

Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*

Effect of nicotine on the viability and morphology of fibroblasts – in vitro study

Aurora Esmeralda Traverso Martinez*
Karina Gonzales Silvério*
Carlos Rossa Júnior**

RESUMO: O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da nicotina sobre a viabilidade e a morfologia celular utilizando-se uma linhagem contínua de fibroblastos. Para tal, foram formados dois grupos experimentais segundo a dose (0 - controle, 10 µg, 100 µg, 0,5 mg, 1 mg) e o tempo de condicionamento (1 e 24 horas). Cada um dos 12 orifícios de uma placa para cultura celular recebeu 2 ml de meio de Eagle, e 1 ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1×10^5 células/ml. Foi, então, acrescentada a solução de nicotina nas diferentes concentrações. Após o condicionamento com a droga, nos dois períodos testados, as células foram coradas com azul de trypan 0,4%, e observadas em microscópio invertido por um examinador cego para os grupos experimentais, que avaliou a viabilidade e a morfologia segundo o índice de Gamal. Os experimentos foram repetidos 5 vezes. Quanto à morfologia, os resultados obtidos demonstraram, no grupo condicionado por 1 h, que os controles apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação apenas à maior dose de nicotina; no entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o controle e todas as concentrações após 24 horas de condicionamento. Na viabilidade celular, um maior número de células não viáveis foi observado nas diferentes concentrações de nicotina em comparação aos controles tanto após 1 quanto 24 horas de condicionamento ($p < 0,05$). Em ambos períodos existiu uma tendência significativa de aumento do número de células não viáveis com o aumento da dose de nicotina ($p = 0,0053$; $p = 0,00001$ após 1 e 24 h respectivamente). Portanto, conclui-se que a nicotina pode alterar, *in vitro*, a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

UNITERMOS: Nicotina, efeitos adversos; Fibroblastos; Tabaco.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effect of nicotine on the viability and morphology of fibroblasts from a continuous lineage. Two experimental groups were prepared, with different drug dosages (0 - control, 10 µg, 100 µg, 0.5 mg, 1 mg) and conditioning time (1 and 24 hours). Twelve-well microplates were utilized. Each well received 2 ml of fresh culture medium and 1 ml of a solution containing 1×10^5 cells/ml. Nicotine was then added to the wells, at the tested concentrations. After the incubation period, cell viability was assessed by means of 0.4% trypan blue staining. Cell viability and morphology were assessed in an inverted microscope, by a single examiner, who was blind as to the experimental groups. The experiment was repeated 5 times. Regarding morphology, in the 1-hour conditioned group there was statistically significant difference between the control group and the group with the greatest dose of nicotine. These differences were also observed between the control group and all nicotine groups after 24 hours. The results of the Kruskal-Wallis test revealed that more unviable cells were found in the groups exposed to nicotine, in comparison with the control group, both after 1 and 24 hours of conditioning ($p < 0.05$). Moreover, with increasing doses of nicotine there was a directly proportional increase in the number of unviable cells, both after 1 and 24 hours of exposure ($p = 0.0053$ and $p = 0.00001$, respectively). The conclusion of this study is that nicotine can alter, *in vitro*, the viability and morphology of fibroblasts in a manner proportional to the dose and time of exposure.

UNITERMS: Nicotine, adverse effects; Fibroblasts; Tobacco.

INTRODUÇÃO

A relação entre o fumo e a prevalência e severidade da doença periodontal tem sido discutida há muito tempo⁴ e pesquisas recentes têm sugerido que o hábito de fumar é um dos fatores de risco

mais significativos para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal⁷. As razões para esta associação entre fumo e doenças periodontais ainda são desconhecidas; alguns autores a atribuem a efeitos locais como o nível de higiene bucal¹ ou alteração na composição da microbiota subgen-

*Mestranda em Periodontia; **Professor Assistente Doutor da Disciplina de Periodontia – Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

gival permitindo uma maior proporção de patógenos periodontais²². No entanto, outros autores ressaltam as influências sobre o sistema imune como a diminuição da fagocitose e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares¹³, redução da produção de anticorpos e diminuição da viabilidade de linfócitos T^{10,11}.

