



Efeitos da fumaça de cigarro sobre a osteogênese e a resistência mecânica óssea em ratos

Bueno, A.C.¹; Ribeiro, K.G.¹; Cruz, T.M.¹; Ivo, T.P.F.¹; Nakagaki, W.R.²; Faria, A.R.A.B.³; Camilli, J.A.²; Garcia, J.A.D.⁴; Chavasco, J.K.⁴; Soares, E.A.⁴

¹Acadêmicos dos Cursos de Farmácia e Enfermagem da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. Alfenas, MG.

²Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas, SP

³Médico pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. Alfenas, MG.

⁴Professores Doutores da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS e Membros do Núcleo de Pesquisa em Farmacologia e Cirurgia Experimental. Alfenas, MG.

Recebido 02/06/2010 / Aceito 03/12/2010

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a osteogênese e a resistência mecânica do osso em ratos. Foram utilizados doze ratos machos, divididos em dois grupos (n=6): grupo CT (controle) e grupo CI (cigarro). Durante 12 semanas, os animais do grupo CI foram expostos à fumaça de seis cigarros/dia. Após seis semanas de exposição à fumaça de cigarro, uma falha óssea de 5mm foi produzida no osso parietal e corpos cerâmicos de hidroxiapatita densa (HAD) foram implantados em cavidade produzida cirurgicamente na tíbia dos animais do grupo CI e CT. Após as cirurgias, os animais retornaram aos protocolos experimentais e, ao término de doze semanas de experimentação, foram eutanasiados, as tíbias e os ossos parietais foram coletados para processamento histológico e os fêmures encaminhados para ensaio biomecânico em um módulo MTS TestStar II[®]. A exposição à fumaça do cigarro não interferiu no ganho de peso dos animais e os consumos de dieta líquida e sólida foram satisfatórios entre os grupos. Os animais do grupo CI apresentaram menor volume de osso neoformado na falha óssea (8,9±0,2) produzida no osso parietal e ao redor do implante de HAD na tíbia (33±0,5). A força máxima necessária para romper o fêmur dos animais foi menor no grupo CI (119±3,2) do que no grupo CT (140±6,5). Com bases nos resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que a exposição à fumaça do cigarro interferiu na osteogênese da falha óssea e ao redor do implante de HAD, diminuiu a força máxima necessária para

a ruptura completa dos fêmures e demonstrando a fragilidade óssea causada pelo hábito tabagista.

Palavras-chave: Cigarro. Osso. Hidroxiapatita. Osteogênese.

INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas rígidas que ancoram e protegem vísceras e músculos. No entanto, estão sujeitos a fraturas, deformações e ressecções de tumores, entre outras afecções. Embora os ossos sejam capazes de reparações espontâneas, em grandes lesões ósseas tornam-se necessários os procedimentos cirúrgicos, em que os enxertos ósseos autógenos e/ou os implantes de biomateriais auxiliam o reparo da lesão óssea (Sakakura et al., 2001; Caria et al., 2007). Os enxertos autógenos apresentam capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora, sendo considerados padrão ouro. No entanto, quando a quantidade de osso disponível nas áreas doadoras é insuficiente, este pode ser associado à biomateriais como a hidroxiapatita (HA) (Caria et al., 2007).

A hidroxiapatita sintética é uma biocerâmica amplamente estudada, pois apresenta composição química similar à do osso humano, não é tóxica e possui forte estabilidade química (Soares et al., 2009). Quando utilizada *in vivo*, não apresenta reações inflamatórias severas e antigênicas, sendo, portanto, biocompatível (Ohbayashi et al., 2000). No entanto, a utilização de enxertos autógenos, isoladamente ou associados à biomateriais em pacientes fumantes que necessitem de reconstruções ósseas, é visto com ceticismo devido ao grande número de complicações e perda de enxertos apresentados em estudos clínicos envolvendo fumantes (Sakakura et al., 2001; Esposito et al., 1998).

