorção de cada indivíduo (Russell et al. 1975, Armitage et al. 1975, Russell et al 1980, Pereira et al. 2008). Estudos que avaliaram *in vitro* diferentes concentrações de nicotina correspondente ao seu nível no plasma sanguíneo (15ng a 2 µg/ml), têm demonstrado efeitos prejudiciais desta substância sobre as células do ligamento periodontal de humanos e fibroblastos gengivais incluindo, inibição da adesão e proliferação celular, redução da síntese de proteínas (colágeno e fibronectina) e degradação da matriz

colágena (Tipton & Dabbous 1995, Alpar et al. 1998, James et al. 1999, Chang et al. 2002). Esses dados sugerem uma ação catabólica da nicotina nos tecidos periodontais, resultando na destruição da matriz extracelular do ligamento periodontal e do tecido gengival.

Em relação à regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos em decorrência da doença periodontal inflamatória, atualmente, sabe-se que esta depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes da matriz extracelular. Além disso, estudos prévios têm mostrado que as células do ligamento periodontal possuem propriedades de células osteoblásticas/cementoblásticas as quais incluem, capacidade de formar nódulos minerais *in vitro*, associada ao aumento da expressão de fosfatase alcalina (Oyung et al. 2000, Pitaru et al., 2002).

Giannopoulou et al.(1999) observaram uma redução na atividade da fosfatase alcalina quando as células do ligamento periodontal de humanos foram incubadas na presença de diferentes doses de nicotina (5ng a 2 µg/ml). Em osteoblastos, Tanaka et al. (2005) verificaram que a nicotina induz a redução da capacidade proliferativa, além de ocasionar uma queda na expressão do colágeno tipo I e na atividade da fosfatase alcalina, retardando a formação dos nódulos minerais. Resultados similares também foram encontrados por Yanagita et al. (2008) em células da polpa dental. Esses autores verificaram que a nicotina era capaz de reduzir a expressão do gene para sialoproteína óssea (BSP) e da fosfoproteína da matriz dentinária – 1 (DMP-1), além de inibir a formação de nódulos minerais. Considerando que o aumento na atividade da fosfatase alcalina precede à deposição mineral na matriz colágena, é possível acreditar que a nicotina possa inibir ou pelo menos retardar o processo de diferenciação cementoblástica/osteoblástica pelas células do ligamento periodontal, interferindo então, no reparo ou regeneração dos tecidos periodontais de suporte (Lian & Stain 1992).

Desta maneira, com o intuito de verificar a influência da nicotina na diferenciação cementoblástica/osteoblástica pelas células do ligamento periodontal de humanos, o

presente estudo teve como objetivos avaliar: 1) a capacidade proliferativa e a viabilidade celular e 2) a formação de nódulos minerais.

OBJETIVOS

Considerando que as diferentes concentrações de nicotina detectadas no plasma sanguíneo de pacientes usuários de tabaco, influenciam *in vitro* na capacidade proliferativa e na atividade da fosfatase alcalina das células do ligamento periodontal (Pereira et al., 2008; Giannopoulou et al., 1999; Tanaka et al., 2005), o presente estudo teve como objetivos estudar o efeito da nicotina nas concentrações de 50ng/ml, 100ng/ml, 1ug/ml, 2ug/ml, 5ug/ml na proliferação e viabilidade celular e na formação de nódulos minerais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura primária de células do ligamento periodontal de humanos

