

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

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

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

†Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

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

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

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

O mecanismo pelo qual o tabagismo influencia o tecido ósseo é complexo e não está completamente

esclarecido. O fumo do tabaco contém mais de 4000 compostos, muitos dos quais são rapidamente absorvidos e apresentam actividade biológica nos vários tecidos e órgãos. A nicotina existe em quantidade apreciável no fumo do tabaco e tem sido a substância mais estudada na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos nefastos do tabagismo a nível do tecido ósseo. É rapidamente absorvida e tem uma distribuição ampla no organismo devido ao seu carácter lipofílico (15), encontrando-se presente no plasma em concentrações que variam entre 4 e 75 ng/ml (16). A nicotina apresenta uma ampla gama de acções farmacológicas, sendo a vasoconstrição o efeito mais característico (15). A diminuição do fluxo sanguíneo tem repercussões a nível geral e local e influencia de modo mais significativo os processos biológicos com maior actividade metabólica. Assim, estão descritos efeitos negativos da nicotina a nível da resposta imunitária (17,18) e na angiogénese e revascularização (19,20), aspectos que podem afectar de modo indirecto a actividade metabólica a nível do microambiente ósseo. Há vários estudos *in vitro* que mostram que a nicotina/extractos do fumo de tabaco afectam o comportamento de células sanguíneas (17,18), células epiteliais (21), fibroblastos gengivais e periodontais (21-23) e células ósseas (24-29).

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

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

medula óssea humana. O comportamento celular foi estudado na presença de uma gama de concentrações de nicotina representativa dos níveis presentes no plasma e saliva de consumidores de tabaco e avaliado relativamente à morfologia, proliferação, conteúdo em proteína total, actividade de fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada, o evento que reflecte a diferenciação completa do fenótipo osteoblástico.

MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

Obtenção e manutenção das culturas celulares

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

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

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

Morfologia celular

As células em cultura foram observadas diariamente

por microscopia de contraste de fase. Após fixação, foram submetidas a marcação fluorescente dos filamentos de actina e dos núcleos e observadas por microscopia confocal (Laser Scanning Confocal Microscope Leica SP2 AOBS SE - Leica Microsystems, Germany). Este método utiliza um scan pontual emitido por um laser e focado pela objectiva. A detecção dos pontos de luz é realizada por um tubo fotomultiplicador que, através de um sistema computadorizado, é responsável pela formação da imagem.

Proliferação e viabilidade celular. Conteúdo em proteína total

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

Síntese de fosfatase alcalina

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

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

Mineralização da matriz extracelular

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

Concentração de fósforo e cálcio ionizados no meio de cultura. O fósforo e o cálcio ionizados foram determinados por métodos colorimétricos, após tratamento do meio de cultura com ácido tricloroacético a 20% para precipitar o fósforo e o cálcio ligados às

proteínas e aos lípidos. Os resultados foram expressos em mmol por litro de meio (mmol/L).

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

Microscopia electrónica de varrimento. Após fixação, as culturas celulares foram desidratadas com álcool etílico de graduação crescente, submetidas a secagem utilizando o sistema de ponto crítico de CO₂, cobertas com um filme de ouro e observadas num microscópio electrónico de varrimento (Jeol JSM 6301F9, Japão). Este método utiliza o "varrimento" de um feixe de electrões sobre a amostra originando imagens da superfície, por emissão de electrões a partir da amostra. A associação com um espectrofotómetro de raios X permite efectuar uma análise química da amostra.

Análise estatística

Foram efectuadas quatro experiências independentes, sendo as culturas celulares estabelecidas a partir de material biológico proveniente de pacientes diferentes. Observou-se uma relativa variabilidade entre experiências mas o padrão de comportamento das culturas efectuadas em situação controlo e na presença de nicotina foi idêntico nos vários ensaios. Em cada experiência, foram efectuadas 6 réplicas nos ensaios quantitativos e três réplicas nos ensaios qualitativos. Apresentam-se os resultados de uma experiência considerada representativa.

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

RESULTADOS

Efeito da nicotina na morfologia celular

As células de medula óssea em cultura apresentaram um aspecto alongado com prolongamentos citoplasmáticos, núcleo proeminente (com nucléolos evidentes) e membrana celular rica em fosfatase alcalina. Observou-se uma elevada taxa de proliferação celular, com a ocupação da superfície de cultura após cerca de uma semana. O efeito mais característico da nicotina na morfologia celular foi a presença de vacuolização citoplasmática e aumento do tamanho celular para concentrações superiores a 0,2 mg/ml. Este efeito foi evidente nas culturas expostas a 0,3 mg/ml durante a 1ª