O sucesso do reparo ósseo está relacionado aos hábitos de vida do paciente e o tabagismo pode comprometer a neoformação óssea, assim como a osseointegração do implante (Soares et al., 2010), uma vez que os componentes

Autor correspondente: Evelise Aline Soares - Núcleo de Pesquisa em Farmacologia e Cirurgia Experimental - Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS - Rua Joaquim Lázaro Gomes, 155 - Jd Aeroporto Alfenas, MG - CEP.37130-000 - tel: 35 3291-7900
e-mail: evelise.soares@unifenas.br

do cigarro podem levar à morte de osteócitos, diminuição da concentração da proteína morfogenética óssea (BMP) e da fosfatase alcalina, podendo também diminuir a densidade mineral óssea (Berley et al., 2010; Zheng et al., 2008). O paciente tabagista apresenta maior possibilidade de insucesso na fixação de implantes, uma vez que a nicotina leva à redução mineral da matriz óssea.

A nicotina presente no cigarro retarda o processo de cicatrização, induz a diminuição do número de neutrófilos e macrófagos e provoca o aumento de agregação plaquetária, o que reduz a microperfusão sanguínea e estimula a formação de microcoágulos, resultando em trombos que, associados à vasoconstrição, geram isquemia tecidual (Sakakura et al., 2001). Além disso, a nicotina estimula a proliferação e adesão do fibroblasto junto ao implante e induz a redução na atividade das células osteogênicas (Kucukdeveci et al., 2009; César-Neto et al., 2006), fatores indesejáveis durante o processo de osseointegração e incorporação de enxertos.

Considerando o grande número de indivíduos tabagistas, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a osteogênese em defeitos preenchidos ou não com HA, bem como sua influência sobre a resistência mecânica do osso em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo Animal

Nesta pesquisa, foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem Wistar (peso corporal médio de 180 ± 25 g), que foram divididos em dois grupos distintos (n=06): grupo controle (CT) e grupo cigarro (CI). Os animais do grupo CI, ao longo de 12 semanas, foram expostos à fumaça de seis cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono. Esse contato foi feito diariamente, no período da manhã, sendo o tempo de exposição diário médio de 15 a 20 minutos. Inicialmente, submetem-se os animais a um período de adaptação de seis dias, em que o número de cigarros queimados foi aumentado gradativamente de um a seis cigarros (Le Mesurier et al., 1983; César-Neto et al., 2006).

Para a exposição à fumaça, os animais do Grupo CI foram colocados em uma caixa de acrílico transparente, com dimensões de $45 \times 25 \times 20$ cm³, contendo uma câmara com orifícios de ventilação e outros orifícios menores na parte superior, em que foram colocados os cigarros para a propagação da fumaça. Após a exposição, os animais desse grupo voltavam à gaiola convencional. A pesagem dos animais e a mensuração do consumo sólido e líquido para calcular a ingestão calórica média foram feitas semanalmente.

Todo o desenho experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), com o Protocolo nº 02 A/2008, respeitando-se a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, regulamentada pela Lei Federal 6.638 (1979), e os princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Procedimento Cirúrgico

Com objetivo de avaliar o efeito da fumaça do cigarro no processo de reparo ósseo, em cada animal foram criados defeitos circulares de 5 mm e 3 mm na região parietal do crânio e tibia, respectivamente, após um período de seis semanas de exposição à fumaça de cigarro. Os animais foram anestesiados com solução 1:1 de quetamina (Francotar®) e cloridrato de xilazina (Virbaxyl® 2%) na dose de 0.10 ml/100g IM, tricotimizados nas regiões a serem avaliadas, seguido por incisão longitudinal na pele, afastamento e exposição da cortical óssea. No osso parietal esquerdo, com auxílio de um Punch trepano, foi criada uma cavidade, a qual foi preenchida com coágulo e suturada. Na epífise proximal da tibia esquerda, foi realizado o defeito e implantada a biocerâmica hidroxiapatita densa (HAD), a qual foi produzida pelo Instituto de Química da Unicamp, apresentando 3mm de diâmetro e 3mm de comprimento. O periósteo no parietal e a tibia foram reposicionados através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0 e a pele foi suturada com fio de algodão 4.0. Ao completar 12 semanas de experimento, os animais sofreram eutanásia através de overdose anestésica.

Processamento Histológico e Morfométrico

O osso parietal esquerdo e a tibia esquerda foram coletados e, imediatamente, fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas, sendo descalcificados de acordo com Soares et al., 2010. Em seguida, os ossos foram reduzidos e incluídos em parafina para microtomia. Cortes transversais semisseriados, com seis micrômetros de espessura, foram corados com hematoxilina/eosina (HE) para análise morfométrica (Soares et al., 2010).

