

**ALEXANDRE POVOA BARBOSA**

**Impacto do tabagismo na composição da matriz  
extracelular óssea: modelo de fratura de tíbia em  
camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção de título de Doutor em  
Ciências

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético

Orientadora: Profa. Dra. Walcy Paganelli  
Rosolia Teodoro

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda  
Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

**São Paulo**

**2019**

**ALEXANDRE POVOA BARBOSA**

**Impacto do tabagismo na composição da matriz  
extracelular óssea: modelo de fratura de tíbia em  
camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção de título de Doutor em  
Ciências

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético

Orientadora: Profa. Dra. Walcy Paganelli  
Rosolia Teodoro

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda  
Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

**São Paulo**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Alexandre Povia

Impacto do tabagismo na composição da matriz extracelular óssea : modelo de fratura de tíbia em camundongos / Alexandre Povia Barbosa. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Descritores: 1.Fumo 2.Colágeno 3.Matriz óssea 4.Consolidação da fratura 5.Desenvolvimento ósseo 6.Osteoclastos 7.Osteoblastos

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Normatização adotada**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Cestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª edição São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

**Dedicatória**

*Dedico esta tese:*

*Às minhas filhas, Júlia e Beatriz, minhas fontes de amor e energia necessários para continuar trabalhando duro no consultório e na vida acadêmica. Espero poder um dia, servir como inspiração para vocês seguirem felizes na vida e firmes na carreira que escolherem.*

*À minha esposa Simone, minha eterna companheira que me ajudou a persistir quando a vontade fraquejou. Sem você ao meu lado essa jornada não teria sentido. Obrigado pelo sacrifício recente tomado em nome da nossa família.*

*Aos meus pais, Valter e Edna, exemplos de vida e retidão. Vocês conduziram cinco filhos ao caminho da educação ensinando buscar o sucesso profissional e financeiro através dos estudos e do trabalho.*

## **Agradecimentos**

*À Profa. Dra. Walcy Paganelli Rosolía Teodoro, por ter me acolhido em seu laboratório e ajudado a lapidar a pedra bruta transformando-a nesta bela tese. Sua expertise jamais será esquecida, ela está impressa em cada parágrafo deste estudo.*

*À Profa. Dra. Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes, por sua incansável dedicação aos alunos, à ética e ao ensino da metodologia científica. Palavras que façam justiça à tua capacidade de criar valor e transformar pessoas ainda não foram inventadas. Nunca esquecerei seu convite para regressar à Faculdade, portas foram abertas para não mais fechar.*

*À Dra. Ana Paula Pereira Velosa, por sua brilhante participação no estudo, seus conhecimentos e habilidades foram fundamentais para unir as pontas soltas dos resultados e concluir o trabalho.*

*À Profa. Dra. Vanda Jorgetti, grande incentivadora na formação deste grupo de pesquisadores. Sua liderança foi essencial no planejamento do estudo.*

*Aos meus irmãos, Maurício e Rogério, companheiros de fraldas, chuteiras, bicicletas, estetoscópios e finalmente bisturis. Trabalhar ao lado de vocês dois é o meu maior orgulho profissional e familiar.*

*Aos meus irmãos, Valter Jr e Bruno, o primeiro me inspirou a buscar o melhor no desempenho acadêmico e intelectual. O segundo, eu espero ter exercido o mesmo papel e hoje vejo com grande alegria sua capacidade de voar alto.*

*Ao meu grande amigo Dr. Thiago Bernardes Bastos, tudo começou com sua ajuda e incentivo.*

*Ao meu amigo, assistente e muitas vezes professor, Dr. Jader Joel Machado Junqueira, sua participação foi fundamental. A continuidade da nossa linha de pesquisa está em ótimas mãos.*

*Aos funcionários e colaboradores do LIM 20 e LIM 17 por toda a ajuda durante os experimentos, sem o trabalho precioso de vocês o estudo não seria concluído.*

**Epígrafes**

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”

Edgar Allan Poe

“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho”

Thomas Jefferson

# Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo da remodelação óssea e ações celulares integradas da Unidade Óssea Multicelular.....	06
Figura 2. Esquema ilustrativo do osteoclasto diferenciado.....	09
Figura 3. Ação de citocinas na comunicação celular da BMU.....	18
Figura 4. Esquema ilustrativo da hélice tripla do colágeno.....	22
Figura 5. Esquema ilustrativo da organização fibrilar da matriz óssea e sua mineralização.....	24
Figura 6. Esquema ilustrativo da estrutura do Colágeno tipo V.....	28
Figura 7. Desenho esquemático da interação dos colágenos I e V nas fibrilas heterotípicas.....	30
Figura 8. Esquema ilustrativo da câmara de exposição à fumaça de cigarro.....	43
Figura 9. Esquema demonstrando o local da osteotomia (linha amarela) e a posição da haste intramedular (linha preta) na tíbia extraída de camundongo.....	44
Figura 10. Linha do tempo do experimento.....	45
Figura 11. Imagem representativa do tecido ósseo de camundongo em pequeno aumento corado por HE.....	49
Figura 12. Imagens representativas da análise na coloração de Picrosirius.....	50
Figura 13. Imagem representativa da Imunofluorescência para Col I.....	52
Figura 14. Imagem representativa da Imunofluorescência para Col V.....	52
Figura 15. ELISA do homogenato ósseo.....	56
Figura 16. Cortes histológicos de tecido ósseo calcificado corado com Azul de Toluidina.....	59
Figura 17. Cortes histológicos representativo de tecido ósseo calcificado marcado com tetraciclina.....	60
Figura 18. Representação Gráfica da relação das variáveis estruturais nos grupos C e CS.....	61
Figura 19. Representação Gráfica da relação das variáveis de formação óssea.....	63
Figura 20. Representação Gráfica da análise da superfície de células de formação e reabsorção óssea.....	64
Figura 21. Cortes histológicos de tecido ósseo descalcificado corado com HE dos grupos C e CS.....	67
Figura 22. Cortes histológicos de tecido ósseo descalcificado corado com HE dos grupos F e FCS.....	68
Figura 23. Cortes histológicos de tecido ósseo corados com picrosirius e analisado em microscópio de polarização.....	70

Figura 24. Representação Gráfica da quantificação das fibras de colágeno grossas e finas nos grupos nos grupos C, CS F e FCS.....	71
Figura 25. Cortes histológicos representativos da Imunofluorescência para colágeno do tipo I .....	72
Figura 26. Representação Gráfica da quantificação das fibras de colágeno I nos grupos nos grupos C, CS, FC e FCS.....	73
Figura 27. Cortes histológicos representativos da Imunofluorescência para colágeno do tipo V.....	74
Figura 28. Representação gráfica da análise morfométrica das fibras de colágeno V nos grupos nos grupos C, CS, FC.....	75
Figura 29. Representação gráfica da análise da expressão dos genes COL1A1 e COL1A2 nos grupos nos grupos C, CS, FC e FCS.....	76
Figura 30. (Painéis A e B). Representação gráfica da análise da expressão dos genes COL5A1 e COL5A2 nos grupos nos grupos C, CS, FC e FCS.....	77
Figura 31. Representações gráficas dos resultados de análise das interleucinas no macerado ósseo.....	79

# Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros histomorfométricos de mineralização dos grupos C e CS.....	65
Tabela 2. Resultados da análise morfométrica e da Expressão Gênica da matriz fibrilar óssea .....	77
Tabela 3. Mostrando os resultados numéricos da expressão de Citocinas no macerado ósseo nos grupos C, CS, F e FCS.....	80

# Lista de Siglas e Abreviaturas

BFR/BS: Taxa de formação óssea;

BMP: proteína morfogenética óssea;

BMU: Unidade Óssea Multicelular;

BSA: albumina bovina sérica;

BV/TV: razão do volume trabecular sobre o volume ósseo total;

C: grupo Controle;

Col: colágeno;

CS: grupo Fumo;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática;

EP: erro padrão

ES/BS: superfície de reabsorção;

F: grupo Fratura;

FCS: grupo Fumo-Fratura;

FGF: fator de crescimento de fibroblastos;

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

H<sub>2</sub>O: água;

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina-1;

IgG: imunoglobulina G;

IL: Interleucina;

INF- $\gamma$ : Interferon-*gamma*;

LIM: Laboratório de Investigação Médica;

MAR: Taxa de deposição mineral;

MEC: matriz extracelular;

MLT: Intervalo de mineralização;

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro;

MS/BS: superfície de mineralização;

O.Th: espessura osteóide;

Ob.S/BS: superfície osteoblástica;

Oc.S/BS: superfície osteoclástica;

OPG: Osteoprotegerina;

OS/BS: superfície de osteóide;

PARP: prolina e arginina;

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas;

PG: proteoglicano;

PTH: paratormônio;

qRT-PCR: transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RANKL: receptor ativador de fator nuclear *kappa-beta* ligante;

Tb.N: número de trabéculas;

Tb.Sp: separação trabecular;

Tb.Th: espessura trabecular;

TGF- $\beta$ : Fator transformador de crescimento-*beta*;

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-*alpha*;

TRACP: fosfatase ácida resistente ao tartarato;

VAR: variável

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial;

## Lista de símbolos

mg	miligrama
mL	mililitro
CO	monóxido de carbono
N	nitrogênio
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
NH <sub>3</sub>	amônia
HCN	cianeto de hidrogênio
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	benzeno
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	nicotina
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	anatabina
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	anabasina
O <sub>2</sub>	oxigênio
H	hidrogênio
Cl	cloro
[Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> Ca(OH) <sub>2</sub>	hidroxiapatita
Na	sódio
K	potássio
Mg	magnésio
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	carbonato
NH <sub>2</sub>	aminoterminal
COOH	carboxiterminal
nm	nanômetro
Kd	kilodalton
min	minutos
cm	centímetros

L	litros
ppm	partes por milhão
kg	kilo
mm	milímetro
μm	micrómetro
rpm	rotações por minuto
°C	graus <i>Celsius</i>
μl	microlitros
ng	nanogramas

## **Sumário**

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

Introdução .....	01
Tabagismo: Considerações gerais .....	02
Tecido ósseo: histoarquitetura e metabolismo .....	04
Osteoclastos e osteoclastogênese .....	07
Osteoblastos .....	11
Osteócitos .....	14
Células de revestimento ósseo .....	15
Dinâmica do tecido ósseo: Remodelação óssea .....	16
Composição bioquímica e molecular da matriz óssea .....	19
Características moleculares das fibras colágenas .....	20
Relação entre os colágenos fibrilares no tecido ósseo .....	25
Tabagismo e matriz óssea .....	32
Objetivo .....	38
Material e Métodos .....	40

Grupos experimentais .....	41
Modelo de exposição à fumaça de cigarro .....	42
Indução da fratura tibial .....	43
Avaliação da Matriz Mineral Óssea .....	45
Histomorfometria .....	46
Avaliação da matriz fibrilar óssea .....	48
Morfologia do osso .....	48
Avaliação do colágeno por análise de imagem .....	49
Imunofluorescência para colágenos I e V no tecido ósseo .....	51
Avaliação da expressão de genes: COL1A1, COL1A2 e COL5A1, COL5A2 .....	52
Reação em cadeia da polimerização em tempo real (qRT-PCR) .....	54
Citocinas e avaliação da expressão de fatores de crescimento .....	55
Análise estatística .....	56
Resultados .....	57
Influência da fumaça de cigarro nas variáveis de formação da matriz mineral óssea .....	58
Efeito da fumaça de cigarro na matriz fibrilar óssea .....	66
Análise da histoarquitetura do tecido ósseo .....	66
Relação entre a formação de fibras grossas e finas do colágeno do osso após a exposição à fumaça de cigarro .....	69
Efeito da exposição à fumaça de cigarro na composição da matriz fibrilar do osso .....	71

Análise de Expressão de Genes COL1A1, COL1A2, COL5A1 e COL5A2 .....	75
Ação da fumaça de cigarro na expressão citocinas e fatores de crescimento do tecido ósseo .....	78
Discussão .....	80
Conclusões .....	90
Referências .....	92

Apêndice I

Versão em inglês para publicação

Apêndice II

Aprovação Comitê de Ética

**Resumo**

**Barbosa A P. Impacto do tabagismo na composição da matriz extracelular óssea: Modelo de fratura de tíbia em camundongos**

**São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019**

Considerando-se que o tabagismo afeta a maioria dos sistemas do corpo humano, que os estudos concentram-se mais sobre os efeitos deletérios do tabaco em doenças cujos órgãos vitais são afetados e que seu impacto na formação e na consolidação óssea ainda não está estabelecido, a proposta neste estudo foi avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no mecanismo de consolidação e remodelamento da matriz óssea e relacioná-los ao processo inflamatório desencadeado por fratura em modelo desenvolvido em camundongos. Para isso, camundongos C57BL6 machos foram distribuídos em quatro grupos: C (n=29) expostos ao ar ambiente; F (n=23) expostos ao ar ambiente e submetidos à osteotomia da tíbia direita; CS (n=29) expostos à fumaça de cigarro; FCS (n=23) expostos à fumaça de cigarro e submetidos à osteotomia da tíbia direita. Nossos dados indicaram diminuição do volume trabecular, da mineralização, MS/BS% ( $p < 0,05$ ), e da formação óssea, MAR ( $p = 0,0004$ ), bem como aumento de osteoclastos, Oc.S/BS% ( $p = 0,0361$ ), e de reabsorção óssea, ES/BS% ( $p = 0,0114$ ), no grupo CS, quando comparado ao grupo C. Identificamos uma elevação significativa de IL-6 nos grupos CS e FCS ( $p < 0,001$ ) na comparação com os grupos C e F ( $p < 0,05$ ). Observamos diminuição de VEGF nos grupos CS e FCS, quando comparados com os grupos C e F ( $p = 0,01$ ). O índice de IGF demonstrou-se diminuído nos grupos CS e FCS, quando comparados com os grupos C e S ( $p < 0,05$ ). A matriz fibrilar apresentou um intenso remodelamento, caracterizado pelo aumento da expressão de Colágeno V na avaliação por imuno-histoquímica nos grupos CS, F e FCS, comparados com C ( $p < 0,05$ ), e da expressão dos genes COL5A1 ( $p < 0,0001$ ) e COL5A2 nos grupos F e FCS ( $p < 0,0001$ ). Identificamos também diminuição significativa de Colágeno I nos grupos CS, F e FCS, comparados com C ( $p < 0,001$ ), e da expressão dos genes COL1A1 no grupo CS ( $p = 0,008$ ) e COL1A2 nos grupos CS, F e FCS ( $p = 0,005$ ). Nosso estudo mostra que a exposição à fumaça de cigarro altera a composição das fibras de colágeno pertencentes à matriz fibrilar óssea, retarda a mineralização e modifica a interação

entre os diferentes tipos de colágeno, importantes no desempenho funcional do osso.