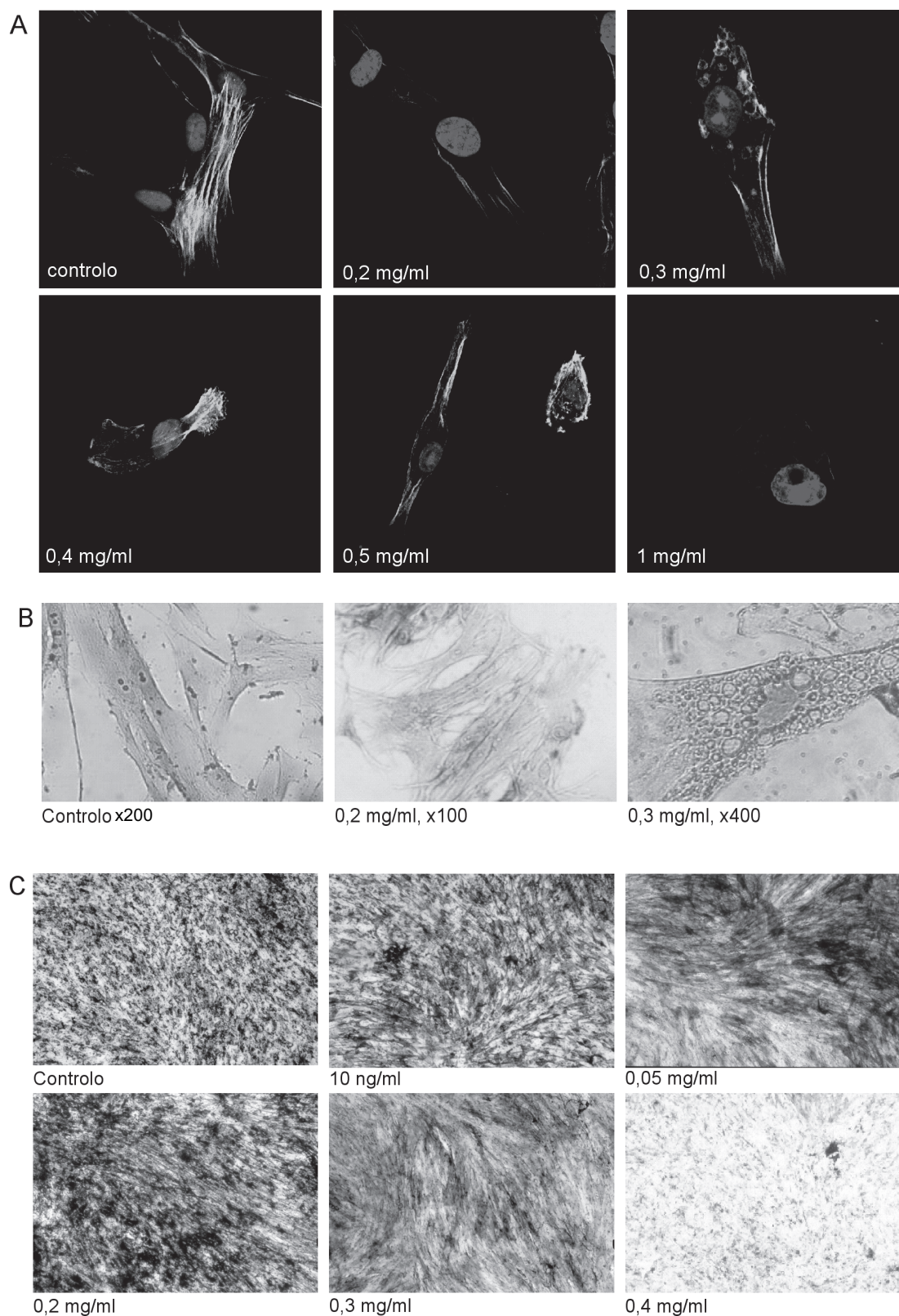


Fig. 1 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1 mg/ml) na morfologia de células osteoblásticas de medula óssea humana.