O volume de osso neoformado foi obtido com o auxílio de um retículo quadrilátero de 100 pontos acoplado à ocular do microscópio. Após a contagem dos pontos, foi utilizada a fórmula $V_v = P_p/P_t$ (%), em que V_v = densidade de volume ou volume relativo, P_p = quantidade de pontos sobre o osso neoformado e P_t = número total de pontos do sistema, de acordo com o princípio de Delesse proposto por Mandarim de Lacerda (1999).

Teste Mecânico do Fêmur

Para a realização do teste mecânico, o fêmur esquerdo dos animais foi coletado, limpo e acondicionado em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenados em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio. O fêmur foi submetido ao teste mecânico de resistência no Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp. O ensaio mecânico foi realizado em um módulo de flexão de três pontos (MTS TestStar II) utilizando uma célula de carga de 100 Kgf a uma velocidade de 1.3 mm/min. A distância entre as duas extremidades ósseas foi de 50 mm e, para se obter o valor da resistência, uma carga foi aplicada no terço médio do osso (diáfise) por meio de uma ponta, acoplada em uma máquina de ensaio universal (Soares et al., 2010). A força máxima necessária para a ruptura completa do fêmur foi

obtida após uma célula de carga registrada pelo Módulo de Flexão MTS em Newton (N).

Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o Programa *GraphPad InStat* e, deste, o teste estatístico teste de Tukey escala múltiplo (testes paramétricos). Considerou-se o nível de significância de 5%, ou seja, os dados foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, sendo os resultados expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

O consumo líquido e sólido foi satisfatório entre os grupos, porém, os animais do grupo CI apresentaram menor ingestão líquida e sólida quando comparados com os animais dos grupos CT (Tabela 1). Durante o experimento, todos os animais ganharam peso (Tabela 1).

Os resultados morfométricos demonstraram que os animais do grupo CI apresentaram menor volume de osso

neoformado ao redor dos implantes de HAD em relação ao grupo CT (Figura 1 e Tabela 1). Na falha óssea, realizada no osso parietal, também foi observado menor volume de osso neoformado nos animais do grupo CI (Figura 2 e Tabela 1).

A força máxima (N) necessária para romper o fêmur dos animais do grupo CI foi inferior à força utilizada para romper o fêmur dos animais do grupo CT (Tabela 1), sendo também, a esta, estatisticamente diferente.

Tabela 1. Comparação do ganho de peso (ΔP); consumo de dieta líquida e sólida; Volume ósseo neoformado; Força máxima para ruptura do fêmur; Controle (CT) e Cigarro (CI).

	CT	CI
N	06	06
ΔP (g)	289 \pm 2	288 \pm 1
Líquida (mL)	41 \pm 0,5	42 \pm 0,3
Sólida (g)	51 \pm 1	48 \pm 0,5*
Osso neoformado (%) ao redor da HAD (tibia)	39 \pm 1	33 \pm 0,5*
Osso neoformado (%) na falha óssea do osso parietal	14,4 \pm 0,5	8,9 \pm 0,2*
Força Máxima (N)	140 \pm 6,5	119 \pm 3,2*

* $p < 0,005$ comparado com CT. Dados expressos em média \pm EPM.

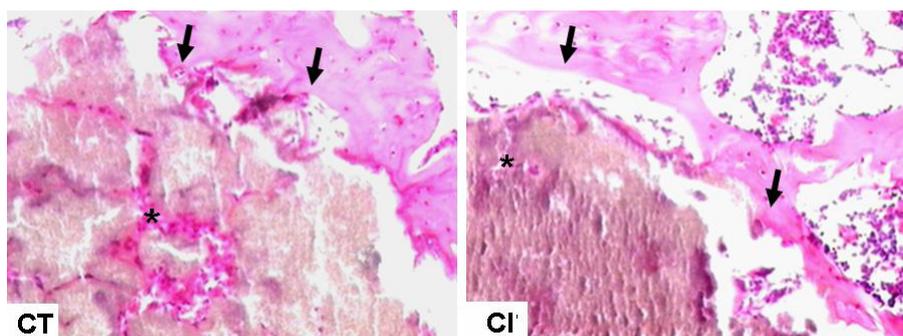


Figura 1. Comparação do osso neoformado (\downarrow) ao redor do implante de HAD e da infiltração de osso neoformado nas fissuras da HAD (*) através de corte transversal da tíbia do grupo CT e CI. (400x – H.E.).