**Descritores:**

Fumo; Colágeno; Matriz óssea; Consolidação de fratura; Desenvolvimento ósseo; Osteoclastos; Osteoblastos

**Abstract**

**Introduction:** The impact of cigarette smoke on bone metabolism is not yet fully understood. This study aimed to verify the effects of cigarette smoke exposure in bone healing in an experimental tibial fracture model, evaluating the mineralization process, bone cellular differentiation/function and collagen types deposition.

**Materials and Methods:** C57BL/6 male mice were assigned into four groups: C(n=29): exposure to room air; F(n=23): exposure to room air and right tibia osteotomy; CS(n=29): exposure to cigarette smoke; FCS(n=23): exposure to cigarette smoke and right tibia osteotomy. **Results:** Histomorphometry of Bone Mineral Matrix revealed that cigarette smoke exposure significantly reduced thickness of bone trabeculae, associated with a decrease in mineralizing surface and in rate of mineral apposition, which was reflected in lower bone formation rate and consequently in a longer time for mineralization. Both resorption surface and osteoclastic surface were higher in the CS group, evidencing the increase of the resorptive action of cigarette smoke. Histomorphometry of Bone Fibrillar Matrix: Type I collagen demonstrated a decrease in CS and FCS compared to C ( $p < 0.01$ ); Type V collagen demonstrated an increase in CS, FC and FSC compared to C ( $p < 0.0001$ ). The cytokines expression evaluation demonstrated that only CS exposure has already induced a VEGF and IGF decrease with a concomitant increase in IL-6 and these changes were intensified under fracture conditions. COL1A1 gene expression was reduced in the CS and FCS groups, similar result was observed in COL1A2 evaluation. COL5A1 gene expression, showed an increase in CS and Fracture groups while the COL5A2 gene expression increase was detected only in Fracture groups. **Conclusion:** Cigarette smoke exposure

alters bone matrix composition and worsens bone mineralization, leading to bone fragility by increasing collagen V synthesis and deposition and impairing collagen I fibril forming and assembling.

**Keywords:**

Smoking; Collagen; Bone matrix; Fracture healing; Bone remodeling; Osteoclast; Osteoblast

# Introdução

### ***Tabagismo: Considerações gerais***

O tabagismo mantém-se o líder global como causador de mortes evitáveis, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 6 milhões de pessoas/ano e por mais de 1,5 trilhão/ano de dólares de prejuízo à economia mundial <sup>1</sup>. No Brasil, em 2010, a prevalência da população tabagista era de 18% e a perspectiva é de que em 2025, com a implantação dos projetos da Organização Mundial da Saúde, esse valor atinja 12% <sup>2</sup>. As principais causas de mortalidade associadas ao tabagismo são as neoplasias (principalmente de pulmão), as doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, e a doença pulmonar obstrutiva crônica <sup>3</sup>.

Alguns autores têm ainda descrito a influência do tabagismo no comprometimento do metabolismo ósseo, seja em sua densidade mineral, remodelamento ou consolidação de fraturas ou cirurgias ósseas <sup>4,5,6</sup>.

Existem dois tipos de fumaça de cigarro: do inglês “main stream”, que significa “corrente principal”, e “side stream”, que corresponde a “fumaça lateral”. A primeira é inalada diretamente através do filtro do cigarro, favorecendo, em estudos experimentais, a similaridade com um fumante ativo, e a última é a liberada pela ponta do cigarro aceso, assemelhando-se à aspirada por um fumante passivo.

A fumaça da “corrente principal” é rica em espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, sendo capaz de causar dano celular por meio do processo de estresse oxidativo <sup>7,8</sup>.

Aproximadamente, de 2 a 3 mg de nicotina e de 20 a 30 ml de monóxido de carbono (CO) são inalados a cada cigarro fumado. As toxinas envolvidas no aumento da morbidade pulmonar e cardiovascular são também as responsáveis pelos danos ao sistema musculoesquelético <sup>9</sup>.

Os dois tipos de fumaça de cigarro apresentam uma fase volátil (95%) e uma particular (5%). A fase volátil contém aproximadamente 500 tipos de gases, como monóxido de carbono (CO), nitrogênio (N), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), amônia (NH<sub>3</sub>), cianeto de hidrogênio (HCN) e benzeno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>). Cerca de 3500 agentes químicos são produzidos na fase particular, incluindo nicotina (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>), anatabina (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>) e anabasina (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>) <sup>10</sup>.

A nicotina é um alcaloide tóxico indutor do vício pelo cigarro. Ela causa aumento da agregação plaquetária, diminuição dos níveis de prostaciclina microvascular e inibe as funções biológicas de fibroblastos, hemácias e macrófagos. A nicotina diminui o fluxo sanguíneo das extremidades por aumento de catecolaminas, levando à vasoconstrição adrenérgica <sup>11,12,13,14,15,16,17,18</sup>. Além disso, essa substância faz a viscosidade sanguínea e os níveis de fibrinogênio elevarem-se, induzindo estado de hipercoagulação e aumentando o risco de policitemia e obstruções microvasculares <sup>19,20</sup>.

O monóxido de carbono, CO, gás tóxico liberado na queima de papel e tabaco, tem 200 vezes mais afinidade pela hemoglobina que o oxigênio, O<sub>2</sub>, formando a carboxihemoglobina e levando à diminuição da tensão de oxigênio tecidual <sup>21</sup>. A formação de carboxihemoglobina, em oposição à de oxihemoglobina,

atenua o transporte de  $O_2$ , resultando em hipóxia tecidual. Dez minutos de exposição à fumaça de cigarro leva à redução da tensão de  $O_2$  por 1 hora. Dessa forma, um fumante, ao consumir 20 cigarros ao dia, em média, encontra-se em estado de hipóxia 20 horas por dia <sup>22</sup>.

A consolidação de uma fratura depende de fatores locais e sistêmicos. Pacientes com doenças crônicas, desnutridos e tabagistas apresentam piores resultados, com maior índice de complicações que pacientes hígidos, eutróficos e não tabagistas. Não são claros os mecanismos envolvidos, mas o estado de hipóxia sistêmica e tecidual constante é apontado como o principal culpado <sup>23,24</sup>.

### ***Tecido ósseo: histoarquitetura e metabolismo***

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, servindo de suporte para as partes moles e protegendo órgãos vitais; ele aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, o tecido ósseo funciona como depósito de cálcio fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada. É um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea.

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas altamente dinâmicas: crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, têm capacidade regenerativa, isto é, o

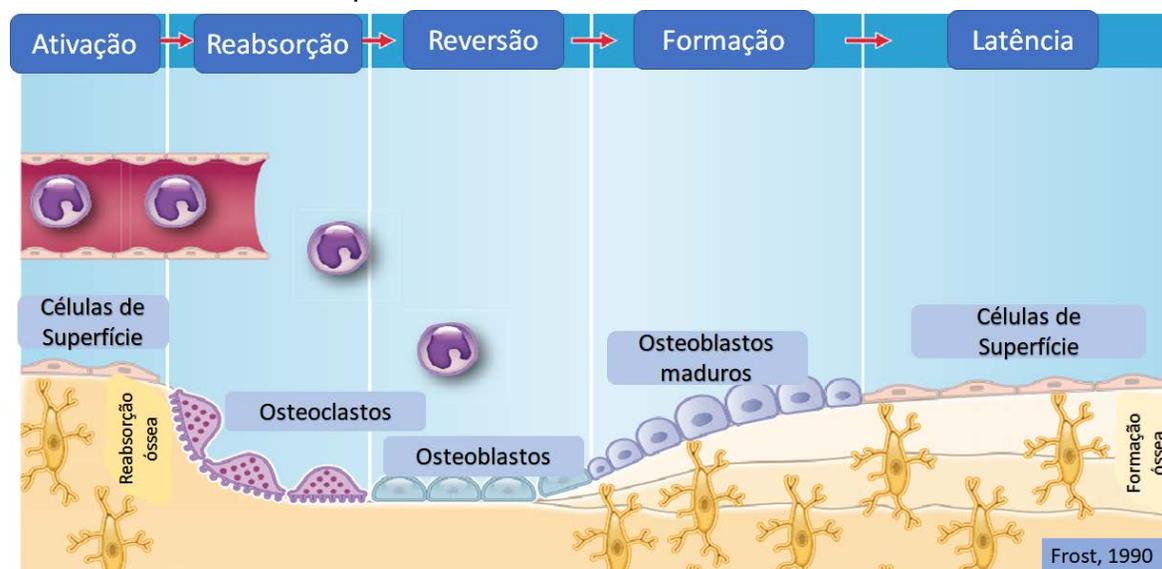
processo de reparação óssea é efetuado através da formação de osso novo, e não de tecido fibroso.

A remodelação do osso ocorre por meio da ação coordenada de diferentes tipos celulares, os quais constituem Unidade Óssea Multicelular (do inglês “bone multicellular unity” – BMU – **Figura 1**). A BMU é composta por osteoclastos (células de reabsorção), osteoblastos (células de formação), osteócitos (osteoblastos maduros “presos” à matriz óssea), células de revestimento “*lining cells*” e o sistema vascular capilar. As células do tecido ósseo são provenientes de duas linhagens celulares: a osteoblástica e a osteoclástica. A primeira é integrada por três tipos celulares: células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos. Os osteoblastos constituem a maioria das células que recobrem a matriz óssea, enquanto os osteócitos são as células situadas no interior do tecido, envolvidas por matriz extracelular óssea. Ainda, temos as células de linhagem osteoclástica, os osteoclastos, que são grandes, localizadas na superfície externa da trabécula, multinucleadas e com citoplasma bastante acidófilo <sup>25</sup>.

A remodelação óssea consiste em um mecanismo de substituição, ou de reconstrução, de áreas de tecido ósseo, de modo a preservar a integridade, aperfeiçoar a função e prevenir a degradação. No processo de remodelação, intervêm duas atividades opostas, mas complementares: a formação e a reabsorção do tecido, que ficam a cargo das células da linhagem osteoblástica e osteoclástica. Dessa forma, elimina-se uma porção de osso velho, substituindo-o por novo, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea, e assegura-se, também, a substituição de osso imaturo por osso lamelar.

Em resumo, a remodelação do osso culmina, num primeiro momento, no recrutamento e na ativação dos osteoclastos, que reabsorvem a matriz, seguidos por um período de inibição de osteoclastos por apoptose celular, enquanto osteoblastos são recrutados e diferenciam-se. Esse processo dura em média 75% do tempo total da remodelação do tecido <sup>26</sup>.

Ainda, a formação do osso é um evento multicelular, que envolve a sinalização entre as células e sua relação com uma série de proteínas, como interleucinas, e fatores de crescimento regulatórios, fundamentais para o desenvolvimento desse processo.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da remodelação óssea e ações celulares integradas da Unidade Óssea Multicelular. O processo de remodelamento ósseo segue fases distintas: quiescência, ativação, reabsorção, reversão, formação e terminação. A ativação precede a reabsorção, sendo a mineralização a etapa final. Na fase de reabsorção, os osteoblastos respondem a sinais gerados pelos osteócitos, recrutando as células precursoras de osteoclastos à área a ser remodelada. A fase de reversão, que segue a reabsorção, é caracterizada pelo desaparecimento de quase todos os osteoclastos recrutados. A fase de formação caracteriza-se pela substituição das células osteoclásticas por numerosos osteoblastos. A fase de terminação configura-se pela diferenciação final de osteoblastos em osteócitos e células de revestimento, obtendo-se matriz mineralizada. O tecido ósseo permanece em “repouso” até uma nova onda de remodelamento iniciar-se, fase quiescente. (BMU) Frost 1990

### ***Osteoclastos e osteoclastogênese***

Os osteoclastos desempenham função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo; são células altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, desenvolvendo, para esse fim, uma eficaz e complexa maquinaria, que lhes confere características e capacidades únicas.

Podem ser observadas nas superfícies ósseas, principalmente, no endóstio, e, ocasionalmente, na superfície do perióstio. A região óssea a ser reabsorvida apresenta a forma de uma cripta ou lacuna, recebendo a designação de lacuna de *Howship*.

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial, composto por duas fases consecutivas. A primeira refere-se a um processo de acidificação do compartimento anteriormente mencionado (através da produção de prótons H<sup>+</sup> e ânions Cl<sup>-</sup>), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, constituintes da etapa mineral da matriz óssea. Numa segunda fase, tem lugar a degradação completa da fase orgânica por ação de numerosas enzimas proteolíticas (catepsinas e metaloproteínas de matriz).

Na série osteoclástica, podemos incluir os monócitos circulantes, os monócitos, presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos. Estes são membros da linhagem celular dos monócitos-macrófagos, podendo a sua diferenciação resultar de precursores mieloides (medula óssea – série hematopoiética), mas também de células macrofágicas já bem diferenciadas.