Para a realização do estudo foram utilizadas culturas primárias de células do ligamento periodontal, as quais fazem parte de um banco de células da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexos – Figura 1). Para obtenção destas culturas celulares, foi adotado o protocolo descrito por Seo et al. (2004). Brevemente, terceiros molares inclusos indicados para exodontia foram obtidos de 5 pacientes saudáveis entre 19 e 24 anos, não-fumantes, do sexo masculino e sem história de medicação sistêmica nos últimos seis meses. Esses pacientes receberam todas as orientações referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do CNS. Imediatamente após a extração, os dentes foram colocados em um tubo de centrifugação de 15 mL tipo Falcon (BD – Labware) contendo o meio de biópsia composto de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS a 10% (soro fetal bovino), 250 µg/mL de sulfato de gentamicina, 5 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA). Em seguida, os dentes foram lavados cinco vezes com meio de biópsia, e sobre uma placa de petri esterilizada (35 x 100 mm), o ligamento periodontal do terço médio foi removido gentilmente com uma cureta e então, digeridos em uma solução de 3 mg/mL de collagenase tipo 1 (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), e 4 mg/mL de dispase (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), por 1 hora a 37°C. Logo após, a suspensão de células do ligamento periodontal foi obtida “passando” as células através de um “cell strainer” de 100 µm de diâmetro (BD - Labware). Então, essa suspensão celular foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos para eliminação da solução utilizada para o procedimento de digestão tecidual. Em seguida, o pellet celular foi resuspendido em DMEM, FBS a 10%, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (meio de cultura padrão), semeado em placas de cultivo celular de 100 x 20 mm e incubados a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂ e 98% de umidade.

Quando as células atingiram cerca de 70 a 80% de confluência (subconfluência), estas foram tripsinizadas com a solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21 mM (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), resuspendidas em 10 mL de meio de cultura padrão, transferidas para tubos de centrifugação de 15 mL tipo Falcon e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e as células resuspendidas em 3 a 5 mL de DMSO – meio de congelamento (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA). Cada 0,5 mL desta suspensão celular foram transferidos para um criotubo e congelados em nitrogênio líquido. Células entre a segunda e sexta passagem serão utilizadas para os experimentos, os quais serão realizados em triplicata.

2. Diluição da nicotina

A nicotina (Sigma, St Louis, MO, USA) foi reconstituída através da diluição em água destilada para obtenção de uma solução estoque de 1 mg/mL, a qual foi armazenada em freezer -20°C até o uso. No momento da realização de cada experimento, as concentrações de 50ng, 100ng, 1 μg , 2 μg e 5 μg /ml foram obtidas por meio da diluição da nicotina em DMEM a partir da solução estoque.

3. Avaliação do efeito da nicotina na proliferação e viabilidade celular

3.1. Ensaio com MTS

Para a realização do experimento, as cinco populações celulares do ligamento periodontal células entre a segunda e terceira passagem foram semeadas em triplicata, a uma concentração de $1,5 \times 10^4$ células/cm² em placas de 96 well, e mantidas em meio de cultura de padrão por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 2% FBS, 100 μg /mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), contendo ou não nicotina nas concentrações de 50ng/ml, 100ng/ml, 1 μg /ml, 2 μg /ml e 5 μg /ml. Previamente, a nicotina (Sigma, St Louis, MO, USA) foi reconstituída através da diluição em água destilada para obtenção de uma solução estoque de 1 mg/mL, a qual foi armazenada em freezer -20°C até o uso. No momento da realização de cada

experimento, as concentrações acima descritas foram obtidas por meio da diluição da nicotina em DMEM a partir da solução estoque.

Após o início do tratamento as células do ligamento periodontal foram incubadas em estufa umidificada a 37°C, atmosfera saturada em 5% de CO₂ por 10 dias, com troca de meio nos dias 3 e 7. Ao final de cada período (dias 1, 3, 7 e 10), 20ul de CellTiter96® AQueous One Solution Reagent (Promega) foi adicionado em cada poço e as células incubadas a 37°C, 5% CO₂. Após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 490nm, sendo a absorbância correspondente ao reagente MTS tetrazolium que foi bio reduzido em formazan pelas células em proliferação. Desta maneira, em geral, quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis em proliferação por poço.