O tabaco tem muitas substâncias citotóxicas presentes em sua composição, sendo a nicotina considerada uma das mais importantes. Esta substância tem um potencial tóxico para alterar algumas funções tissulares em consequência de sua disseminação por via hematogênica e também de sua rápida absorção pelos tecidos moles da cavidade oral ainda pela propriedade de adesão às superfícies dentárias¹⁷. Estudos *in vitro* mostraram que a nicotina em baixas concentrações tem capacidade de influenciar a aderência e orientação de fibroblastos sobre superfícies radiculares, diminuir a proliferação celular e inibir a produção de fosfatase alcalina, fibronectina e colágeno^{3,8,17,19}. Além disso, alguns estudos *in vivo* têm examinado o efeito do fumo na resposta à terapia periodontal e, em geral, a maioria dos pesquisadores têm concluído que os pacientes fumantes apresentam uma resposta tecidual clinicamente menos favorável após diferentes formas de tratamento^{18,20,21}.

Como a reparação da lesão periodontal é resultado de uma série de eventos celulares como a migração, divisão, e síntese de moléculas extracelulares, qualquer alteração nestes processos pode afetar o tipo de reparação celular esperado. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da nicotina sobre a viabilidade e a morfologia celular segundo a dose e o tempo de exposição, empregando-se uma linhagem contínua de fibroblastos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas células McCoy* (linhagem contínua de fibroblastos) as quais foram mantidas em frascos para cultura** (25 cm² de área de crescimento celular) contendo meio de Eagle* suplementado (MEM) com 7,5% de soro fetal bovino*** e 40 µg/ml de gentamicina****. O cultivo foi mantido em incubadora com umidade controlada de 98% e temperatura de 37°C.

*Instituto Adolfo Lutz - SP, Brasil.

**Corning Incorporated - NY, EUA.

***Cultilab - SP, Brasil.

****Garamicina 60 mgr/Schering Plough - RJ, Brasil.

*****N-3876 Sigma Chemical Products - EUA.

Teste de viabilidade e morfologia celular

A viabilidade foi determinada pelo teste de exclusão do corante azul de trypan. Células viáveis são impermeáveis a este corante, uma vez que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana¹². Foram estabelecidos dois grupos experimentais, segundo a dose de nicotina***** acrescentada ao meio: 0 - controle, 10 µg, 100 µg, 0,5 mg e 1 mg/ml. O tempo de incubação das células com a nicotina foi de 1 e 24 horas.

Cada poço de uma placa para cultivo celular de 12 orifícios recebeu 2 ml de meio de Eagle suplementado contendo a nicotina nas diferentes concentrações, imediatamente após foi acrescentado 1 ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1×10^5 células/ml. Os fibroblastos foram incubados em ambiente controlado por períodos de 1 e 24 horas, sendo corados posteriormente com azul de trypan 0,4% por 5 minutos. Após remoção do corante por aspiração e lavagem por duas vezes com solução tampão fosfato (pH 7,4) foram colocados 2 ml de tampão para determinar a viabilidade celular mediante a contagem das células em microscópio invertido.

Já a morfologia celular foi avaliada segundo o índice de Gamal *et al.*⁶ (1998) modificado, onde os valores atribuídos foram: 0 = sem presença de células, 1 = células achatadas, 2 = células arredondadas, 3 = combinação de células arredondadas e achatadas. A viabilidade e a morfologia celular foram determinadas por um único examinador, cego para os grupos experimentais, sendo selecionado um campo aleatório por amostra efetuando-se a contagem das células coradas e não coradas (teste de viabilidade) e a avaliação da morfologia celular (teste de morfologia) mediante o uso de microscópio invertido. Todos os experimentos foram repetidos cinco vezes.

Análise estatística

Como os dados de viabilidade celular não se ajustaram à distribuição normal, e os dados de morfologia são baseados em escores de um sistema de índice, foram utilizados métodos não-paramétricos de análise. Os efeitos das diferentes concentra-

ções de nicotina utilizadas em cada um dos dois períodos de condicionamento tanto sobre a viabilidade quanto sobre a morfologia celular foram avaliados de forma independente por meio do teste de Kruskal-Wallis. Para a comparação dos efeitos de cada dose de nicotina entre os diferentes períodos de condicionamento (1 e 24 h), foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e a verificação da existência de algum tipo de associação entre a concentração de nicotina utilizada e o percentual de células viáveis foi avaliada por meio de testes de tendência baseados na distribuição do qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%, e os cálculos foram realizados por meio do software Bioestat 2.0.