Assim sendo, podemos considerar que o osteoclasto não será uma verdadeira célula óssea, mas sim uma célula sanguínea altamente especializada,

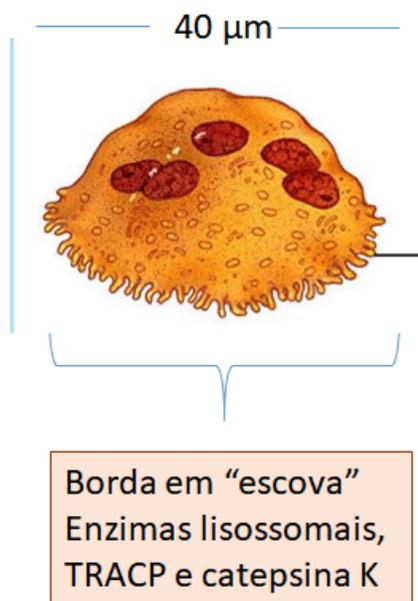
que possui muitas características imunológicas. A semelhança filogenética entre o sistema imunológico e o osteoarticular resulta numa forte comunicação e integração entre esses dois sistemas, nos quais o osteoclasto ocupa uma posição-chave.

A osteoclastogênese inicia-se através da expressão de RANKL (receptor ativador de fator nuclear  $\kappa\beta$  ligante), por células de revestimento e/ou por osteócitos, que se ligam ao RANK, localizado na superfície de pré-osteoclastos. Essa ligação promove o início da cascata de sinalização celular, culminando na ativação e na diferenciação de osteoclastos. Ainda, o fator de crescimento (TGF- $\beta$ ) e o estrógeno estão envolvidos na indução de apoptose de osteoclastos, enquanto o paratormônio (PTH), o TNF- $\alpha$ , a Vitamina D e a Interleucina-1 (IL-1) podem ter efeito supressor de apoptose, prolongando a atividade osteoclástica.

Atualmente, está bem estabelecido que a interação entre as células da linhagem osteoblástica e osteoclástica constitui um pré-requisito necessário e, até bem pouco tempo, essencial para a maturação e ativação dos osteoclastos <sup>27</sup>.

Como já mencionado anteriormente, na região de remodelação, os osteoclastos tornam-se polarizados (**Figura 2**), com variações da morfologia da membrana celular, podendo-se identificar diversas zonas funcionalmente distintas. Adjacente à superfície óssea, a membrana celular do osteoclasto desenvolve numerosas invaginações, formando uma borda em escova. Periféricamente a esta, há uma região do citoplasma semelhante a uma faixa, diretamente apoiada na matriz óssea, denominada de zona clara. Essa zona, porção desprovida de organelas e rica em actina e miosina, é a responsável pela adesão do osteoclasto

à superfície óssea, delimitando, dessa forma, a borda em escova, compartimento onde ocorre a desmineralização, bem como a degradação da matriz proteica óssea. Esse compartimento cria um microambiente propício à liberação e à atividade das enzimas proteolíticas do osteoclasto, o que, junto à geração de prótons pela enzima anidrase carbônica, promove um ambiente ácido, favorecendo a desmineralização da matriz <sup>27,28</sup>.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo do osteoclasto diferenciado. A borda em escova (Ruffled Border) permanece aderida à matriz e, através da liberação local de enzimas lisossômicas, TRACP e catepsina K, bem como da acidificação da matriz, "dígere" o tecido mineralizado, liberando localmente a fase mineral e degradando as proteínas matriciais. Peckham, 2004 Histology Guide, University of Leeds

Entre essas enzimas estão as metaloproteinases da matriz, que podem ser ativadas em ambientes ácidos e também contribuir para a degradação da matriz óssea <sup>29</sup>.

O processo de reabsorção pode autorregular-se devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica, o que significaria o desenvolvimento de uma matriz porosa adjacente à borda em escova do osteoclasto. Essa matriz porosa é capaz de provocar o rompimento da adesão do osteoclasto e, conseqüentemente, seu deslocamento. Além disso, após a reabsorção, os osteoclastos podem migrar para outros sítios, onde o tecido ósseo deve ser reabsorvido, bem como se deslocar da superfície óssea e permanecer como células inativas.

Apesar de terem como função principal a desmineralização e a degradação da matriz óssea, existem fortes evidências de que os osteoclastos são também capazes de internalizar e digerir células e/ou restos celulares <sup>30,31</sup>.

Estudos prévios demonstram que os osteoblastos e os osteócitos em apoptose podem estimular a migração de outros osteoclastos para sítios que devem ser reabsorvidos. Os osteoclastos atraídos para esses sítios imediatamente reconhecem e internalizam os osteoblastos e/ou osteócitos em apoptose <sup>32,33,34</sup>.

## ***Osteoblastos***

O outro tipo celular constituinte da BMU, proveniente da linhagem mesenquimal e único responsável pela formação de matriz óssea, é o osteoblasto.

Os osteoblastos tornam-se maduros quando atingem a superfície óssea, apresentando-se, então, como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteoide). Entre essas células, formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), fundamentais para a ligação e a comunicação entre células adjacentes. Os osteoblastos maduros são células sem capacidade de divisão, mas metabolicamente muito ativas.

Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos, estão o colágeno do tipo I e as proteínas não colagenosas, como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea, entre outras. Essas proteínas não colagênicas têm uma importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno aos cristais minerais de hidroxiapatita. Ainda nesse contexto, é necessário enfatizar o fato de osteoblastos sintetizarem muitos e variados fatores de crescimento, os quais ficam incorporados na matriz óssea e desempenham um papel determinante tanto na formação de tecido ósseo como na diferenciação e na atividade dos osteoclastos.

Existem quatro estágios identificados na diferenciação dos osteoblastos: pré-osteoblasto, osteoblasto, osteócito e células de superfície. Morfologicamente, os pré-osteoblastos assemelham-se aos osteoblastos e são corados positivamente

para fosfatase alcalina, porém não têm a capacidade de produzir tecido mineralizado.<sup>35,36</sup>

Os pré-osteoblastos dão origem aos osteoblastos maduros, caracterizados por um padrão morfológico cuboide e por intensa positividade pela coloração da fosfatase alcalina. Essas células são responsáveis pela produção de colágeno tipo I, a proteína estrutural fundamental da matriz óssea, e também pela produção de outros tipos de colágeno, como III, IV e V, presentes em menor proporção na matriz fibrilar, osteocalcina (proteína dependente de Vitamina K específica do osso) e fosfatase alcalina, necessárias para deposição da matriz mineral do osso.

Os osteoblastos também funcionam como receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea por apresentarem receptores para hormônios, como o da tireoide, o da paratireoide (PTH), os estrogênios, os glicocorticoides, a insulina e a vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D3). Também são responsáveis pela liberação de fatores de regulação, como Interleucina-6 (IL-6), e de crescimento, como TGF- $\beta$ , fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e nas atividades osteoblásticas<sup>37</sup>.

Além disso, os osteoblastos têm a capacidade de modificar a matriz adjacente, removendo ou alterando as proteoglicanas e as glicoproteínas. A mineralização da matriz tem início através da secreção de vários fatores reguladores, como IL-6, TGF- $\beta$  e Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Assim, diversos fatores sistêmicos e locais controlam a proliferação, a atividade e a sobrevivência dos osteoblastos. Ainda, alguns autores afirmam que os osteoblastos e/ou osteócitos

podem sofrer apoptose em consequência, por exemplo, de trauma mecânico <sup>38</sup> ou de deficiência de estrogênio <sup>39,40</sup>.

Em condições fisiológicas, a apoptose de osteoblastos parece exercer um papel importante no controle do crescimento ósseo <sup>41</sup>.

Estudos anteriores mostram que os osteoblastos, além de participarem na formação e na mineralização da matriz óssea, podem também fagocitar os fragmentos de células que entraram em apoptose durante o início da formação óssea <sup>42</sup>.

Terminado o período de secreção ativa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo ou em osteócitos, podendo desaparecer do local de formação óssea, provavelmente, por apoptose <sup>43</sup>.

Por outro lado, as células de revestimento ósseo (*lining cells*) formam uma camada contínua de células achatadas que reveste a maior parte da matriz calcificada, situando-se ao longo das superfícies do endóstio. Elas apresentam uma capacidade de síntese reduzida, sendo consideradas quiescentes ou de repouso. Porém, podem reverter-se em células osteoblásticas ativas se devidamente estimuladas, sendo-lhes atribuído um papel cada vez mais relevante nos processos de remodelação óssea.

O osteoblasto, ao envolver-se completamente na matriz óssea calcificada, fica aprisionado em cavidades, diferenciando-se em osteócitos.

## **Osteócitos**

Os osteócitos representam o tipo celular mais abundante no tecido ósseo <sup>28</sup>. São células elípticas, menores que os osteoblastos, e apresentam diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior de pequenos canais, denominados canalículos ósseos. Esses prolongamentos citoplasmáticos estendem-se em direção aos prolongamentos de outros osteócitos adjacentes, aos dos osteoblastos e aos de células de revestimento ósseo do endóstio e do perióstio, estabelecendo junções tipo *gap* entre essas células. Essas junções, localizadas entre os prolongamentos dos osteócitos e dos osteoblastos, permitem que mesmo os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso possam responder às modificações sistêmicas e reconhecer pequenas falhas na integridade estrutural, iniciando a osteoclastogênese e consequente remodelamento ósseo. Ainda, os canalículos ósseos constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, rede esta responsável pela manutenção e pela vitalidade da matriz óssea <sup>37</sup>.

Também já foi postulado que a apoptose dos osteócitos pode atrair e estimular a atividade dos osteoclastos, iniciando o remodelamento ósseo <sup>44,45</sup>.

Devido ao seu elevado número e a sua complexa organização e disposição, os osteócitos estão numa situação privilegiada para captar as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que atuam sobre o osso (mecanossensores). Essas informações são depois transmitidas às células da superfície para que elas

possam ativar os processos de remodelação óssea sempre que estes sejam necessários.

O mecanismo pelo qual as forças mecânicas conseguem regular os processos celulares é designado mecanotransdução. Assim sendo, a mecanotransdução pode ser entendida como a conversão de um sinal de natureza mecânica (força) numa resposta celular de natureza bioquímica. Em outras palavras, podemos considerar o mecanismo de transdução como um processo pelo qual células (células receptoras) detectam ou “sentem” sinais mecânicos (forças ou tensões aplicadas), gerando uma resposta celular (de natureza bioquímica) dirigida às células-alvo (células efetoras). Estas vão, por sua vez, ativar ou modular os procedimentos de remodelação. Os osteócitos constituem, nessas circunstâncias, as células receptoras ou mecanosensoras; os osteoblastos, as células de revestimento ósseo, e os osteoclastos, as células efetoras.

Portanto, em condições fisiológicas, existe no tecido ósseo uma íntima relação e integração entre estímulos mecânicos e respostas celulares, visando, além da sobrevivência e da funcionalidade dos osteócitos, uma constante adaptação ou reparação da microestrutura óssea. Os processos de remodelação são a tradução funcional dessas respostas celulares, sendo os osteócitos os principais “guardiões” do tecido ósseo.

### ***Células de revestimento ósseo***

As células de revestimento recobrem as superfícies ósseas quiescentes. Essas células exibem escassas organelas de síntese e secreção de proteínas e

formam uma camada contínua de células interconectadas capaz de manter a homeostase, regulando a concentração plasmática de cálcio por mecanismos parcialmente independentes dos relacionados ao sistema de remodelação óssea <sup>46</sup>.

A transição do osteoblasto para células de superfície envolve mudanças morfológicas e funcionais graduais, que culminam com a diminuição da secreção de proteínas. Essa transformação pode representar o fenótipo final da linhagem osteoblástica. No entanto, sob efeito de estímulos, elas podem diferenciar-se em osteoblastos e, conseqüentemente, voltar a produzir matriz óssea <sup>27</sup>.

Desse modo, elas desempenham um importante papel na manutenção/homeostase da matriz óssea e influenciam no metabolismo de cálcio e fosfato e na troca de substâncias. Além disso, como já mencionado, acredita-se serem elas responsáveis pela produção de moléculas que ativam a complexa cascata que culmina na remodelação do osso <sup>47</sup>.

### ***Dinâmica do tecido ósseo: Remodelação óssea***

O tecido ósseo, em diversos momentos, precisa modificar sua forma ou estrutura. Seja para um osso primário (primeiro tecido ósseo formado) tornar-se maduro, para um osso crescer mantendo sua forma, para um osso esponjoso tornar-se compacto ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas, o osso está em constante remodelação, por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea, que são processos estreitamente acoplados.

O desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético dependem do remodelamento ósseo equilibrado, ou seja, da dinâmica balanceada entre a

atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, firmemente controlada pelo sistema imune. Se este balanço pender a favor dos osteoclastos, podem ocorrer alterações na reabsorção, como nas periodontites, na artrite reumatoide, em doenças osteoporóticas primárias ou secundárias e em tumores ósseos <sup>48</sup>.

Previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os osteoblastos/células de revestimento ósseo produzem colagenase, removendo a camada de osteoide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos, que se tornam ativos em contato direto com tal matriz mineralizada <sup>49</sup>.

Outra possibilidade de modular a formação e a atividade osteoclástica seria a partir de sinais gerados no microambiente, com a liberação de citocinas. As citocinas são moléculas de regulação, solúveis, de baixo peso molecular, expressas como proteínas de membrana ou secretadas, que se ligam a receptores específicos em células-alvo; têm um papel vital tanto na regulação do tecido ósseo como em condições de estresse ou trauma <sup>27</sup>.



doença osteoporótica pós-transplante, em tabagistas ou em pacientes imunossuprimidos, e doença periodontal. O conhecimento dos fatores que interferem na proliferação, migração, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas pode contribuir para a descoberta e a implantação de novas alternativas terapêuticas <sup>50</sup>.