4. Avaliação do efeito da nicotina na diferenciação cementoblástica/osteoblástica pelas células do ligamento periodontal

4.1. Ensaio de mineralização

As células do ligamento periodontal foram semeadas em placas de 24 orifícios (2 x 10⁵ células/poço) e cultivadas 24 horas na presença de DMEM suplementado com 10% FBS e antibióticos. Após 24 horas, esse meio foi substituído pelo DMEM suplementado com 10% de FBS, 50µg/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato (βGP) e dexametasona (10⁻⁸M), contendo ou não a nicotina nas concentrações descritas no item 2. Então, estas células foram cultivadas por 21 dias para permitir a formação do nódulo mineral, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Para a análise qualitativa da formação dos nódulos minerais, foi realizado o ensaio de Von kossa, na qual as células foram fixadas com etanol e coradas com AgNO₃ para detectar fosfato nos nódulos mineralizados. Para análise quantitativa, a técnica de coloração por Alizarina “red” (Sigma, St Louis, MO, USA) foi utilizada. Então, após o período de 21 dias de troca do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado por 1 hora. O etanol foi aspirado e as células lavadas com água destilada para remover o etanol remanescente. A cada poço foi adicionada 1 mL de uma solução de Alizarina “red” 40 mM (pH 4,2) em temperatura

ambiente por 10 minutos sob agitação. As células foram então lavadas cinco vezes com água, a fim de remover a solução de Alizarina “red”, e 1 mL de PBS foi adicionado a cada poço por 15 minutos sob agitação, a fim de reduzir a coloração não específica. A placa foi fotografada, e o procedimento de descoloração dos nódulos foi realizado para a análise quantitativa. Para promover a descoloração dos nódulos, foi adicionado 1 mL de uma solução de cloreto de cetilperidina a 10% (pH 7,0) por 15 minutos e as alíquotas desta solução submetidas à análise em um leitor de placas utilizando-se um comprimento de onda de 562nm.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foram obtidos a média e desvio padrão. As análises intergrupo e intragrupo foram realizadas utilizando-se o teste estatístico ANOVA: um critério ($\alpha = 0,05$) seguida pela comparação múltipla pareada pelo teste Student-Newman-Keuls para identificar as diferenças entre os grupos.

Resultados

1. Avaliação do efeito da nicotina na proliferação e viabilidade celular

Os resultados mostraram que as células do ligamento periodontal foram capazes de manterem-se aderidas e proliferativas em todas as concentrações de nicotina (50 ng a 5 µg/ml) (Figuras 1A-1D). Além disso, nenhuma alteração morfológica foi observada ao longo dos 10 dias de tratamento com todas as doses. Para a avaliação da proliferação e viabilidade celular, foram estabelecidas as médias e os desvios-padrão das cinco populações celulares para cada concentração de nicotina, dentro de cada período estudado. A análise dos resultados mostrou que ao longo do experimento de proliferação celular as cinco concentrações de nicotina estimularam a proliferação das células do ligamento periodontal, no entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p = 1,00$) (Figura 2). Ao comparar o efeito da nicotina dentro de cada período, verificou-se que, o efeito estimulatório foi tempo-dependente e não dose-dependente. A partir do terceiro dia em cultura, todas as concentrações de nicotina aumentaram a proliferação celular tal como o grupo controle, e esse aumento manteve-se significativo até sétimo dia ($p < 0,05$). Após 7 dias em cultura, foi observada uma estabilização na proliferação celular para todos os grupos estudado, não havendo diferença entre eles ($p = 0,99$) (Figura 3).

2. Avaliação do efeito da nicotina na mineralização e formação de nódulos minerais.

Os resultados mostraram que as células do ligamento periodontal foram capazes de formar nódulos minerais em todas as concentrações de nicotina (50 ng a 5 µg/ml). Para a avaliação da mineralização celular, foram estabelecidas as médias e os desvios-padrão das cinco populações celulares para cada concentração de nicotina, dentro de cada período estudado. A análise dos resultados mostrou que ao longo do experimento de mineralização celular as cinco concentrações de nicotina mantiveram a formação de nódulos minerais, no entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p = 1,00$) (Figura 3).

DISCUSSÃO

De acordo com alguns estudos prévios, as diferentes concentrações de nicotina detectadas no plasma sanguíneo de pacientes usuários de tabaco, influenciam *in vitro* na capacidade proliferativa e na atividade da fosfatase alcalina das células do ligamento periodontal (Pereira et al., 2008; Giannopoulou et al., 1999; Tanaka et al., 2005). Por essa razão, o presente estudo teve como objetivos estudar o efeito da nicotina nas concentrações de 50ng/ml, 100ng/ml, 1ug/ml, 2ug/ml, 5ug/ml na proliferação e viabilidade celular, e na formação de nódulos minerais.