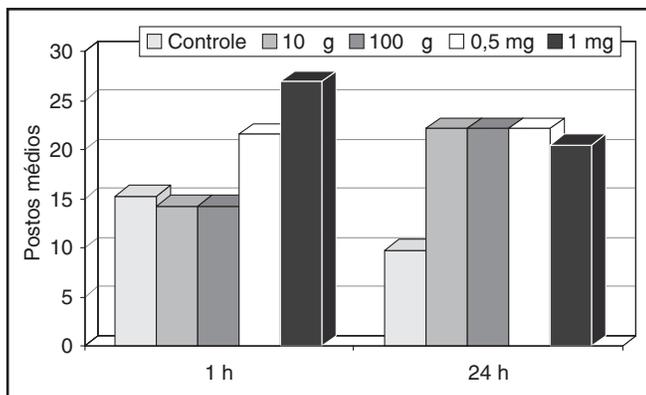


GRÁFICO 1 - Postos médios para a avaliação da morfologia celular em cada uma das concentrações de nicotina testadas, segundo o tempo de condicionamento (1 e 24 h).

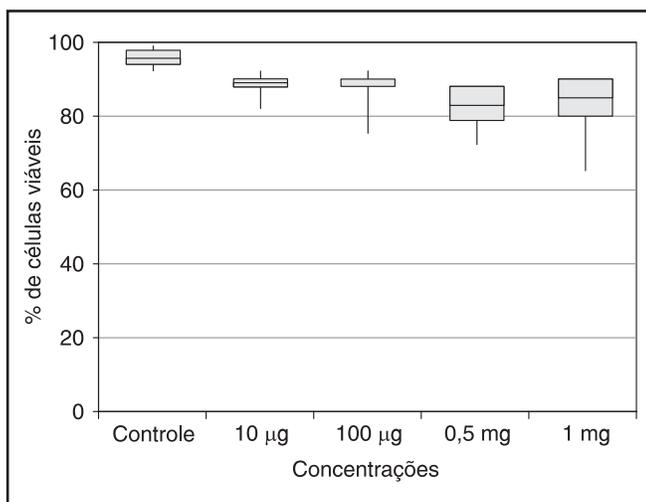


GRÁFICO 2 - Box-plot representando mediana, 1º e 3º quartis do percentual de células viáveis em cada uma das concentrações de nicotina testadas para o período de 1 h de condicionamento.

RESULTADOS

O Gráfico 1 apresenta os resultados para a avaliação da morfologia celular, com o teste de Kruskal-Wallis evidenciando efeitos significativos da nicotina nos dois períodos de condicionamento (1 hora: $H = 10,260$; $p = 0,03$; 24 horas: $H = 12,00$; $p = 0,01$). Devido ao sistema de índice utilizado, os maiores postos médios indicam maior quantidade de células arredondadas, sugerindo alterações funcionais como falta de aderência ao substrato e apoptose. As comparações pareadas *post-hoc* indicaram que no período de 1 h houve diferenças apenas entre a maior concentração de nicotina (1 mg), as duas menores concentrações testadas (10 e 100 µg) e o grupo controle, permanecendo o grupo que recebeu 0,5 mg de nicotina numa posição intermediária entre estes extremos. Quanto ao período de 24 horas, todas as concentrações de nicotina levaram a alterações significativas na morfologia em comparação ao grupo controle, sem diferenças entre as diversas concentrações testadas.