### ***Composição bioquímica e molecular da matriz óssea***

A matriz óssea é constituída por uma porção mineral que descansa sobre uma organizada base de colágeno, a matriz fibrilar do osso, sendo responsável por conferir propriedades mecânicas características do osso, bem como por auxiliar em algumas funções regulatórias celulares.

O componente inorgânico mineral representa aproximadamente 60% da massa óssea, enquanto o orgânico contribui com pouco mais de 20% e a água com aproximadamente 10%. A porção inorgânica, encarregada pela sua resistência à compressão, é formada por cristais de cálcio e fosfato (hidroxiapatita:  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), além de íons como o sódio, o potássio, o magnésio e o carbonato <sup>21,27</sup>. O componente orgânico, maioritariamente constituído por colágeno, confere ao osso uma grande capacidade de resistência às forças de tensão; já o inorgânico resiste às forças de compressão. Um osso longo desmineralizado, como o perônio, permite a aplicação de forças significativas de distensão longitudinal ou o seu envelhecimento em forma de "nó de gravata" sem se fraturar. Pelo contrário, a remoção da matriz orgânica de um osso longo torna-o rígido, porém mais suscetível às deformações e aos traumatismos diretos. A matriz óssea tem uma grande

durabilidade e estabilidade, comprovada pelo fato de manter-se inalterável e de reter muita da sua resistência durante séculos após a morte do organismo.

A matriz orgânica do tecido ósseo assemelha-se muito à matriz dos tecidos conjuntivos densos, como a dos tendões e dos ligamentos. De fato, as fibras de colágeno formam cerca de 90% de toda a matriz proteica do osso. Aproximadamente 80% do colágeno presente no osso lamelar é composto pelo tipo I. O colágeno do tipo III ocupa cerca de 5-15%, enquanto os do tipo IV, V, VI e VII constituem menos de 5% da matriz fibrilar óssea. A matriz orgânica inclui fibras colágenas, proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina e osteopontina, bem como citocinas IL-1, IL-6, RANKL, OPG e fatores de crescimento BMP's, TGF- $\beta$ , FGF, IGF, PDGF sendo as fibras colágenas essenciais para manter a integridade do tecido <sup>51</sup>.

### ***Características moleculares das fibras colágenas***

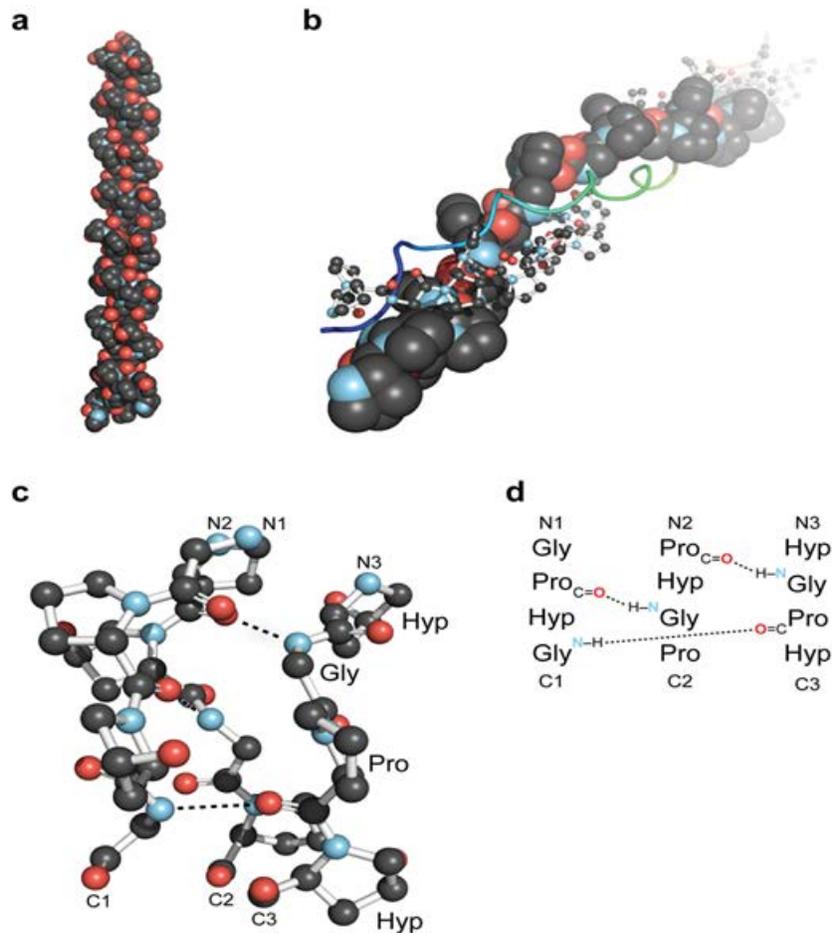
O colágeno é uma glicoproteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, estando presente em quase todos os tecidos, assim como no osso, e sendo o responsável por grande parte das propriedades físico-teciduals. As características biomecânicas dos tecidos resultam da organização dos colágenos em macromoléculas que fornecem não apenas suporte, mas apresentam importante papel funcional, determinado pelos domínios proteicos adicionais das cadeias de colágeno. Além de atuar como suporte, o colágeno também participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Ainda, o colágeno pode exercer função antigênica, variando de acordo com o tipo e o órgão envolvido <sup>52,53</sup>.

As moléculas de colágeno são formadas por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias alfa ( $\alpha$ ), arranjadas numa conformação de tripla hélice, que se estabiliza por pontes de hidrogênio entre as cadeias, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão <sup>54</sup>.

Essas cadeias podem ser idênticas (homotriméricas) ou distintas (heterotriméricas), sendo essas últimas mais frequentes entre as fibras de colágeno<sup>55</sup>.

As cadeias  $\alpha$  do colágeno podem variar em tamanho, desde 662 até 3152 aminoácidos, e cada uma delas conta com uma sequência de aminoácidos específica, além de repetições *Glicina-X-Y*, nas quais X é frequentemente prolina e Y, hidroxiprolina, formação molecular específica do colágeno (**Figura 4**). Essas cadeias  $\alpha$  possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem parte da trílice hélice e são denominadas de telopeptídeos, também conhecidos como extensão não colagenosa (NC) da molécula <sup>56</sup>.

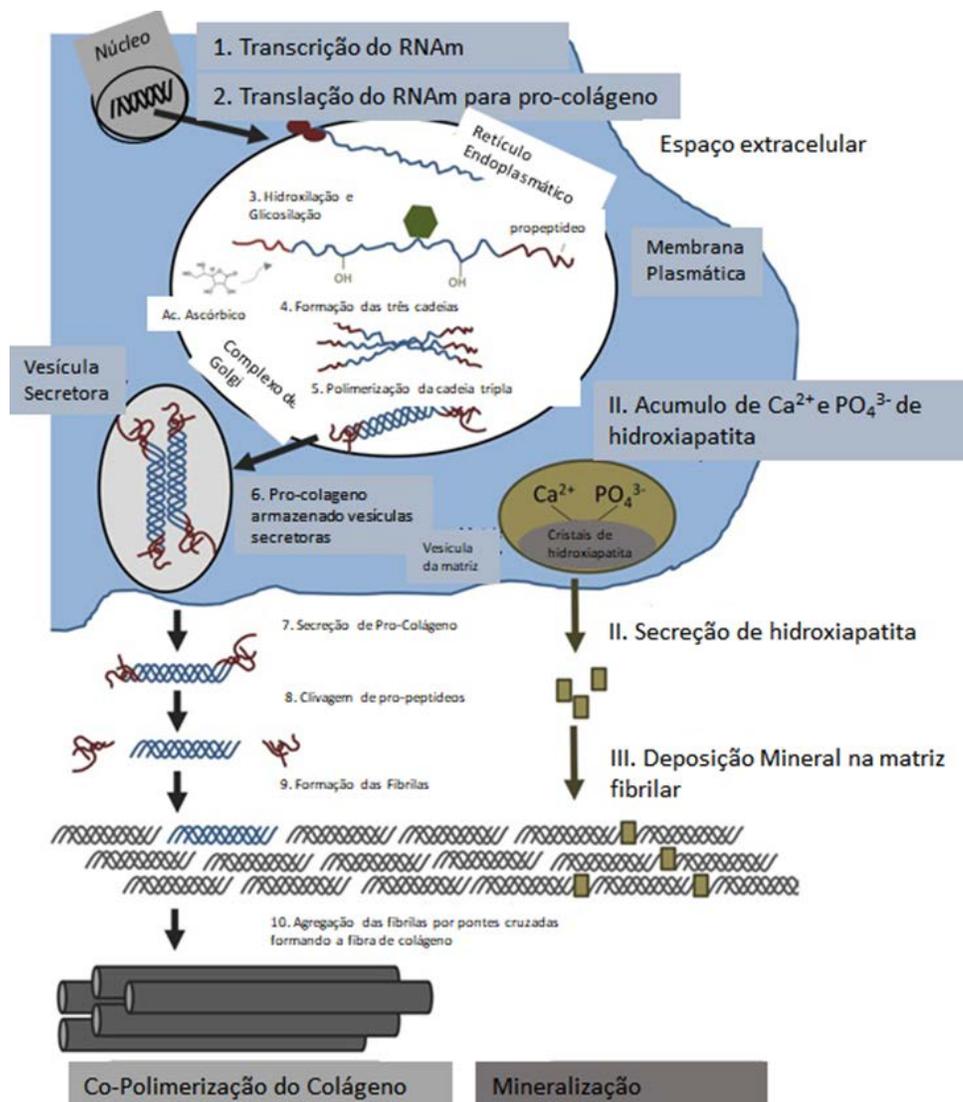
Existem duas extensões na molécula de colágeno, NH<sub>2</sub> (aminoterminal) e COOH (carboxiterminal). Há evidências de que o domínio COOH contém informações essenciais para a formação da tríplice hélice, enquanto o NH<sub>2</sub>-terminal apresenta dados importantes para a regulação final do diâmetro das fibrilas <sup>53</sup>.



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da hélice tripla do colágeno. Em (a) mostra a primeira estrutura cristalina de alta resolução de uma tripla hélice do colágeno formado a partir de (ProHypGly)<sub>4</sub> - (ProHypAla) - (ProHypGly)<sub>5</sub>. Em (b) observa-se o eixo de uma tripla hélice (ProProGly)<sub>10</sub> com três linhas preenchidas, demonstradas como uma fita. Em (c) nota-se a tripla hélice destacando-se pela ligação com hidrogênio. Observam-se em (d) os três tipos de ligação para esse papel. Fonte: Adaptado de Shoulders MD e Raines RT, 2009.

A biossíntese do colágeno é extensivamente estudada em colágenos que formam fibrilas, que são sintetizados como moléculas de pró-colágeno, compostas por um propeptídeo amino-terminal (NH<sub>2</sub>), seguido por um curto N-telopectídeo não helicoidal, uma tripla hélice central, um C-telopectídeo e um propeptídeo carboxi-terminal (COOH) <sup>54</sup>.

O processo de biossíntese do colágeno é composto de várias etapas bioquímicas que se iniciam no núcleo com a transcrição gênica, estimulada por fatores de crescimento, incluindo o TGF- $\beta$  [55]. Após a tradução, as cadeias pró-alfa sofrem modificações pós-translacionais no retículo endoplasmático rugoso, tais como hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina e posterior glicosilação dos resíduos de lisina e de hidroxilisina, sendo essa última fundamental para a formação das pontes cruzadas intramoleculares de hidrogênio, que conferem estabilidade à molécula <sup>52,53,54</sup>. No retículo endoplasmático rugoso, após solvatação dos resíduos de tirosina, as três cadeias alfas entrelaçam-se, formando as moléculas em forma de tripla hélice, estabilizadas por pontes de hidrogênio. Essas moléculas de pró-colágeno são acondicionadas no Complexo de Golgi e posteriormente secretadas na matriz extracelular na forma de pró-colágeno, recebendo a adição dos cristais de hidroxiapatita para a formação da matriz óssea (**Figura 5**) <sup>57,58,59</sup>.



**Figura 5.** A organização fibrilar e sua mineralização é um processo complexo envolvendo passos intra e extracelulares. A síntese da molécula precursora de pró-colágeno ocorre no ambiente intranuclear de osteoblastos e fibroblastos por meio da transcrição do mRNA a partir de segmento específico do DNA. No citoplasma, ocorre a translação das cadeias de polipeptídeos, chamadas de pre-pro-colágeno, que ao se organizar em hélice tripla no retículo endoplasmático recebem o nome de pró-colágeno. No complexo de Golgi, as moléculas são secretadas por vesículas e liberadas no espaço extracelular. Assim que liberadas das células, as fibras de colágeno agora chamadas de tropocolágeno após ação enzimática, polimerizam-se adjacentes à membrana celular, formando fibras de colágeno longas, paralelas e interconectadas. Paralelamente à formação das fibras de colágeno, ocorre também em etapas intra e extracelulares a mineralização da matriz. Na primeira etapa, o acúmulo de Cálcio e fosfatos no citoplasma dos osteoblastos leva à formação de cristais de hidroxapatita na presença de fosfatase alcalina, secretada para o espaço extracelular onde se depositam paralelamente às fibras de colágeno, preenchendo todo o espaço vazio entre as fibrilas. Fonte: Adaptado de Wittkowske C. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Nov 2016 doi: 10.3389/fbioe.2016.00087

Em geral, após secreção na matriz extracelular, os pró-peptídeos amino e carboxi-terminais são removidos das cadeias alfas pelas NH<sub>2</sub> e COOH-proteinase. Esse processo resulta em uma molécula nativa de tripla hélice, com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1.5nm de diâmetro, a qual retém os telopeptídeos curtos, com poucos aminoácidos. No processo de fibrilogênese, as moléculas de colágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda, formando as fibrilas de colágeno <sup>52,53,57,58</sup>.