Em relação à proliferação celular, as diferentes concentrações de nicotina na alteraram o padrão de proliferação celular comparado ao grupo controle. Além disso, após 3 dias em cultura, todos os tratamentos, incluindo os grupos tratados com nicotina, mostraram-se significativamente proliferativos comparados ao dia 1 em cultura. Resultados similares foram observados por James et al. (1999), os quais avaliaram o efeito de baixas (5 ng a 100 µg/ml) e altas (0.5 a 10 mg/ml) concentrações de nicotina na proliferação e adesão de células do ligamento periodontal. Segundo os autores, baixas concentrações de nicotina e as altas concentrações variando entre 0.5 mg até 1 mg/ml estimularam a proliferação celular a partir do primeiro dia em cultura de maneira similar às células cultivadas em DMEM suplementado com 1% FCS (Fetal Calf Serum), e esse efeito estimulatório manteve-se até o sétimo dia em cultura. Além disso, os autores observaram que somente altas concentrações de 5 e 10 mg/ml de nicotina foram capazes de inibir a adesão e a proliferação das células do ligamento periodontal. Por outro lado, Giannopoulou et al. (1999) verificaram que concentrações de nicotina tão baixas quanto 100 ng a 2 µg/ml eram capazes de promover uma inibição de maneira dose-dependente da proliferação celular após 24 e 48 horas em cultura. Além disso, deve-se considerar que as células do ligamento periodontal são constituídas por tipos celulares heterogêneos com diferentes fenótipos, os quais podem influenciar na expressão de receptores para nicotina e conseqüentemente, na sua resposta proliferativa (Bartold et al., 2000; Shimono et al., 2003).

Vale ressaltar que, diferenças quanto às metodologias de cultura celular e de avaliação da proliferação podem influenciar nos resultados observados. No presente estudo, semelhante à metodologia aplicada por James et al. (1999), as células do

ligamento periodontal foram cultivadas na presença de nicotina em DMEM suplementado com 2% FBS e avaliou-se a proliferação celular por meio de um teste colorimétrico. Entretanto, no estudo realizado por Giannopoulou et al. (1999), os autores trataram as células do ligamento periodontal com nicotina na ausência de soro fetal bovino, o qual pode ter influenciado na capacidade de adesão e proliferação celular

Quando a capacidade de mineralização das células do ligamento periodontal foi avaliada, observou-se que as células tratadas com as diferentes concentrações de nicotina apresentaram o mesmo padrão de formação de nódulos minerais comparadas ao grupo controle, representado pelas células cultivadas na presença de meio osteogênico. Embora não exista na literatura nenhum estudo que tenha avaliado o efeito da nicotina na formação de nódulos minerais pelas células do ligamento periodontal de humanos, Giannopoulou et al. (1999) observaram que somente as maiores concentrações de nicotina (100 e 250 µg/ml) foram capazes de reduzir a atividade da fosfatase alcalina pelas células do ligamento periodontal após 24 e 48 horas de exposição. Contudo, concentrações mais baixas (1 e 5 µg/ml) de nicotina não influenciaram na atividade da fosfatase alcalina pelas células do ligamento periodontal.