Os Gráficos 2 e 3 apresentam os resultados para a análise de viabilidade celular em cada um dos períodos de condicionamento. Novamente, o teste de Kruskal-Wallis indicou efeito significativo da nicotina sobre a viabilidade celular, tanto após 1 h ($H = 6,01$; $p = 0,003$) quanto após 24 h de condicionamento ($H = 17,55$; $p = 0,001$). Para o período de 1 hora, as comparações pareadas *post-hoc* indicaram diferenças entre o controle e todos os grupos tratados com nicotina ($p < 0,05$), com me-

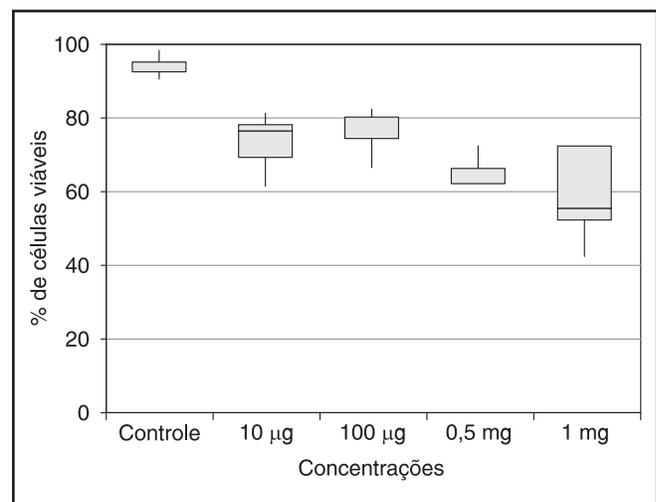


GRÁFICO 3 - Box-plot representando mediana, 1º e 3º quartis do percentual de células viáveis em cada uma das concentrações de nicotina testadas para o período de 24 h de condicionamento.

nor número de células viáveis nos grupos que receberam nicotina, porém não houve diferenças entre as diversas concentrações de nicotina testadas. Os valores de A e χ^2 indicam tendência significativa ($p = 0,005$) de aumento do número de células não viáveis com o aumento da concentração de nicotina.

Resultados semelhantes foram encontrados para o período de 24 horas, representados por diferenças entre o controle e todos os grupos tratados com nicotina ($p < 0,05$), que apresentaram menor proporção de células viáveis, novamente sem diferenças entre as diferentes concentrações de nicotina testadas. Os valores de A e χ^2 também indicaram tendência significativa de aumento do número de células não viáveis com o aumento da concentração de nicotina, porém ainda mais marcante do que no período de 1 h ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Fibroblastos em cultura possuem a característica de proliferar sobre um suporte, entretanto efeitos deletérios provenientes do contato direto com substâncias tóxicas se refletem em alterações da morfologia celular, tais como: vacuolização do citoplasma, granulações nucleares e arredondamento celular, pois se descolam da superfície à qual estão aderidos⁵. Atualmente, vários estudos têm pesquisado o papel do principal componente do tabaco, a nicotina, na viabilidade e a morfologia de fibroblastos. No entanto, há grande variabilidade nos resultados das pesquisas devido a diversos fatores como as concentrações utilizadas, os diferentes tipos celulares e as variações dos métodos de avaliação empregados. No presente trabalho, encontramos que os fibroblastos podem ser afetados na sua expressão morfológica após uma hora de condicionamento com nicotina podendo sofrer mudanças consideráveis a partir de concentrações de 1 mg. Estes resultados concordam com os de Tipton, Dabbous¹⁹ (1995) que encontraram vacúolos citoplasmáticos e alterações na morfologia com doses superiores a 500 $\mu\text{g/ml}$ em fibroblastos de origem gengival. No entanto, Raulin *et al.*¹⁷ (1988) observaram alterações na morfologia de fibroblastos oriundos de fetos humanos com concentrações de nicotina inferiores a 200 ng/ml . As possíveis discrepâncias entre os resultados podem ser atribuídas às diferentes concentrações testadas, diferentes períodos de incubação, assim como aos métodos de avaliação empregados. No entanto, acreditamos que a diferença fundamental estaria nas diferentes linhagens de fibroblastos emprega-

dos e seria esta heterogenicidade celular fenotípica a responsável pelo comportamento diferente frente à mesma substância.