Estas apresentam um padrão de bandeamento com uma periodicidade (D) que varia de 64nm a 67nm e, quando analisadas por microscopia eletrônica, revelam a presença característica de bandas claras e escuras <sup>61</sup>.

### ***Relação entre os colágenos fibrilares no tecido ósseo***

Como abordamos nos itens anteriores, o colágeno do tipo I é o constituinte mais importante da matriz orgânica do osso. Ele pertence ao grupo dos colágenos fibrilares, é mais espesso que os demais e é heterotrimérico. É formado por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$  [ $\alpha 1(I)$ ]<sub>2</sub>,  $\alpha 2(I)$ , a partir dos genes COL1A1 e COL1A2 <sup>52</sup>.

Estudos recentes sugerem que o diâmetro das fibrilas é inversamente proporcional à flexibilidade molecular do colágeno <sup>62</sup>, levando-o a exercer importante papel como substrato adesivo para muitas células, além de participar do desenvolvimento de órgãos e de tecidos, por meio dos processos de migração, proliferação e diferenciação celular, e da cicatrização e do remodelamento tecidual. As células reconhecem o colágeno tipo I nativo através das integrinas do meio extracelular para o intracelular e ativam a secreção de algumas proteínas

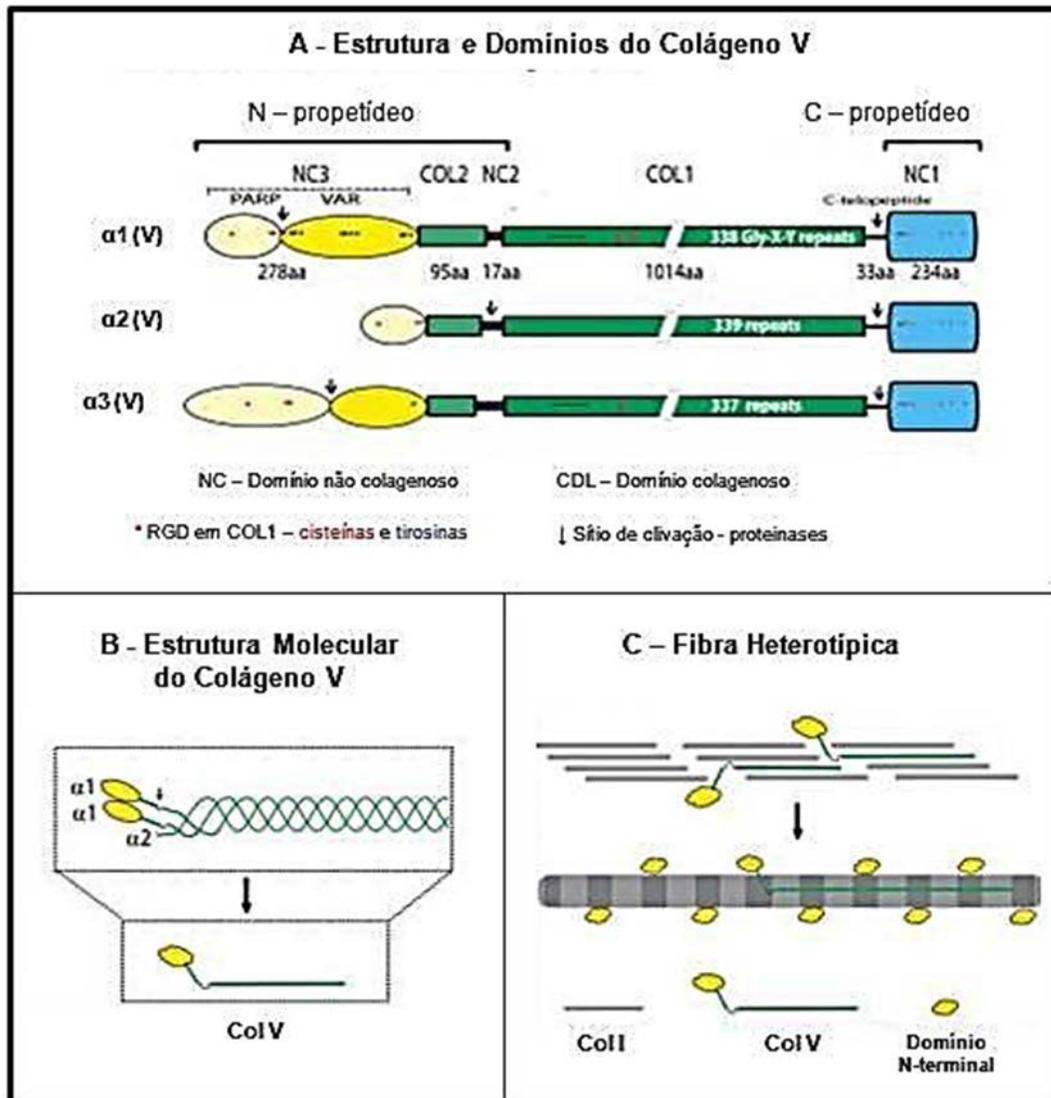
específicas, assim como as do citoesqueleto de actina<sup>63</sup>. Outro importante colágeno fibrilar presente no osso é o tipo III. Este é homotrimérico, formado por 3 cadeias  $\alpha 1$  idênticas  $[\alpha 1(\text{III})]_3$ , ligadas por pontes de sulfeto; está presente nos vasos e capilares, formando fibras reticulares finas, com cerca de 20nm de diâmetro. Apesar disso, ele também contribui para a integridade vascular e estima-se que represente cerca de 2-3% do total de colágeno nesse tecido. Ainda, esse tipo de colágeno possui alto teor de glicosilação e associa-se a glicoproteínas e a proteoglicanos da matriz orgânica do osso<sup>62</sup>. Embora o colágeno tipo V também seja fibrilar, ainda assim ele representa cerca de 2 a 3% do total de fibras de colágeno no osso, sendo considerado um dos menores colágenos fibrilares. Ele apresenta-se no osso na isoforma heterotrimérica, com duas cadeias  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$   $[\alpha 1(\text{V})]_2, \alpha 2(\text{V})$ , a qual participa tanto na organização quanto na estabilidade da matriz extracelular. Durante a sua síntese, diferentemente dos outros colágenos fibrilares, a cadeia  $\alpha 1$  do colágeno tipo V retém o domínio globular pró-peptídeo amino ( $\text{NH}_2$ )-terminal<sup>64</sup>.

Tanto no osso como em outros tecidos, os colágenos tipo I, III e V copolimerizam-se para formar fibrilas heterotípicas, ou seja, constituídas por colágenos diferentes. O tipo V localiza-se no interior das fibrilas heterotípicas e é considerado o nucleador dessas fibrilas. A principal função dele é regular o diâmetro das fibrilas heterotípicas, devido ao domínio globular amino-terminal da cadeia  $\alpha 1$ , que se projeta para fora das fibrilas heterotípicas, dificultando fisicamente a agregação de fibrilas de colágenos tipo I e III<sup>52, 65</sup>. Portanto, quando o colágeno tipo V encontra-se em maior proporção, as fibras heterotípicas são mais finas; apresentando menor proporção, elas são mais grossas.

O colágeno tipo V é sistematicamente distribuído, sendo encontrado na maioria dos tecidos. Esse tipo de colágeno caracteriza-se por compor diferentes isoformas, das quais a mais frequente é a heterotrimérica  $[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$ , presente no interstício de órgãos como pele, pulmão, esôfago, rins, matriz óssea, sinóvia, estroma da córnea e outros <sup>66,67</sup>.

Além dessa, outras isoformas também são encontradas: heterotrimérica, com três cadeias distintas  $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$ , achada em placenta humana e bovina, e homotrimérica  $[\alpha 1(V)]_3$ , vista no endométrio de camundongos e na região da interface dermo-epidérmica <sup>68,69</sup>.

Como citado anteriormente, o colágeno V é quantitativamente o menor componente de tecidos que contém fibrilas heterotípicas, variando de 2 a 5% do total de fibras de colágeno. Similar aos outros colágenos fibrilares, o colágeno tipo V é sintetizado na forma de pró-colágeno, com os domínios amino e carboxi-terminais. Porém, no ambiente extracelular, enquanto o domínio C-pró-peptídeos terminal de todas as cadeias é clivado por carboxi-peptidases, apenas o domínio globular N-pró-peptídeo terminal da cadeia  $\alpha 2(V)$  é clivado por amino-peptidases, permanecendo na molécula o domínio amino terminal da cadeia  $\alpha 1$ . Essa característica diferencia o colágeno tipo V de outros colágenos fibrilares, como os tipos I e III, fazendo-o, portanto, ser atualmente considerado pertencente à subclasse de colágenos fibrilares reguladores, caracterizados por transformação incompleta do N-propeptídeo (**Figura 6 A,B**) <sup>52,67,70</sup>.



**Figura 6.** Estrutura do Colágeno tipo V. **A)** Colágeno V formado por três cadeias  $\alpha$ . A estrutura dos domínios das cadeias  $\alpha$  juntamente com o número de aminoácidos (aa) para a cadeia  $\alpha 1$ . Todas as cadeias contêm o pró-peptídeo C-terminal (NC1). Uma pequena porção da sequência não colagenosa (C-telopeptídeo) permanece na extremidade C-terminal. O domínio colagenoso (COL1) é composto por uma sequência de Gly-X-Y. O (COL2) é o domínio N-terminal que está separado do domínio COL1 por um domínio não colágeno (NC2). Nas cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$ , o domínio N-terminal (NC3) é composto por um domínio PARP (prolina e arginina) e um domínio variável VAR. Os locais de clivagem das N- e C-proteinase estão indicadas ( $\downarrow$ ). **B)** A estrutura da isoforma mais comumente encontrada do colágeno V [ $\alpha 1(V)$ ] $_2$   $\alpha 2(V)$  é apresentada. **C)** Formação das fibrilas heterotípicas de colágenos I e V. O colágeno tipo I forma um arcabouço da fibrila e o colágeno tipo V, que retém um domínio globular N-terminal, localiza-se no interior da fibrila. Esse domínio globular, voltado para o exterior da fibrila, impede a agregação de mais moléculas de colágeno e, desse modo, regula o diâmetro das fibrilas heterotípicas. **Fonte:** Adaptado de Smith SM, Birk DE, 2012.

O colágeno tipo V copolimeriza-se com os tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V), sendo o responsável pela regulação da fibrilogênese, por nucleação das fibrilas de colágeno em formação (**Figura 6 C e Figura 7**)<sup>64,71</sup>.

A porção tripla hélice helicoidal da molécula de o colágeno tipo V encontra-se oculta no interior dessas fibrilas e o domínio globular amino terminal da cadeia  $\alpha 1(V)$  projeta-se para a superfície (**Figura 7**). Esse domínio regula o crescimento fibrilar, impedindo fisicamente que novos monômeros de colágeno I acrescentem-se à fibrila. Assim, tecidos com menos colágeno tipo V têm fibrilas com diâmetro maior e tecidos com mais o colágeno tipo V, como a córnea ou o humor vítreo, têm fibrilas finas, característica fundamental para conferir a transparência desta matriz<sup>65</sup>.

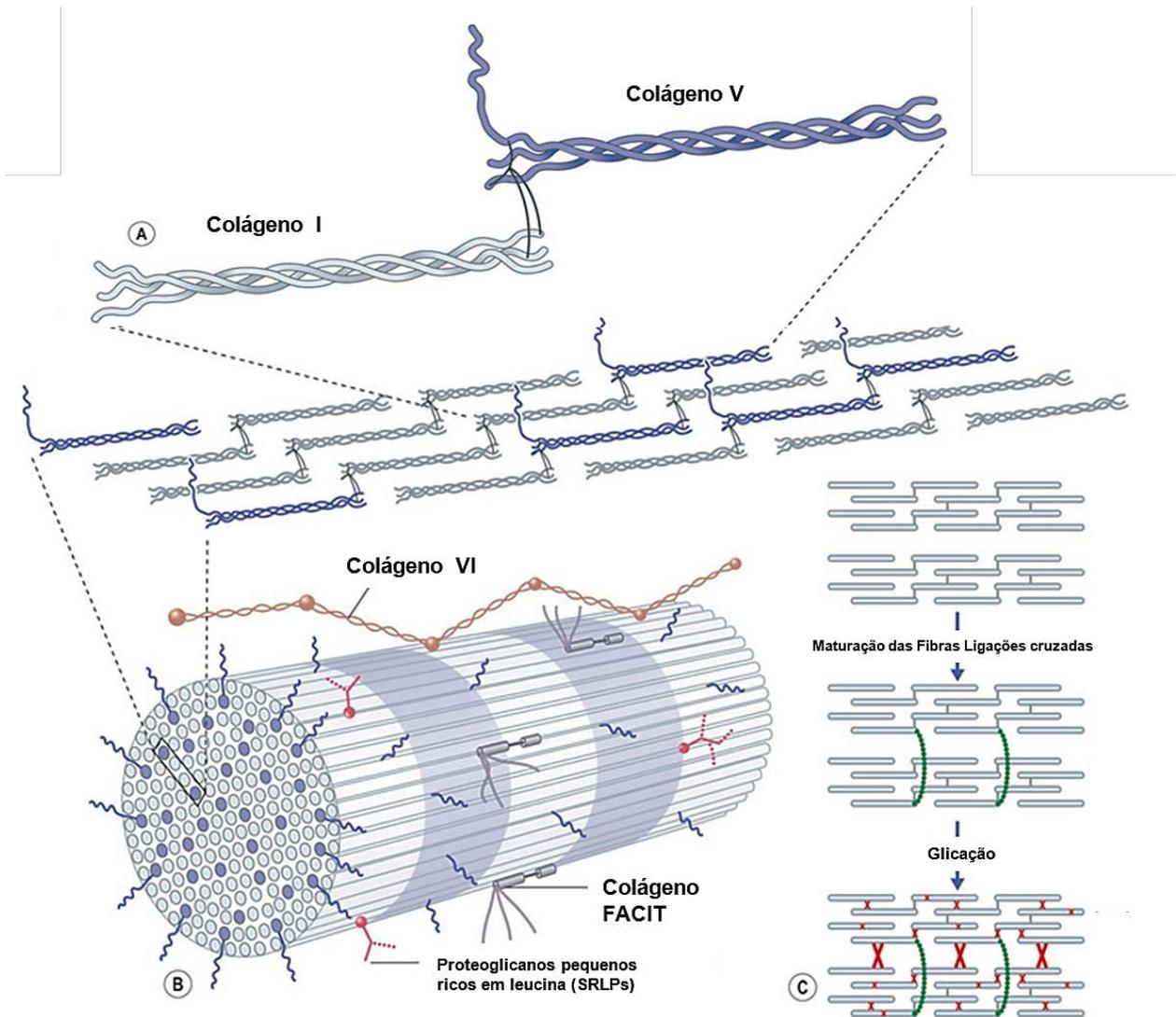
Estudos demonstram que o diâmetro das fibrilas parece ser inversamente proporcional à flexibilidade molecular do colágeno<sup>64,71</sup>.