De fato, a inibição da mineralização celular parece estar relacionada à concentração de nicotina a qual as células são expostas. Em cultura primária de células da polpa, Yanagita et al. (2008) verificaram que as concentrações de nicotina variando de 10^{-8} a 10^{-3} M, inibiam a formação nódulos minerais revelados pelo ensaio de Alizarina *red*. Embora existam diferenças quanto aos tipos celulares estudados e metodologias de avaliação da capacidade de mineralização celular, pode-se sugerir que as concentrações plasmáticas de nicotina não alteram o padrão de mineralização das células do ligamento periodontal de humanos. No entanto, novos estudos são necessários para avaliar se a nicotina altera o padrão de expressão dos genes relacionados ao processo de diferenciação cementoblástica/osteoblástica pelas células do ligamento periodontal, ou até mesmo, se as concentrações plasmáticas da nicotina ativam algum mecanismo de antioxidantes intra-celulares, neutralizando os seus potenciais efeitos negativos.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, sugerimos que as concentrações de nicotina estudadas não influenciaram a capacidade proliferativa e de mineralização das células do ligamento periodontal de humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armitage AK, Dollery CT, George CF, Houseman TH, Lewis PJ, Turner DM. Absorption and metabolism of nicotine from cigarette. *Br Med J* 1975; 4: 313-316.
- Alpar B, Leyhausen G, Spotnick A, Günay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingiva fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998;2:40-6.
- Bergstrom J, Preber H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res* 1986;21:668-76.
- Bergstrom J, Persson L, Preber H. Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Scand J Dent Res* 1988;96:34-9.
- Bergstrom J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol* 1991;62(4):242-6.
- Bergstrom J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol* 1994;65:545-50.
- Bridges RB, Kraal JH, Huang LJ, Chancellor MB. Effects of cigarette smoke components on in vitro chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1977;16:240-8.
- Corberand J, Nguyen F, Do AH, Dutau G, Laharrague P, Fontanilles AM, Gleizes B. Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1979;23:577-81.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures *in vitro*. *J Periodontol Res* 2002, 37: 279-285.
- Cuff MJA et al., The presence of nicotine on root surfaces of periodontal disease teeth in smokers. *J Periodontol* 1989; 60: 564-569.
- Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol* 1983;54(8):481-7.
- Finklea JF, Hasselblad V, Riggan WB, Nelson WC, Hammer DI, Newill VA. Cigarette smoking and hemagglutination inhibition response to influenza after natural disease and immunization. *Am Rev Respir Dis* 1971;104:368-76.
- Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996;67:1041-1049.
- Giannopoulou C, Geinoz a, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 1999 Jan;26(1):49-55.
- Grossi SG, Zambon JL, Hu AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd JJ, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-267.
- 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;66:23-9.
- Haber J, Kent KL. Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol* 1992;63:100-106.
- James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999;70:518-25.
- Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthopedic Journal* 1992;15: 118-140.

- MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol* 1992;63:908-13.
- Newman MG, Kornman KS, Holtzman S. Association of clinical risk factors with treatment outcomes. *J Periodontol* 1994;65:489-97.
- Nowak D, Ruta U. Nicotine inhibits alpha-1-proteinase inhibitor inactivation by oxidants derived from human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Pathol* 1990;38:249-55.
- Ouyang H, McCauley LK, Berry JE, D'Errico JA, Strayhorn CL, Somerman MJ. Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in vitro. *Arch Oral Biol*. 2000; 45:293-303.
- Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. *Clin Oral Impl Res*. 2008; 19: 582-589.
- Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; 43:257-264.
- Preber H, Bergstrom J. The effect of non-surgical treatment of periodontal pockets in smokers and non-smokers. *Acta OdontolScand* 1986;44:85-89.
- Preber H, Bergstrom J. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol* 1990;17(5):324-8.
- Tanaka H, Tanabe N, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M, Maeno M. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Science* 2005; 77: 2273-2284.
- Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:1056-64.
- Yanagita M, Kashigawa Y, Kobayashi R, Tonoeda M, Shimabukuro Y, Murakami S. Nicotine inhibits mineralization of human dental pulp cell. *J Endod* 2008; 34:1061-1065.