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

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

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

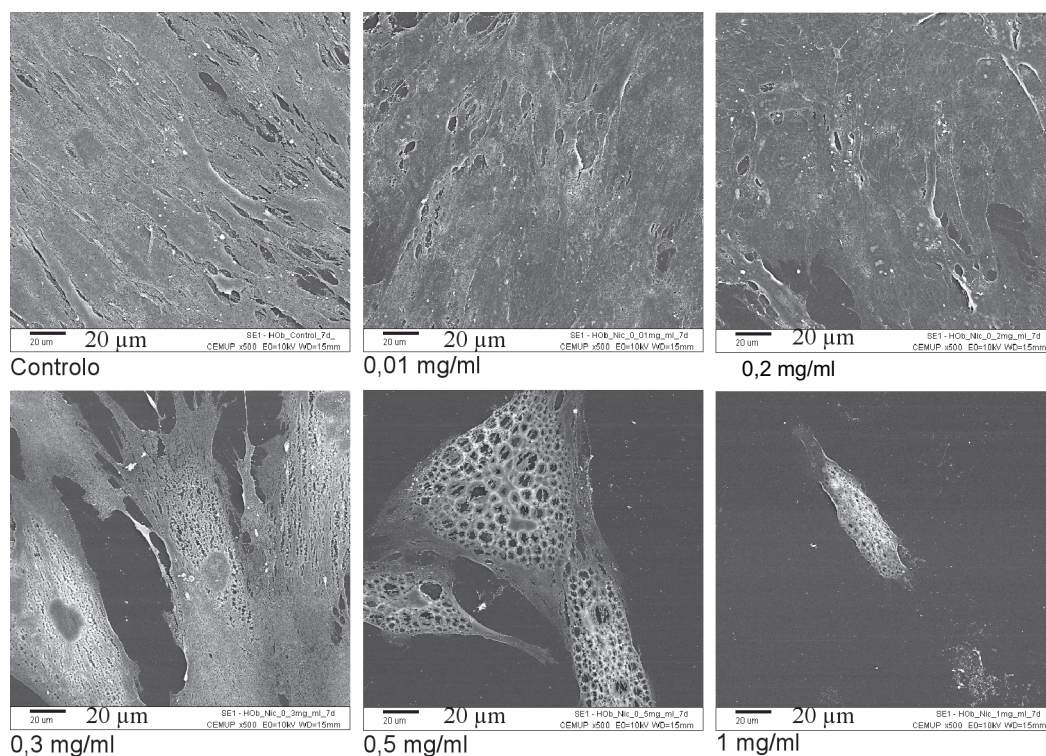


Fig. 2 - Efeito da nicotina (0,01 - 1 mg/ml) na morfologia de células osteoblásticas de medula óssea humana. Microscopia electrónica de varrimento, 7 dias.

semana, mas diminuiu significativamente para tempos de incubação mais longos. No entanto, na presença de níveis mais elevados, a vacuolização citoplasmática foi permanente e dependente da dose. A exposição a 0,5 e 1 mg/ml resultou num efeito citotóxico muito significativo

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

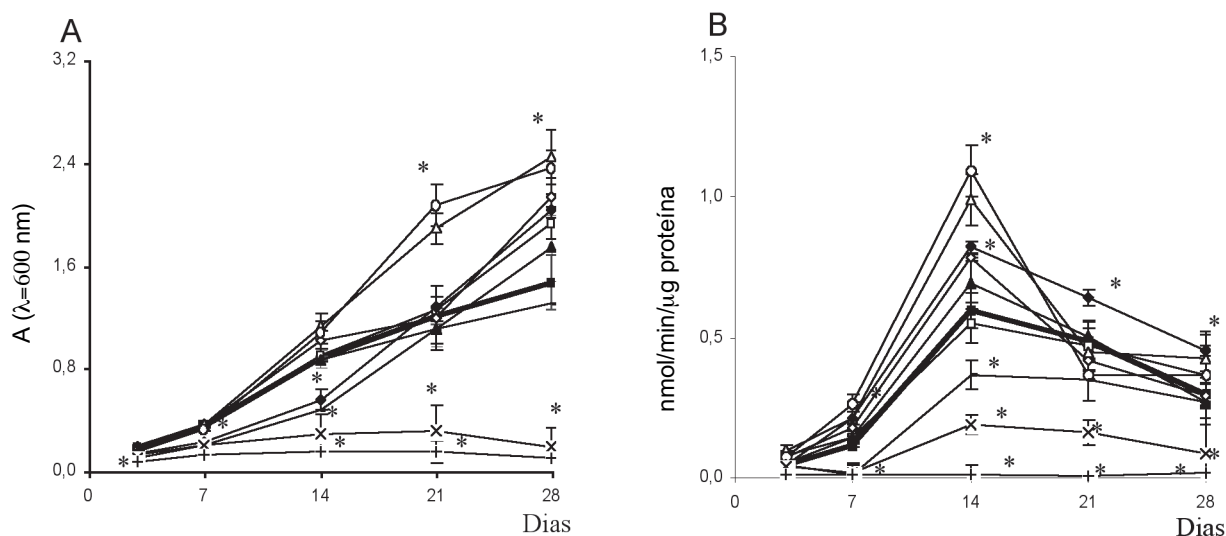


Fig. 3 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1mg/ml) na proliferação/viabilidade celular (A, ensaio do MTT) e actividade de fosfatase alcalina (B) de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana.

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

*Significativamente diferente da situação de controlo.