Enquanto a cadeia  $\alpha 1(V)$  está relacionada à regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, a  $\alpha 2(V)$  é importante na regulação da fibrilogênese<sup>64, 71,72</sup>.

Além das propriedades acima mencionadas, o colágeno tipo V apresenta uma série de características peculiares, devido à retenção do N-pró-peptídeo terminal, sendo o mais imunogênico entre os colágenos fibrilares<sup>64,66</sup>.

As propriedades do colágeno tipo V de adesão, migração e proliferação celular estão em grande parte relacionadas às sequências como a RGD (arginina, glicina e ácido aspártico), presentes em maior quantidade na cadeia  $\alpha 2$  que na  $\alpha 1$ <sup>73</sup>.

A adesão do colágeno tipo V às células é mediada principalmente pelas integrinas  $\alpha1\beta1$  e  $\alpha2\beta1$ , que são receptores presentes nas membranas das células e dependem da conformação em tripla hélice do colágeno <sup>73,74</sup>.



**Figura 7.** Desenho esquemático da interação dos colágenos I e V nas fibras heterotípicas. **Fonte:** Adaptado de Adler's Physiology of the Eye 2011(90).

A adesão do Col V às células pode também ocorrer independentemente das sequências RGD. Nesse aspecto, foi demonstrado que a porção tripla hélice da cadeia  $\alpha 1(V)$  possui um fragmento de 30 Kd, o qual contém um agrupamento de resíduos de aminoácidos básicos com grande afinidade em relação à heparina e ao sulfato de heparina<sup>75,76</sup>.

Além disso, comprovou-se que o colágeno tipo V possui um anel altamente carregado positivamente em torno da molécula, particularmente evidente para a cadeia  $\alpha 1(V)$ , o que poderia reforçar a sua interação com as moléculas de heparina aniônica. Desse modo, o sítio do colágeno tipo V ligante da heparina interage com os PG de sulfato de heparan na superfície das células, desencadeando sinais de estimulação celular, e também na MEC dos tecidos. Para que essa ligação se complete, o colágeno tipo V deve apresentar-se sob a forma de tripla hélice<sup>75,77</sup>.

Estudos prévios indicaram que a interação entre fibras de colágeno tipo I e V em estudo "in vitro" resultou na regulação do diâmetro das fibras em diversos tecidos conjuntivos<sup>64,71</sup>.

As fibras de colágeno tipo I e V polimerizaram-se em fibras heterotípicas, como as observadas "in vivo". Essa interação e disposição das fibras possibilita, pelo menos em parte, o controle do diâmetro da fibra de colágeno pelo domínio amino-terminal ( $NH_2$ ) da molécula do colágeno V. O tipo I apresenta-se formado por fibrilas de diâmetros variados, mas em presença de maiores quantidades de colágeno V, a tendência é a diminuição progressiva do diâmetro destas.

### ***Tabagismo e matriz óssea***

Apesar das evidências clássicas apresentadas na literatura, ressaltando os efeitos deletérios da fumaça do cigarro nos processos de cicatrização tecidual <sup>6, 13</sup>, pouco se sabe sobre os efeitos exercidos sobre as células ósseas. Alguns estudos em cultura de células e em modelos experimentais foram desenvolvidos no intuito de esclarecer melhor os mecanismos inflamatórios envolvidos.

Wong e col. demonstraram, em cultura de fibroblastos isolados a partir de culturas de célula de embriões de aves, que a exposição à fumaça de cigarro provocou a inibição da migração de fibroblastos, etapa fundamental no processo cicatricial <sup>78</sup>.

Fibroblastos expostos a doses não letais de nicotina apresentaram diminuição da atividade migratória. Ainda nesse estudo, verificaram aumento da produção de interleucina-8 (IL-8) e de proteínas do tipo quinase, as quais estão envolvidas na sobrevivência celular.

O aumento da sobrevivência dos fibroblastos acarretou o aumento da produção de componentes da matriz pelas mesmas, caracterizando o processo de fibrose. Baseados nesses resultados, os autores sugerem que o aumento da sobrevivência dos fibroblastos e a manutenção da exposição aos fatores agressores promovem um processo de deposição dos componentes da matriz de forma exagerada, resultando em fibrose tecidual.

Rothem e col. <sup>79</sup> pesquisaram o efeito da nicotina em osteoblastos humanos. Eles observaram que a nicotina levou à inibição de 842 genes de osteoblastos via

ligação nicotina – acetilcolina, suprimindo a produção de fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina por esses tipos celulares. Análise de ontologia genética sugeriu o efeito da nicotina em vários processos biológicos e celulares associados a sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose de osteoblastos.

Nakayama e col.<sup>80</sup> evidenciaram que a nicotina suprime a expressão gênica para a produção de sialoproteína óssea, proteína produzida especificamente por osteoblastos maduros na fase inicial de mineralização. Tal achado sugere que a nicotina exerce efeito tóxico direto no tecido ósseo através da modulação da expressão gênica nos osteoblastos. Estudos anteriores de Wetscher e col. e Kalpana e col. apontaram que a nicotina induz aumento do mecanismo de estresse oxidativo tanto "*in vitro*" quanto "*in vivo*"<sup>81,82</sup>.

Crowley-Weber e col.<sup>83</sup> indicaram que a nicotina aumentou o stress oxidativo, ativando fatores de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que induz à apoptose celular, sendo que a via NF- $\kappa$ B já foi identificada como importante na homeostase óssea, particularmente na osteoclastogênese<sup>84,85</sup>.

Outros autores, por meio de estudos experimentais, expuseram o efeito do tabagismo sobre o remodelamento ósseo: perda óssea, redução do comprimento e peso ósseo<sup>86</sup> e da densidade mineral<sup>87</sup> e aumento da osteoclastogênese<sup>88</sup>. Além disso, observaram que fibroblastos obtidos de ligamento periodontal expostos a extrato de fumaça de cigarro aumentaram a produção de colágenos do tipo III e V, o que pode estar associado ao maior índice de perda de dentes em indivíduos fumantes<sup>89</sup>.

Apesar das evidências apresentadas na literatura ressaltando os efeitos deletérios da fumaça do cigarro na consolidação de fratura, pouco se sabe sobre os mecanismos que explicam esse fenômeno. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizem esses processos é de grande valia para a compreensão dos fatores desencadeadores do remodelamento tecidual.

El-Zawawy e col.<sup>90</sup>, em 2006, demonstraram um atraso no processo de consolidação óssea através da imunomarcação para colágeno II no calo cartilaginoso em camundongos submetidos à exposição de fumaça de cigarro em modelo de fratura fechada da tíbia. Os autores observaram que os camundongos expostos ao fumo durante 7 dias apresentaram menor área preenchida por calo ósseo e diminuição de expressão de colágeno II, comparados aos animais-controle; por outro lado, não se notou mudanças no índice de proliferação celular.

Ainda, Skott e col.<sup>91</sup>, em 2006, estudaram, em modelo experimental, ratos submetidos à fratura de fêmur e expostos ao extrato de cigarro e verificaram piora nos testes mecânicos de resistência no local da fratura, quando comparados a outros animais que receberam salina ou somente nicotina. Os efeitos prejudiciais do fumo também estão demonstrados em modelos experimentais de osteotomia mandibular e de regeneração óssea.

Giorgetti e col., em 2010<sup>92</sup>, constataram que a exposição à fumaça de cigarro interfere na expressão gênica e na síntese de proteínas da matriz extracelular, promovendo atraso na consolidação óssea.

Li Ma e col. <sup>93</sup> demonstraram que coelhos submetidos à cirurgia de osteotomia mandibular e que receberam implantes dérmicos de nicotina apresentaram inibição da expressão gênica de TGF $\beta$ 1, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento para fibroblastos.

Novamente Skott e col. perceberam que a nicotina reduz a vascularização no foco de fratura e causa concomitante retardo da consolidação óssea em animais <sup>91</sup>. No processo de reparo do tecido ósseo, os fibroblastos são responsáveis por produzir proteínas de matriz, formando um arcabouço para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Nessa fase, a presença de nicotina no sistema pode inibir esse processo de angiogênese, o qual está associado ao aumento da deposição de fibras de colágeno, com subsequente mineralização e formação do calo ósseo (mole). Em procedimento posterior, ocorre a ossificação desse tecido, com presença de remodelamento de componentes da matriz extracelular óssea, o que leva em média de 3 a 6 meses <sup>4</sup>.

No que diz respeito à consolidação de fratura e à homeostase óssea, já estão amplamente demonstrados os efeitos deletérios do cigarro sobre o processo de reparação da ruptura, promovendo atraso ou até mesmo impedindo que esta ocorra <sup>94,95,96,97</sup>. A consolidação da fratura compreende uma cascata de síntese de proteínas de matriz implicadas no mecanismo de solidificação, envolvendo a liberação de citocinas e de fatores de crescimento. Os radicais orgânicos ativos constituintes do cigarro são prejudiciais a esse processo por apresentarem efeitos

citotóxicos e, conseqüentemente, induzirem a liberação de citocinas pró-inflamatórias <sup>89</sup>.

Wang e col. sugeriram, em estudo experimental com camundongos, o papel regulador do IGF-1 na expressão de RANKL e RANK e na interação normal entre osteoblastos e a indução da osteoclastogênese <sup>98</sup>.

Scheidt-Nave e col. identificaram, em estudo epidemiológico, que os níveis séricos mais elevados de IL-6 estariam amplamente relacionados à maior perda óssea femoral e vertebral. Após diversas análises multivariáveis, concluíram que o nível sérico de IL-6 era o principal fator preditor de perda óssea na primeira década após a menopausa, porém não foi possível elucidar esse fator como de causa-efeito, permanecendo a dúvida se a IL-6 seria um mediador ou um mero marcador do mecanismo <sup>99</sup>. Blanchard e col. sugerem papel regulador da IL-6 na formação óssea, agindo diretamente nos osteoblastos, mas também desempenhando atividade osteoclastogênica em doenças osteolíticas, como tumores e metástases ósseas <sup>100</sup>.

Gerber e col., em estudo experimental, identificaram atividade essencial do VEGF na invasão vascular, no crescimento ósseo e na formação óssea durante o processo de ossificação da matriz condral da placa de crescimento e da consolidação de fraturas. O VEGF seria também um coordenador da apoptose de condrócitos da remodelação da matriz celular, bem como da neoangiogênese <sup>101</sup>.

Zimmerman e col. demonstraram, em estudo clínico prospectivo, que o nível sérico de TGF- $\beta$ 1 durante a fase inicial do tratamento de fraturas seria fator preditivo associado à consolidação ou ao retardo desse processo. Pacientes com níveis

séricos mantidos elevados durante a fase de formação do calo ósseo, a partir de 4 semanas do trauma, apresentaram índices maiores de consolidação em comparação com grupo de pacientes que evoluíram para pseudartrose <sup>102</sup>.

Considerando que os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na consolidação do tecido ósseo após fratura ainda não estão totalmente esclarecidos e que o fumo tem um papel importante no retardo ou até mesmo na não ocorrência da consolidação, achamos de fundamental importância avaliar os efeitos do cigarro em um modelo experimental de fratura de tíbia na tentativa de melhor elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no retardo do reparo ósseo.

**Objetivo**

A nossa proposta neste estudo foi avaliar os efeitos da fumaça de cigarro no processo de consolidação óssea, no que se refere à composição das fibras de colágeno, ao processo de mineralização e sua relação com as citocinas ativadas pelo fumo, em modelo experimental de fratura de tíbia.