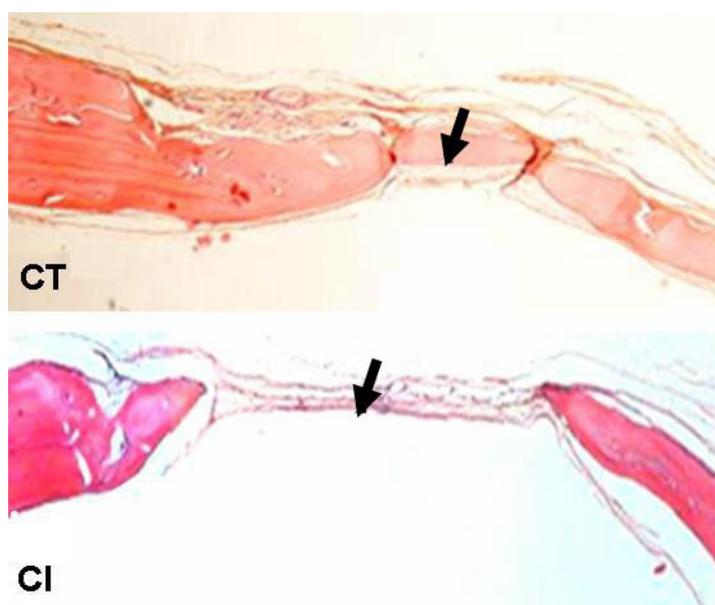


Figura 2. Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea dos animais do grupo CI em comparação com os do grupo CT. (HE 40X).

DISCUSSÃO

A osteogênese depende da migração, proliferação e diferenciação das células osteogênicas em osteoblastos (Marks & Popoff, 1988). No entanto, esse processo pode ser alterado pelos efeitos biológicos do cigarro (Skott et al., 2006). Desse modo, o tabagismo tem recebido grande atenção por estar relacionado a uma maior incidência de perda de implantes osseointegráveis (Soares et al., 2010). O presente estudo mostrou que a exposição à fumaça de cigarro interferiu negativamente na osteogênese do osso parietal, na osteo-integração dos implantes de HAD nas tíbias e na força máxima para ruptura dos fêmures em ratos. Essas alterações devem-se aos efeitos da exposição à fumaça de cigarro, não sendo decorrentes de um quadro de desnutrição, pois todos os animais ganharam peso durante o experimento e as ingestões sólida e líquida permaneceram dentro dos padrões preconizados por Svendsen & Hau (1984).

No presente estudo, não se observou resposta inflamatória crônica ou a formação de camada de tecido fibroso na interface osso neoformado/implante de HAD. Nos grupos experimentais, o osso neoformado encontra-se em contato direto com os blocos de HAD. A alteração mais importante observada refere-se ao menor volume de osso encontrado ao redor dos implantes de HAD nos animais do grupo CI quando comparado ao do grupo CT, o que pode ser atribuído à redução da osteogênese e à perda óssea peri-implantar causadas pelos efeitos da nicotina, como descrito nos estudos de Kamer et al., 2006; Soares et al., 2010. A nicotina altera a histologia do tecido ósseo, inibindo os osteoblastos, alterando os níveis de paratormônios (Kapoor & Jones, 2005) e diminuindo a densidade óssea (Benatti et al., 2005), deixando, dessa forma, os ossos propensos a fraturas (Skott et al., 2006).

Estudo realizado por Soares et al., (2010) demonstrou redução da força máxima necessária para a ruptura completa dos fêmures em ratos submetidos a doses diárias de 0,125 mg/100 g de nicotina por via subcutânea por um período de 90 dias. No protocolo presente, optou-se pela exposição à fumaça do cigarro, pois o indivíduo tabagista está em contato com todos os componentes tóxicos do cigarro. Os componentes da fumaça do cigarro diminuíram a resistência mecânica dos fêmures, demonstrando uma fragilidade óssea perante o hábito tabagista. Essa fragilidade óssea pode estar associada à diminuição das propriedades materiais do osso, estando essas propriedades relacionadas com a composição do tecido ósseo e as suas células, bem como às partes orgânica e inorgânica do osso (Ferretti et al., 2001).