Efeito da nicotina na proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina

As células de medula óssea proliferaram de forma gradual ao longo de todo o tempo de cultura. A exposição à nicotina traduziu-se por ausência de efeitos significativos na gama 10 ng/ml a 0,05 mg/ml, estimulação na presença de 0,1 e 0,2 mg/ml, efeito inibitório inicial seguido de recuperação durante a exposição a 0,3 e 0,4 mg/ml e diminuição significativa do número de células em cultura após tratamento com 0,5 e 1 mg/ml. Estes resultados mostram-se na Fig. 3A. O conteúdo em proteína total seguiu um padrão semelhante ao observado no ensaio do MTT, providenciando o mesmo tipo de informação.

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

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

Efeito da nicotina na mineralização da matriz

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

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

As culturas controlo apresentaram um aumento significativo dos níveis de Pi durante a 2ª semana de

cultura, comportamento que reflecte a actividade elevada de fosfatase alcalina nesta fase. Na proximidade do dia 14, observou-se uma diminuição da concentração de Pi. Os níveis de Cai mantiveram-se aproximadamente constantes durante as duas primeiras semanas, mas diminuíram significativamente durante a 3ª semana. Estes resultados sugerem que o processo de deposição de fosfato de cálcio se iniciou na proximidade do dia 14 e ocorreu a uma taxa elevada. A nicotina, em concentrações $\leq 0,3$ mg/ml, causou um aumento dos níveis máximos de Pi, particularmente na presença de 0,1 e 0,2 mg/ml; este comportamento é previsível tendo em atenção a estimulação da actividade da fosfatase alcalina nestas situações. O padrão de variação dos níveis de Pi e Cai sugere uma deposição mineral mais precoce nas culturas expostas a concentrações $\leq 0,2$ mg/ml. Níveis superiores causaram um efeito inibitório que se reflectiu por uma taxa de deposição mineral muito baixa nas culturas expostas a 0,3 mg/ml e ausência de mineralização na presença de níveis superiores. Estes resultados são apresentados na Fig. 4A.