Figuras

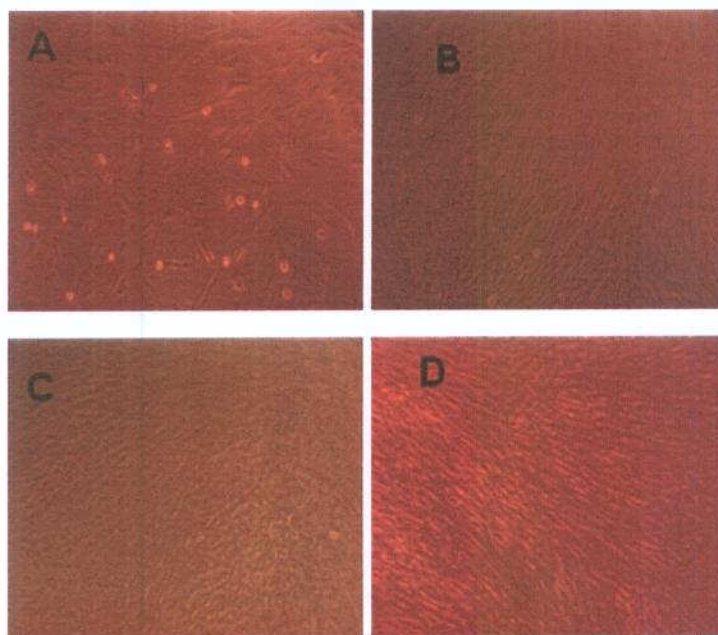


Figura 1. Aparência microscópica das células do ligamento periodontal cultivadas na presença de 5 µg/ml de nicotina durante 24 horas (A), 72 horas (B), 7 dias (C) e 10 dias (D). Células permaneceram aderidas, viáveis e proliferativas ao longo do tratamento . 20x .

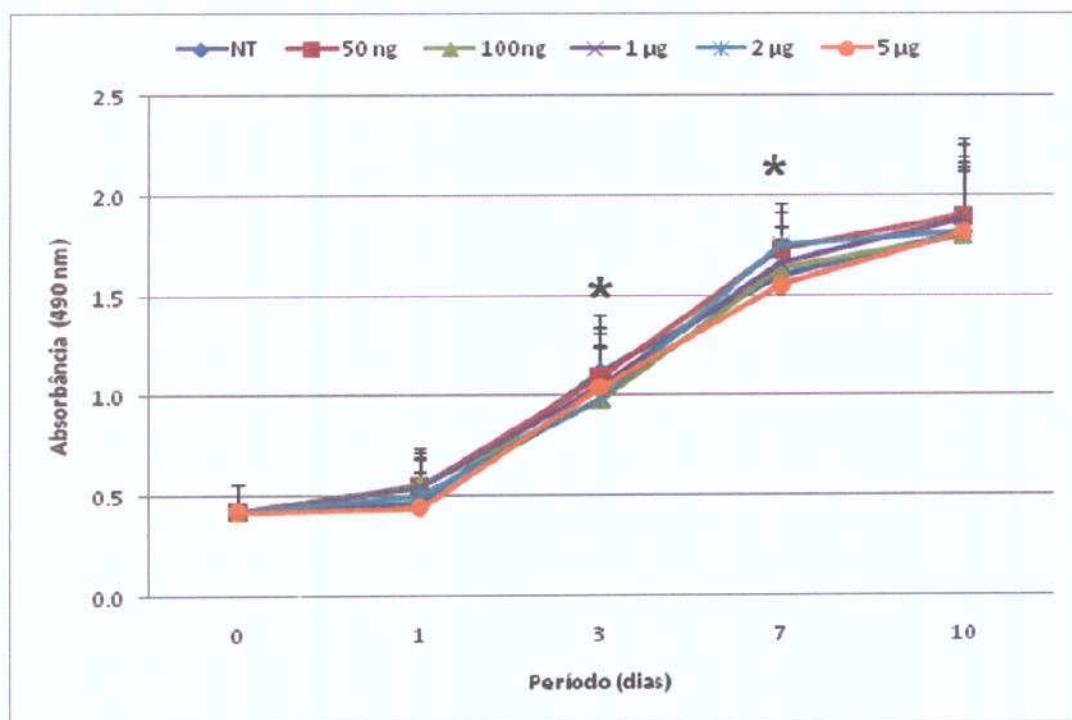


Figura 2. Proliferação celular. Capacidade proliferativa das células do ligamento periodontal submetidas ao tratamento com nicotina e avaliadas nos dias 1, 3, 7 e 10. Os resultados são apresentados como as médias e desvio-padrão das cinco populações celulares. * *Diferença estatisticamente significativa determinada pela análise intragrupo, empregando o teste ANOVA, seguido pela análise múltipla pareada, utilizando-se o método Student-Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$).*