Para isso, abordamos os seguintes aspectos:

- A. A influência da fumaça de cigarro nas variáveis de formação da matriz mineral óssea
- B. O efeito da fumaça de cigarro na matriz fibrilar óssea
- C. A ação da fumaça de cigarro na expressão citocinas e fatores de crescimento do tecido ósseo

## **Material e Métodos**

### **Grupos experimentais**

Este trabalho foi desenvolvido após aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais, **CEP-FMUSP-022/14**, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para o desenvolvimento do nosso estudo, foram utilizados n= 104 camundongos machos da linhagem C57BL6, de 6-8 semanas, com peso médio de 25 gramas, obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para a realização dos experimentos, os animais foram mantidos com ciclo de 12h claro/12h escuro, à temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , recebendo água e ração padronizada *ad libitum*. Os animais foram acondicionados em gaiolas específicas para camundongos (aproximadamente 8 animais/gaiola) no Biotério do LIM-20 (Laboratório de Terapêutica Experimental I) da FMUSP. Todas as atividades deste projeto foram realizadas nas dependências do LIM-20 e LIM-17, que possuem todos os recursos e a infraestrutura necessários para a realização deste estudo. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

**-Grupo Controle (C):** animais expostos ao ar (n = 29).

**-Grupo Fratura (F):** animais expostos ao ar ambiente e submetidos à osteotomia da tíbia direita quinze dias antes da eutanásia (n = 23).

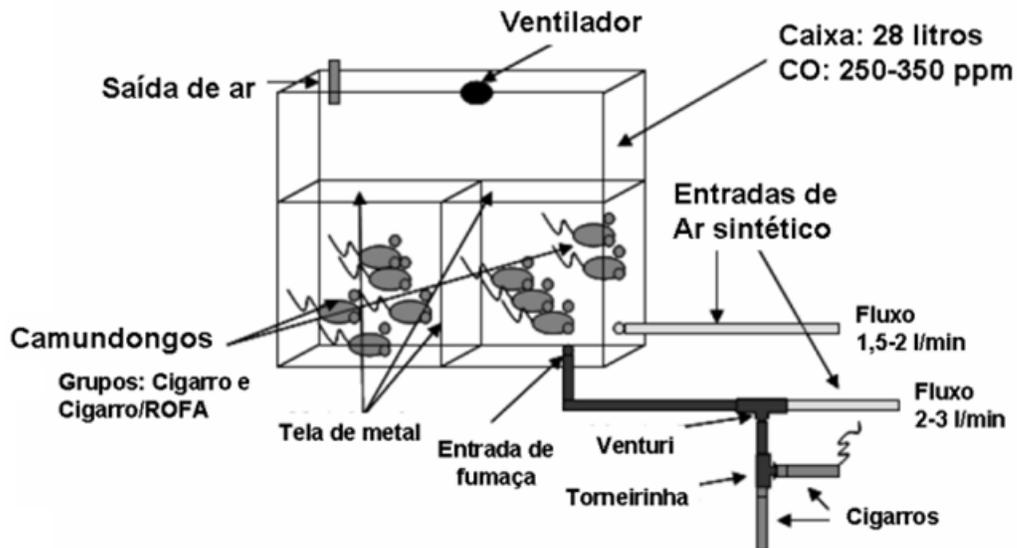
**-Grupo Fumo (CS):** animais expostos à fumaça do cigarro durante 45 dias (n = 29).

**-Grupo Fumo Fratura (FCS):** animais expostos à fumaça do cigarro por 45 dias e submetidos à osteotomia da tíbia direita quinze dias antes da eutanásia (n = 23).

### ***Modelo de exposição à fumaça de cigarro***

Os animais foram expostos à fumaça de cigarro por 30 min/ dia, 5 vezes/ semana, por 45 dias. A exposição foi realizada em uma câmara inalatória (**Figura 8**), sendo esta uma caixa plástica de 28 litros (aproximadamente 40x27 cm na base, com altura de 26cm) com duas entradas de ar: uma para ar sintético e outra para entrada da fumaça de cigarro, havendo na parte superior dessa caixa um pequeno ventilador para homogeneização do ar <sup>103</sup>.

O fluxo de ar no interior do compartimento é controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido e será mantido em 2 L/min. A segunda entrada de ar recebe uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, aspirada por um sistema de Venturi conectado ao cigarro aceso. O fluxo laminar de ar sintético passa por uma região de menor diâmetro, dessa forma, há uma aceleração do fluxo e consequente redução da pressão nesse ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro. A redução na pressão ocorrida no ponto de diminuição do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar, sendo este mantido constante. Esse sistema cria uma concentração de monóxido de carbono, variando 250 a 350 ppm (*ToxiPro, Biosystems, USA (95)*).

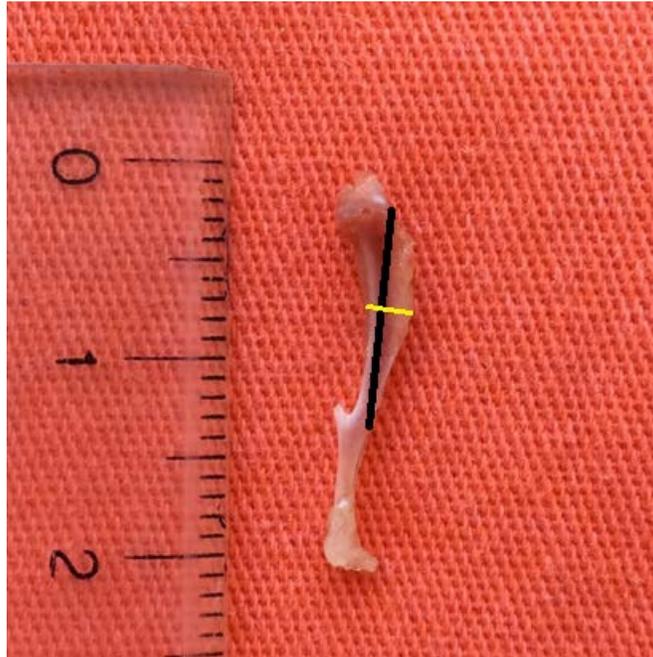


**Figura 8.** Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro. Exposição realizada 30 minutos por dia, 5 dias por semana, por 45 dias. (adaptado de Biselli, 2011)

### **Indução da fratura tibial**

Cada animal foi previamente anestesiado com xylazina (10mg/Kg) e quetamina (100 mg/kg) via intramuscular. A associação entre quetamina e xilazina promove analgesia e tempo médio de anestesia cirúrgica de 80 minutos e total de 110 minutos. Graças a essas características, aliadas ao baixo custo e à fácil administração, essa combinação vem sendo utilizada de forma rotineira na prática médico-veterinária. Foi administrado 0,1 ml para cada 10 gramas de peso vivo, ou seja, para um camundongo de 25 gramas, aplicamos 0,25 ml da solução [90].

O procedimento cirúrgico, após tricotomia local e preparo antisséptico, foi realizado por uma incisão na face anteromedial do terço proximal da perna e dissecação até plano ósseo com exposição da metáfise proximal da tíbia.



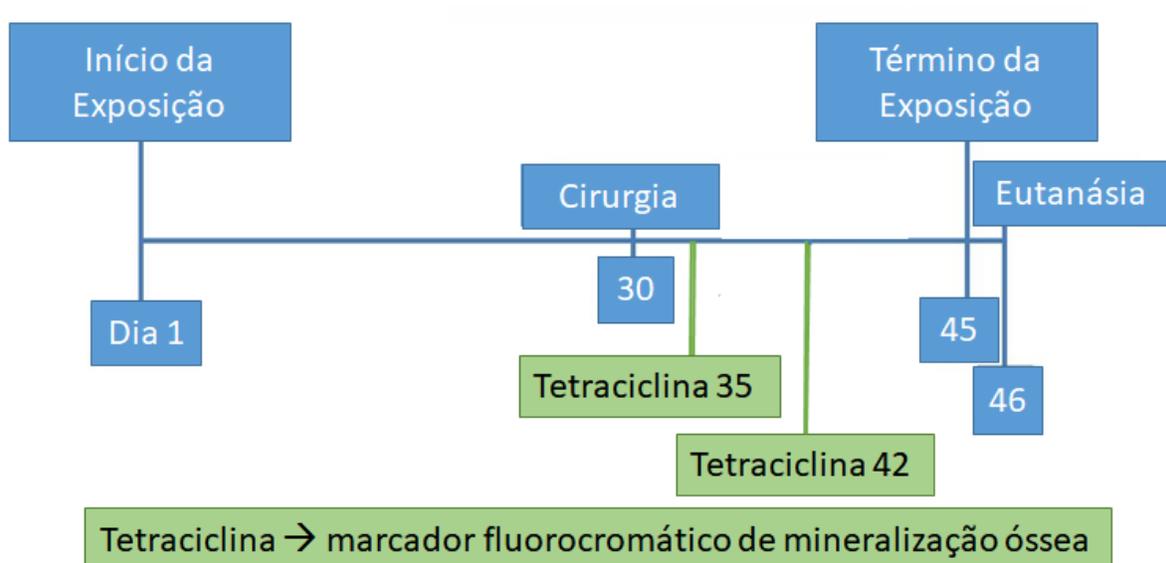
**Figura 9.** Esquema demonstrando o local da osteotomia (linha amarela) e a posição da haste intramedular (linha preta) na tíbia extraída de camundongo.

Através de perfuração da tuberosidade anterior da tíbia, acessamos o canal medular para passagem de um “insect pin” de 0,04 mm, para estabilização intramedular da tíbia. Distanto 7 mm da tuberosidade anterior da tíbia, uma osteotomia completa e transversa foi realizada com auxílio de osteótomo delicado, avançando o pino intramedular 10 mm distal ao foco de fratura, obtendo estabilização do sistema (**Figura 9**). O pino cortado a 2 mm do orifício de entrada permitirá futura retirada não traumática. A incisão foi fechada com 2 pontos separados de Mononylon 5.0.

Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os camundongos foram

colocados isoladamente em suas gaiolas para recuperação anestésica. Preparado, esse local deve ser silencioso e com pouca luz, evitando-se estressar os animais com o mínimo de manipulação. Como a temperatura ambiente do Biotério é de 21°C, os animais são mantidos aquecidos de 27°C a 30°C até a recuperação da anestesia.

Os camundongos receberam, durante dois dias, dose subcutânea de Tramadol 5 mg/kg por dia, a cada 12 horas. Os camundongos também receberam Novalgina e Diclofenaco diluídos na água oferecida “*ad libitum*”



**Figura 10.** Linha do tempo do experimento, identificando as datas de exposição, procedimento cirúrgico e doses de tetraciclina como marcador de mineralização.

### **A. Avaliação da Matriz Mineral Óssea**

Para estudar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no metabolismo ósseo, os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais. Grupo Controle (C), composto por animais expostos ao ar ambiente, recebendo uma dose intraperitoneal de oxitetraciclina (20mg/kg) nos dias 35 e 42

durante o tempo de exposição do protocolo. Grupo Fumo (CS), formado por animais expostos à fumaça de cigarro por 45 dias, 30 min/dia, 5 dias por semana, recebendo uma dose intraperitoneal de oxytetraciclina (20mg/kg) nos dias 35 e 42 durante o tempo de exposição do protocolo (**Figura 10**).

### ***Histomorfometria***

Todas as medidas dos parâmetros histomorfométricos foram realizadas aleatoriamente na região metafisária, 5 mm distais à placa de crescimento e 1 mm do córtex lateral, excluindo o osso cortical. A área selecionada é chamada de esponjosa secundária, rica em osso trabecular. Todos os parâmetros foram medidos de acordo com o Comitê de Histomorfometria da Sociedade Americana de Pesquisa Mineral Óssea <sup>104</sup>.

As tíbias direitas foram cirurgicamente extraídas e preparadas livres de tecidos moles, imersas em etanol a 70% e processadas como descrito anteriormente. Usando o equipamento Polycut S, dotado de uma faca de carboneto de tungstênio (Leica, Heidelberg, Alemanha), as tíbias proximais não descalcificadas foram cortadas em seções de 5 µm e 10 µm de espessura e coradas com azul, 0,1% de toluidina, pH 6,4, com montagem H Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e pelo menos duas seções não consecutivas foram examinadas para cada amostra. Parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos da formação óssea e da reabsorção foram medidos nas metafises proximais em um total de 30 campos, usando um analisador semiautomático de imagem e o software OsteoMeasure (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, EUA), específico para Histomorfometria óssea. Os índices estáticos e estruturais histomorfométricos incluíam a relação do volume do

osso trabecular e volume ósseo total (BV/TV) e a espessura osteoide (O.Th). A porcentagem da superfície trabecular total foi usada para expressar áreas de superfície de erosão (ES/BS) e superfície osteoide (OS/BS). Foi também determinada a superfície osteoblástica (Ob.S/BS) e a superfície osteoclástica (Oc.S/BS) por área de tecido, a separação entre as trabéculas (Tb.Sp), o número de trabéculas (Tb.N) e a espessura trabecular (Tb.Th), derivados da relação entre a superfície e o volume do osso. Além disso, a taxa de aposição mineral de (MAR) foi estabelecida calculando a distância entre as marcações teciduais pela oxitetraciclina dividida pelo intervalo de tempo entre as administrações das doses de oxitetraciclina. A superfície da mineralização (MS/BS), que é a taxa de superfície esponjosa com matriz mineralizada, foi calculada como a superfície de dupla marcação somada à metade da superfície da marcação única. Tempo de retardo de mineralização (MLT) é o intervalo de tempo médio entre a deposição da matriz e a mineralização de qualquer volume de matriz, como visto com a marcação por oxitetraciclina. Taxa de formação óssea (BFR/BS) é o volume de osso mineralizado formado por unidade de tempo, calculado como o produto da taxa de aposição matricial e a superfície de mineralização. Todos os dados foram obtidos de forma cega. Os índices histomorfométricos foram relatados usando a nomenclatura descrita por Parfitt et al. e recomendada pela Sociedade Americana para Pesquisa Óssea e Mineral <sup>104</sup>.