Coloração histoquímica e microscopia electrónica de varrimento

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

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

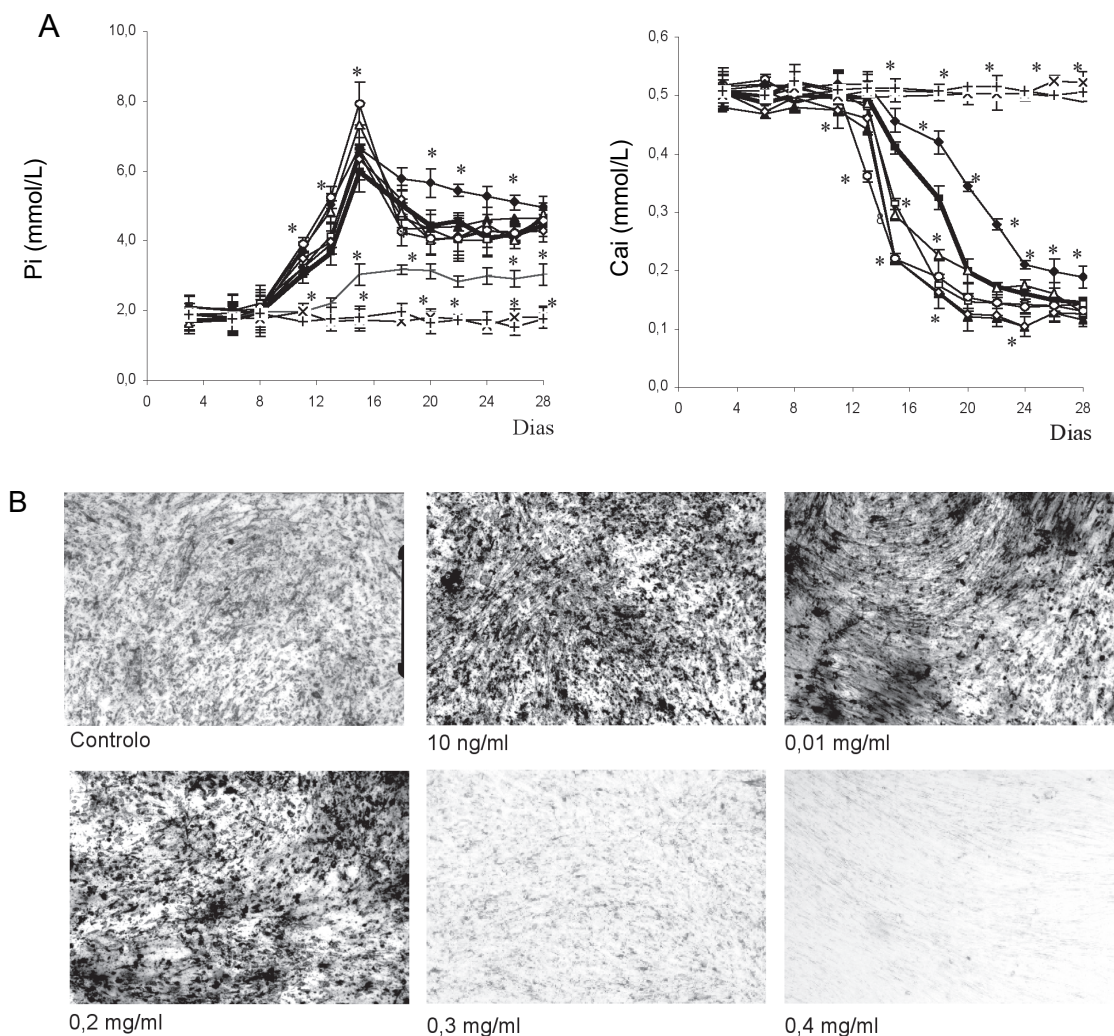


Fig. 4 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 1mg/ml) na capacidade de formação de uma matriz mineralizada em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana.

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

*Significativamente diferente da situação de controlo.

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

formações por difracção de raios X (Fig. 6B) revelou uma composição química rica em cálcio e fósforo.

DISCUSSÃO

A medula óssea é um tecido rico em precursores osteoblásticos (33) e, no presente trabalho, as culturas celulares foram efectuadas na presença de ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona, condições que favorecem a proliferação e a diferenciação de células de linhagem osteoblástica (34,35). Os resultados descritos mostraram que as culturas celulares apresentaram uma

proliferação gradual, que se acompanhou da produção de matriz extracelular abundante, aumento significativo da actividade de fosfatase alcalina durante a 2ª semana e formação de uma matriz mineralizada para tempos de incubação mais longos (essencialmente, durante a 3ª semana). Este comportamento sugere um processo de diferenciação progressivo, que é representativo do desenvolvimento do fenótipo osteoblástico (34). O efeito da nicotina foi estudado na 1ª subcultura, devido à diminuição progressiva da expressão dos parâmetros osteoblásticos com a subcultura sucessiva (35).

A exposição de células osteoblásticas humanas a concentrações plasmáticas de nicotina (10 ng/ml) não