As amostras condicionadas por 24 horas apresentaram alterações na morfologia celular em todas as concentrações testadas, o que segundo Hanes *et al.*⁹ (1991), pode ser explicado pelo fato de a nicotina ser reconhecida pelos fibroblastos como uma substância injuriante e portanto, absorvida pelas células para sua posterior eliminação. O dano celular ocorre quando são absorvidas elevadas quantidades da droga por períodos constantes. O mecanismo de eliminação da nicotina pela célula é lento e a exposição prolongada à droga pode originar uma toxicidade intracelular com possíveis alterações no comportamento celular do fibroblasto, eventualmente culminando na morte celular.

Quanto à viabilidade celular, observa-se uma tendência de aumento no número de células não viáveis de forma diretamente proporcional à concentração de nicotina em ambos períodos de incubação (1 e 24 horas). Em geral, um maior número de células não viáveis foi encontrado no grupo incubado com a substância por 24 horas, o que está de acordo com a literatura^{2,8,19}. Entretanto, nossos resultados discordaram dos relatados por Peacock *et al.*¹⁶ (1993), já que, para estes autores, em baixas concentrações a nicotina teria um efeito estimulatório na proliferação e viabilidade celular após 48 horas de exposição. Papaioannou *et al.*¹⁵ (1998) afirmam que a viabilidade e proliferação podem ser estimuladas ou inibidas dependendo do tempo de exposição dos fibroblastos à nicotina e das concentrações utilizadas, o que explicaria, em parte, as discrepâncias entre nossos resultados e os de Peacock *et al.*¹⁶ (1993).

Tentar entender os processos celulares é uma tarefa difícil, na atualidade, os modelos experimentais *in vitro* como a cultura de células, nos são de grande ajuda para aumentar o conhecimento relativo ao comportamento das principais unidades biológicas nos seres vivos. Sendo o fibroblasto a principal célula dos tecidos periodontais¹⁴ é de muita importância conhecer seu funcionamento e as possíveis alterações que ele pode sofrer por diferentes agentes injuriantes como a nicotina. Dentro das limitações deste trabalho, quanto ao tipo de linhagem celular utilizado e metodologia empregada, podemos concluir que a nicotina pode alterar *in vitro* a morfologia e a viabilidade de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

REFERÊNCIAS

1. Bergstrom J. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scand J Dent Res* 1990;98:497-503.
2. Chang YC, Lii CK, Tai KW, Chou MY. Adverse effects of aerosolized nicotine and human periodontal ligament fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 2001;28:277-82.
3. Checchi L, Ciapetti G, Monaco G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 1999;26:636-42.
4. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol* 1983;54:481-7.
5. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 3rd. ed. New York: Wiley-Liss; 1994.
6. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response of PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCL conditioned root surface. *J Clin Periodontol* 1998;25:404-12.
7. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996;67:1041-9.
8. Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblast *in vitro*. *J Clin Periodontol* 1999;26:49-55.
9. Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991;62:147-52.
10. Holt PG, Bartholomaens WN, Keast D. Differential toxicity of tobacco smoke to various cell types including those of the immune system. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1974;52:211-5.
11. Holt PG, Keast D. Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol Review* 1977;41:105-10.
12. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol* 1996;67:675-81.
13. Kaltenbach JP, *et al*. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* 1958;15:112-7.
14. Kenny EB, Krall JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res* 1977;12:227-32.
15. Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 1970;15:1183-204.
16. Papaioannou C. Effect of long-term nicotine administration and subsequent withdrawal on human gingival fibroblasts, *in vitro*. In: 84th Annual Meeting AAP, [abstract] poster session; 1998.
17. Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL, *et al*. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 1993;64:658-65.
18. Raulin LA, McPherson JC 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblast to glass and human root surfaces *in vitro*. *J Periodontol* 1988;59:318-25.
19. Renvert S, Dahlen G, Wikström M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non smokers. *J Clin Periodontol* 1998;25:153-7.
20. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblast *in vitro*. *J Periodontol* 1995;66(12):1056-64.
21. Trombelli L, Scabbia A. Healing response of gingival recession defects following guided tissue regeneration procedures in smokers and non smokers. *J Clin Periodontol* 1997;24:529-33.
21. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 1996;67:1050-4.

Recebido para publicação em 03/12/01
Enviado para reformulação em 06/06/02
Aceito para publicação em 18/06/02