Em conclusão, o reparo da falha óssea e a incorporação dos implantes de HAD podem ser esperados mesmo em animais e humanos expostos à fumaça do cigarro. No entanto, com menor volume, pode comprometer a estabilidade e manutenção do implante.

ABSTRACT

Effects of cigarette smoke on osteogenesis and bone mechanical resistance in rats

This paper reports a study of the effects of exposure to cigarette smoke on osteogenesis and the mechanical strength of bone in rats. Twelve male rats were separated into two groups (n=6): CT (control) and CI (cigarette). All the animals had free access to rat chow and water throughout the experiment. Group CI was exposed to the smoke of 6 cigarettes/day for 12 weeks. After 6 weeks of exposure to cigarette smoke, a defect was produced on the parietal bone and dense hydroxyapatite (DHA) ceramic bodies were implanted into cavities made surgically in the tibia of the animals, in each group. After surgery, the CT and CI groups returned to normal experimental conditions and, at the end of 12 weeks, they were euthanized, and their tibiae and parietal bones removed for histological processing, while the femurs were subjected to biomechanical tests in a MTS TestStar II three-point flexion module. Consumption of solid and liquid diet was satisfactory in both groups, all animals gaining weight throughout the experiment. CI animals showed a smaller volume of newly formed bone in the parietal defect (8.19 ± 0.2) and around the DHA implant in the tibia (33 ± 0.5) than the rats in the CT group (14.4 ± 0.5 and 39 ± 1 respectively). The maximum force needed to break the femur was smaller in CI (119 ± 3.2) than in CT (140 ± 6.5). The results of this study led to the conclusion that exposure to cigarette smoke interfered with osteogenesis in the bone defect and around the DHA implant and reduced the maximum force required to completely break the femur, revealing that bone fragility can be caused by tobacco smoke.

Keywords: Cigarette. Bone. Hydroxyapatite. Osteogenesis.

REFERÊNCIAS

- Benatti BB, César-Neto JB, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti FH. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(5):400-3.
- Berley J, Yamano S, Sukotjo C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *J Oral Implantol.* 2010; 36(3):185-93.
- Caria PH, Kawachi EY, Bertran CA, Camilli JA. Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(5):847-54.
- César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontol Res.* 2006; 41(2):119-23.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(3):721-64.
- Ferretti JL, Cointy GR, Capozza RF, Capigliioni R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on

- the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001; 1(3):263-74.
- Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone JE, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med.* 2006; 17(1):121-7.
- Kapoor D, Jones, TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(4):491-9.
- Kucukdeveci O, Sarisozen B, Atici T, Ozcan R. The Effect of Nicotine on Distraction Osteogenesis: An Experimental Study on Rabbits. *J Trauma.* 2009; 67:1376-83.
- Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res.* 1983; 24(1):207-17.
- Mandarin de Lacerda, CA. Whats is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. *Braz J Morphol.* 1999; 16(2): 131-9.
- Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, struture, and function in the skeleton. *Am J Anat.* 1988; 183(1):1-44.
- Ohbayashi Y, Miynoru M, Nagahata S. A long-term study of implanted artificial hydroxyapatite particles surrounding the carotid artery in adult dog. *Biomaterial.* 2000; 21: 501-9.
- Sakakura CE, Marcantonio E, Rezende MLR. O efeito do tabagismo na implantodontia. *BCI.* 2001/2002; 8(32): 276-280.
- Skott M, Andreassen TT, Ulrich-Vinther M, Chen X, Keyler De, Lesage MG, Pentel PR, Bechtold JE, Soballe K. Tobacco extract but not nicotine impairs the mechanical strength of fracture healing in rats. *J Orthop Res.* 2006; 24(7):1472-9.
- Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab.* 2010; 28(1):101-7.
- Svendsen P, Hau J. Handbook of laboratory animal science. Boca Raton: CRC Press; 1984. v. 1.
- Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone.* 2008; 43(2):355-61.