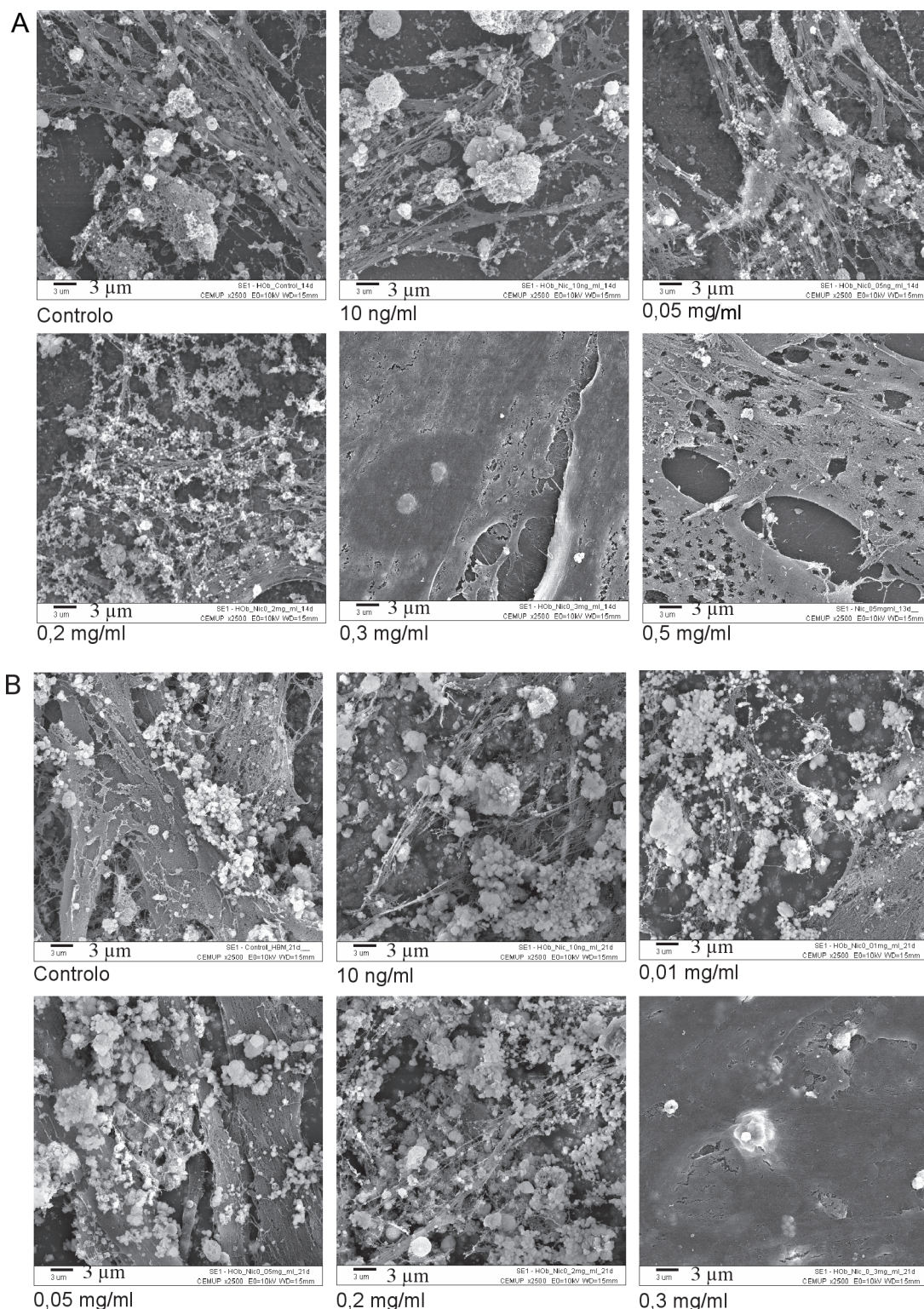


Fig. 5 - Efeito da nicotina (10 ng/ml - 0,5 mg/ml) na mineralização da matriz extracelular em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana. Microscopia electrónica de varrimento, 14 (A) e 21 (B) dias.

provocou alterações significativas no comportamento celular, embora se tenha observado tendência para antecipação do processo de mineralização. A presença de níveis salivares $\leq 0,2$ mg/ml resultou num efeito de estimulação, que se reflectiu num aumento significativo

da proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina, e início mais precoce da mineralização da matriz. Em concentrações superiores, a nicotina provocou um efeito inibitório, que foi ligeiro na presença de 0,3 mg/ml (diminuição inicial da taxa de crescimento celular e

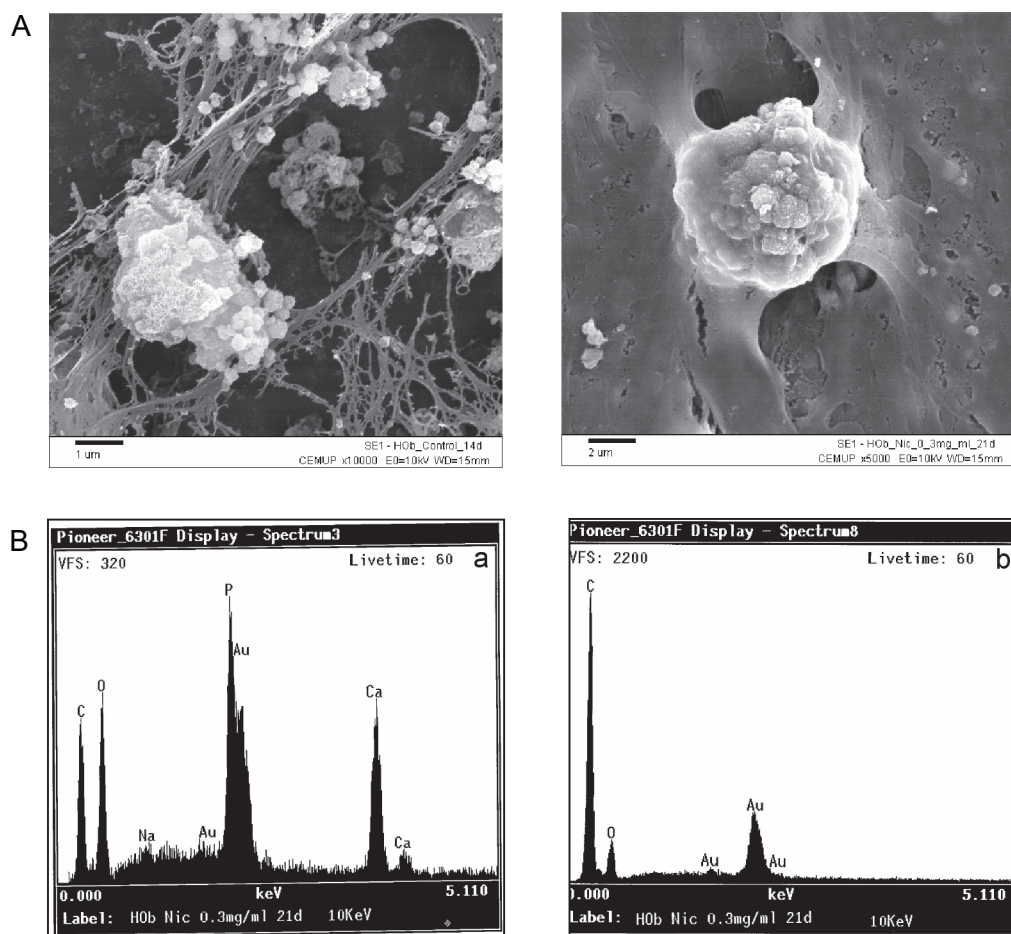


Fig. 6 - A - Pormenor do aspecto das estruturas mineralizadas observadas nas culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana na situação controlo (14 dias) e na presença de 0,3 mg/ml de nicotina (21 dias). Microscopia electrónica de varrimento.