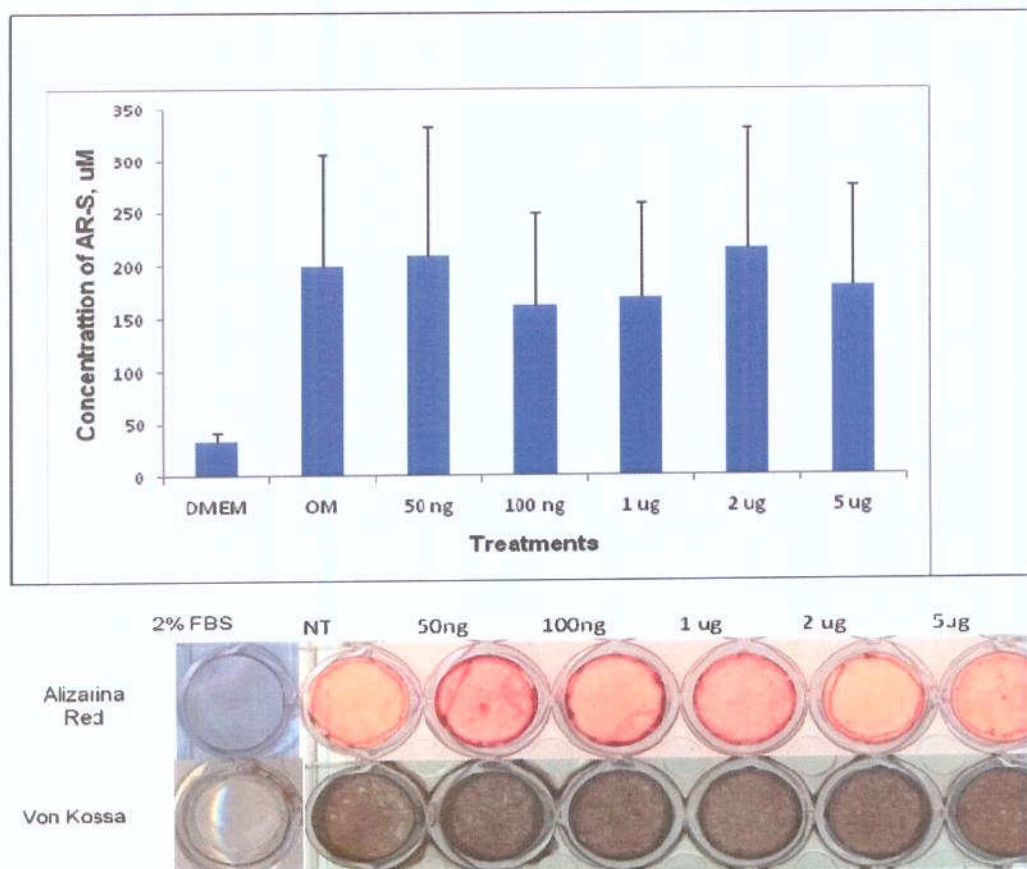


Figura 3: Ensaios de Vermelho de Alizarina e von Kossa. Os valores são expressos como média $\pm$ DP de experimentos independentes, cada um conduzido em triplicata. Células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^4 cel/cm². Após 24h, o meio foi trocado por DMEM suplementado com 2% FBS, 50 μ g/ml de ácido ascórbico (AA), dexametasona (10^{-8} M) e 5 mM de β -glicerofosfato (β GP) contendo as diferentes concentrações de nicotina. As células foram cultivadas por 28 dias com trocas de meio a cada 2-3 dias. Para a marcação qualitativa de von Kossa, as células foram fixadas com etanol e coradas com AgNO₃ para detecção de depósitos de fosfato nos nódulos de mineralização. A mineralização foi quantificada com a coloração do vermelho de Alizarina (detecção de cálcio), seguida de diluição com 10% de cloreto de cetilperidino e espectrofotometria. As cinco populações celulares mantiveram o mesmo padrão de formação de nódulo mineral comparadas ao grupo controle.