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

deposição mineral lenta), mas significativo nas culturas expostas a níveis superiores. Na presença de 0,5 e 1 mg/ml, observou-se uma diminuição acentuada do número de células em cultura e extensa vacuolização citoplasmática que se manteve durante todo o tempo de cultura. A nicotina é uma base fraca e o carácter lipofílico da forma não ionizada permite uma travessia fácil das membranas celulares. Acumula-se nos lisossomas, devido ao ambiente ácido destes organelos; este processo acompanha-se da entrada de água, convertendo os lisossomas em vacúolos. O comportamento descrito é característico de substâncias básicas e foi observado por vários autores em diferentes tipos celulares (22,36,37). Chamson e col (36) sugeriram que a acumulação de nicotina nos lisossomas pode funcionar como um mecanismo protector contra os efeitos desta substância.

A proliferação das células osteoblásticas está funcionalmente associada com a síntese de uma matriz extracelular colagenosa e a sua acumulação e maturação, essenciais para o processo de mineralização, contribuem para a interrupção da proliferação celular (38). Na presença de iões fosfato (no presente trabalho, provenientes da hidrólise do β -glicerofosfato pela fosfatase

alcalina), a mineralização ocorre quando se observa uma relação apropriada entre a composição e quantidade da matriz e a sua maturação (39,40). A presença de níveis elevados de fosfatase alcalina parece ser necessária para iniciar o processo de mineralização, pois providencia um enriquecimento local de fosfato inorgânico para a nucleação dos cristais de hidroxiapatite (39,40). Subsequentemente, verifica-se a repressão da expressão da enzima, e o aumento da deposição mineral constitui um processo físico-químico que depende da disponibilidade dos iões intervenientes (39,40). O comportamento das culturas controlo observado neste trabalho está de acordo com este modelo, como é evidenciado pela ocorrência de deposição mineral nas zonas da cultura celular que apresentam reacção histoquímica mais intensa para a fosfatase alcalina e, ainda, diminuição significativa da actividade da enzima após o início do processo de mineralização. Os resultados observados na presença de nicotina sugerem que o efeito desta substância na proliferação celular e actividade de fosfatase alcalina parece influenciar o início do processo de mineralização. Nas culturas expostas a níveis de nicotina $\leq 0,2$ mg/ml, o efeito de estimulação do

crescimento celular foi acompanhado por um início mais precoce da deposição mineral. Este facto pode estar relacionado com uma maior taxa de acumulação de matriz extracelular, devido ao maior número de células viáveis e funcionais presentes em cultura. Também, a presença de níveis aumentados de fosfatase alcalina que se observou nesta situação providenciou uma maior disponibilidade de fosfato inorgânico, factor essencial para o início do processo de mineralização. Durante a exposição a 0,3 mg/ml, o efeito inibitório que se verificou nas duas primeiras semanas resultou, muito provavelmente, num atraso na produção e acumulação de matriz, aspecto que pode ter contribuído para um processo de mineralização mais tardio. Na presença de 0,4 mg/ml, a diminuição na proliferação celular e o efeito inibitório na actividade de fosfatase alcalina podem explicar a ausência de mineralização da matriz.

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

Os mecanismos moleculares envolvidos no efeito da nicotina na proliferação e actividade funcional de células osteoblásticas não estão esclarecidos e têm sido pouco estudados. É interessante referir que Walker e col (28) mostraram que o efeito de estimulação da proliferação de

células osteoblásticas derivadas de osso trabecular humano observado na presença de 0,1 a 1 µM de nicotina é acompanhado por um aumento na expressão do gene *c-fos* (responsável, juntamente com o gene *c-jun*, pela expressão do factor de transcrição AP-1). Estes autores mostraram ainda a presença da subunidade $\alpha 4$ dos receptores nicotínicos e sugeriram o envolvimento destes receptores no efeito da nicotina, ao mostrar que o aumento da proliferação celular é inibido de modo dependente da dose pela D-tubocurarina, um antagonista dos receptores nicotínicos. Estes receptores estão directamente acoplados a canais de cálcio e a sua estimulação resulta na entrada de iões cálcio para a célula. Assim, alguns autores têm sugerido, de forma indirecta, o envolvimento deste ião na acção da nicotina (28). O ião cálcio parece ter um papel importante nos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo, nomeadamente o acoplamento entre a formação óssea e a reabsorção óssea (41). Há também estudos que mostram que as células osteoblásticas respondem ao ião cálcio de modo dependente do tempo e da dose, em termos de proliferação celular e expressão de marcadores de diferenciação (42).

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

Agradecimentos:

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

REFERÊNCIAS

- 1 - Kleerekoper M, Avioli L. Evaluation and treatment of Postmenopausal Osteoporosis. In: Favus MJ, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Raven Press. 1993. pp. 223-9.
- 2 - Albandar JM, Adesanya MR, Streckfus CF, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as a risk factor for periodontal disease and tooth loss. J Periodontol 2000;71:1874-81.
- 3 - Schuller AA, Holst D. An "S-shaped" relationship between smoking duration and alveolar bone loss: generating a hypothesis. J Clin Periodontol 2001; 72:1164-71.
- 4 - Heitz-Mayfield LJA. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. J Clin Periodontol 2005;32:196-209.

- 5 - Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of major effect. *BMJ* 1997;315:841-6.
- 6 - Valimaki MJ, Kärkkäinen M, Lamberg-Allardt C, Laitinen K, Alhava E, Heikkinen J. Exercise, smoking, and calcium intake during adolescent and early adulthood as determinants of peak bone mass. *BMJ* 1994;309:230-5.
- 7 - Benson BW, Shulman JD. Inclusion of tobacco exposure as a predictive factor for decreased bone mineral content. *Nicotine and Tobacco Research* 2005;7:719-24.
- 8 - Gerdhem P, Obrant KJ. Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry and Ultrasound. *Osteoporos Int* 2002; 13:932-6.
- 9 - Bergström J. Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long term observation and a hypothesis. *Journal of Clin Periodontol* 2004;4:260-6.
- 10 - Paulender J, Wennstrom JL, Axelsson P, Lindh J. Some risk factors for periodontal bone loss in 50-year-old individuals. A 10-year cohort study. *J Clin Periodontol* 2004;7:489-96.
- 11 - Jansson L, Lavstedt S, Zimmerman M. Prediction of marginal bone loss and tooth loss - a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol* 2002;8:672-8.
- 12 - Bain CA, Moy PK. The influence of smoking on bone quality and implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:123.
- 13 - Hollinger OJ, Schmitt JM, Buck D, Hwang K. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294-301.
- 14 - Esposito M, Hirsch J, Lehholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implant (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721-64.
- 15 - Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Ann Rev Med* 1986;37:21-32.
- 16 - Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *BMJ* 1976;1:1043-6.
- 17 - Marigiò MA, Guida L, Laforgia A, Santacroce R, Curci E, Montemurro P. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? *J Periodont Res* 2001;36:32-9.
- 18 - Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 1995;66:1047-55.
- 19 - Daftari KT, Whitesides TE, Heller JG, Goodrich AC, MacCarey BE, Hutton CW. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine* 1994;19:904-11.
- 20 - Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002;13:3-9.
- 21 - Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndaye A, Jolkovsky DL, Webber RJ et al. Choline acetyltransferase acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 2000;79:939-49.
- 22 - Alpar B, Leyhausen G, Sapotnick A, Günay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingival fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998;2:40-6.
- 23 - James JA, Sayers MN, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999;70:518-25.
- 24 - Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991;12:283-6.
- 25 - Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;197:36-43.
- 26 - Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol* 1999;383:387-93.
- 27 - Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H, Reed E, Rennard SI. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in mono-layer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med* 2001;137:208-19.
- 28 - Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001;28:603-8.
- 29 - Tanaka H, Tanabe N, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, Motohashi M, Masao M et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sciences* 2005;77:2273-84.
- 30 - Cuff MJ, MacQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol* 1989;60:564-9.
- 31 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-7.
- 32 - Gayle M. Bone. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone; 2002. pp.293.
- 33 - Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63-76.
- 34 - Stein GS. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*. Academic Press; 1996. pp.69-86.
- 35 - Coelho MJ, Trigo Cabral A, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and DMEM. *Biomaterials* 2000;21:1087-94.
- 36 - Chamson A, Garrone R, Auger C, Frey J. Effects of Tobacco smoke extracts on the ultrastructure of fibroblasts in culture. *J Submicrosc Cytol* 1980;12:401-6.
- 37 - Ohkuma S, Poole B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J Cell Biol* 1981;90:656-64.
- 38 - Lynch M, Stein J, Stein G, Lian J. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35-44.
- 39 - Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundy JR, Martin TJ, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol 107. Springer-Verlag. 1993. pp.267-98.
- 40 - Bellows CG, Aubin JE, Heersch JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphates. *Bone and Min* 1991;14:27-40.

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

Correspondência:

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

e-mail: mhfernandes@fmd.up.pt