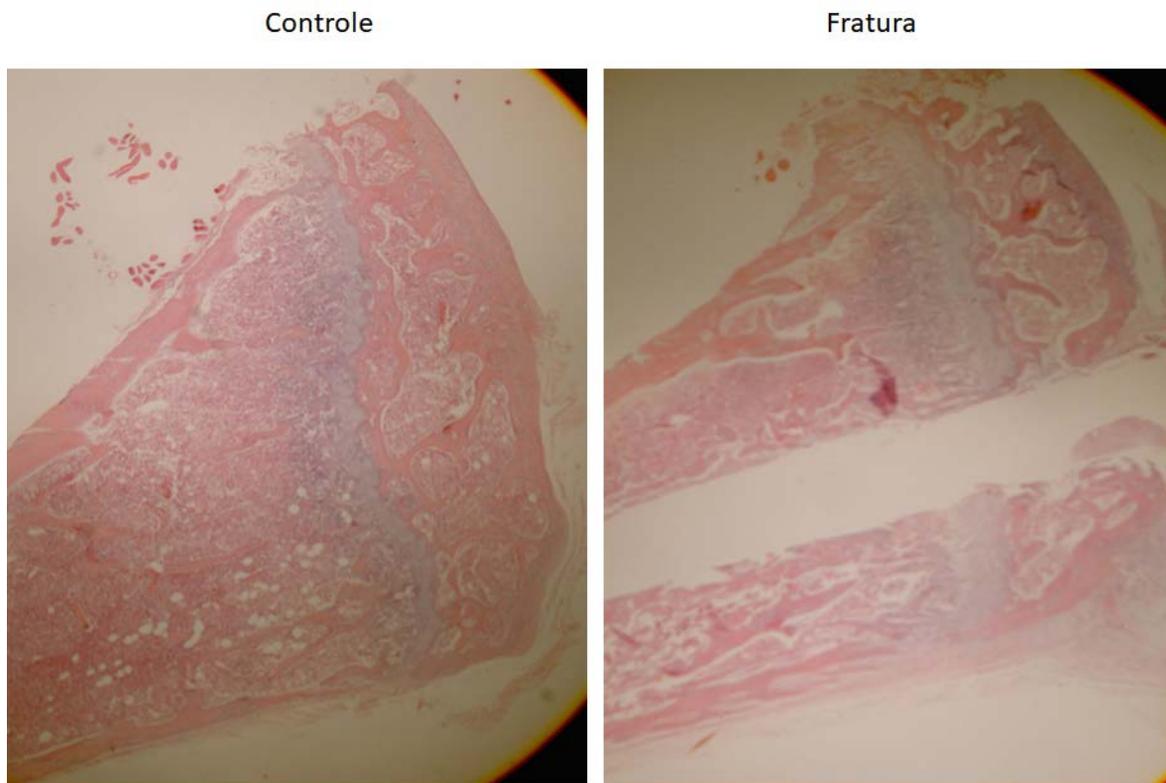
Histomorfometria	Sociedade Americana para Pesquisa
Parâmetros estruturais	Óssea e Mineral
Volume Trabecular (BV/TV,%)	Número de Trabéculas (TB.N/mm)
Separação das Trabéculas (Tb.Sp.mm)	Espessura do Osteoide (O.Th.mm)
Superfície de Osteoide (OS/BS,%)	Superfície Osteoblástica (Ob.S/BS,%)
Superfície de Mineralização (MS/BS,%)	Índice Formação Óssea (MAR.mm/dia)
Superfície de Reabsorção (ES/BS,%)	Superfície Osteoclástica (Oc.S/BS,%)

## **B. Avaliação da matriz fibrilar óssea**

### ***Morfologia do osso***

Para a coleta do tecido ósseo, os animais foram eutanasiados por exsanguinação da veia cava inferior após indução anestésica por injeção intraperitoneal de Tiopental (50 mg/Kg) (**Figuras 9 e 11**). O tecido ósseo coletado foi fixado em formol 10% tamponado por 24 horas, descalcificado com solução de ácido nítrico 7% por 3 dias, lavado em água corrente por 20 minutos, banhado em água destilada e finalmente imerso em formol 10% tamponado. Após esse período, as amostras de osso foram imersas em álcool 70% por dois dias e incluídos em parafina. Foram realizados cortes com 4-5 µm de espessura, com um espaço de 50 µm entre eles, para utilização nas técnicas de coloração histológica e de imunofluorescência. Posteriormente, as amostras foram coradas pelo Sirius red

0,2% em solução saturada de ácido pícrico (Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI) com a finalidade de avaliar a composição de colágeno tecidual com auxílio de microscópio óptico e luz polarizada.



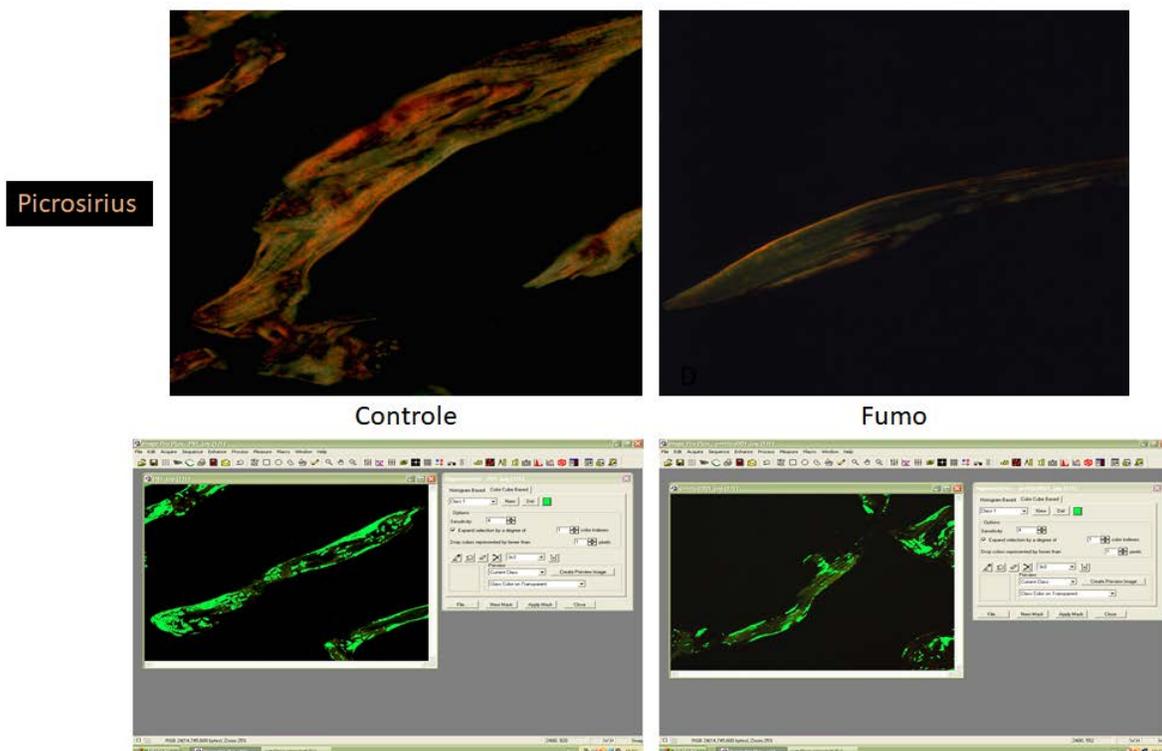
10 x

**Figura 11.** Imagem representativa do tecido ósseo de camundongo em pequeno aumento corado por HE, demonstrando a metáfise proximal da tíbia dos casos controle e fratura. Notar o defeito ósseo criado pela passagem da haste intramedular.

### **Avaliação do colágeno por análise de imagem**

As lâminas coradas pelo Picrosirius foram analisadas em microscópio óptico equipado com um polarizador de luz acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consiste em uma câmera CCD Sony acoplada a um microscópio

Olympus, a partir do qual as imagens poderão ser visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium3 300Mhz), as imagens são processadas por um *software Image ProPlus 6.0*, sendo selecionados aleatoriamente 5 a 8 campos do tecido ósseo em aumento de 400 vezes. O colágeno presente nos campos adquiridos foi avaliado por meio da seleção de tonalidades birrefringentes vermelho-alaranjadas ou verde-amareladas, correspondentes às fibras de colágeno. A área das fibras de colágeno foi dividida pela área total da trabécula, obtendo-se resultado final expresso em porcentagem (Figura 12).

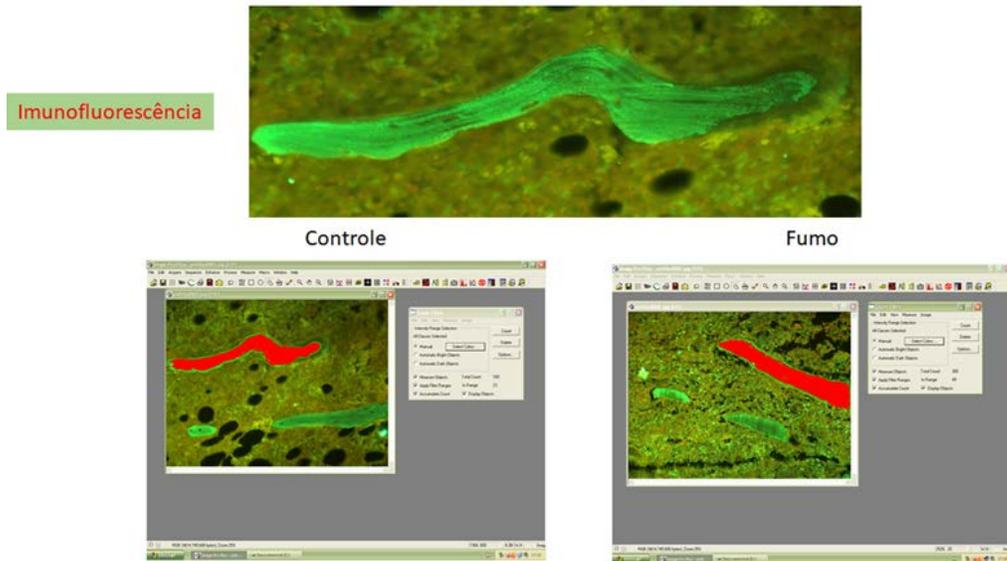


**Figura 12.** Imagens representativas da análise na coloração de Picrosirius visualizada por luz polarizada para aferição do colágeno total trabecular, bem como da aplicação de máscara por tonalidade. Método utilizado para medição da área proporcional de colágeno total na trabécula óssea. *Software Image Pro Plus*

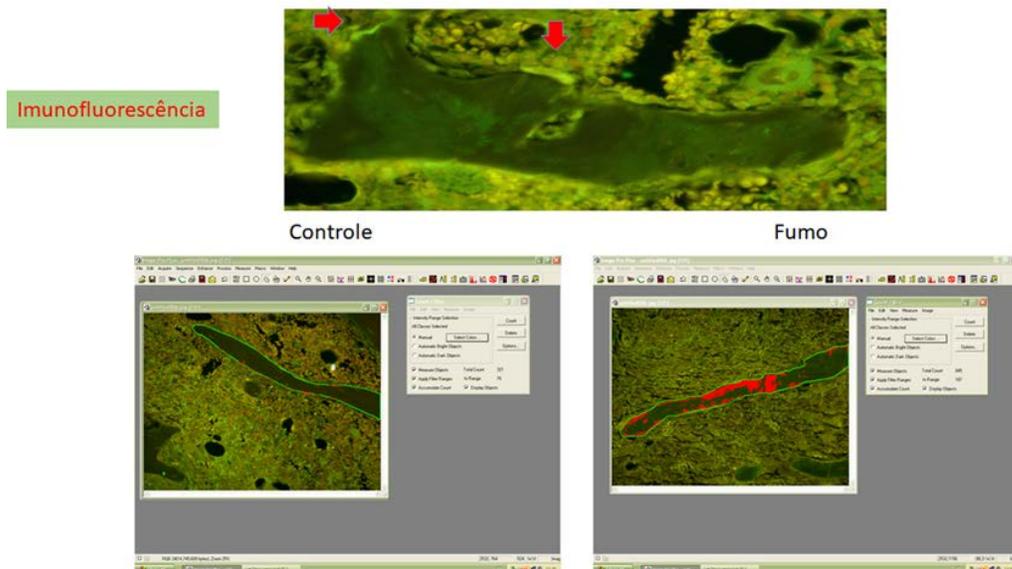
### ***Imunofluorescência para colágenos I e V no tecido ósseo***

Para a imunofluorescência do colágeno dos tipos I e V, os cortes de 4-5µm de espessura do tecido ósseo dos animais foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes através da imersão das lâminas em xilol aquecido a 60°C, por 30 minutos, e por dois banhos de 10 minutos em xilol à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguidas de lavagem em água corrente, por 10 minutos, de um banho em água destilada e de 15 minutos em PBS, pH 7,4. Para a exposição e a recuperação de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão com pepsina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 10000 UTI/ml) na concentração de 8mg/ml em ácido acético 0,5N, por 30 minutos, a 37°C. Ao término dessa incubação, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS, por três vezes de 10 minutos, e os sítios inespecíficos, bloqueados com albumina bovina sérica (BSA) a 5% em PBS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos policlonais de coelho anticolágeno do tipo I (Rockland InImunochemicals, Gilbertsville, PA) (1:50) e anticolágeno do tipo V (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA (1:30), diluídos em solução de PBS. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS, com Tween20 0,05%, e incubados por 90 minutos com os anticorpos de cabra anti-IgG e de coelho ALEXA 488 (Invitrogen, Life Technologies), diluídos 1:200 em solução de PBS. Por fim, as lâminas foram novamente lavadas, por cinco vezes, com PBS com Tween20 0,05%,

montadas com solução de glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan) (**Figuras 13 e 14**).



**Figura 13.** Imagem representativa da Imunofluorescência para Col I na trabécula óssea, analisada com Software Image Pro Plus 6.0.



**Figura 14.** Imagem representativa da Imunofluorescência para Col V na trabécula óssea no Software Image Pro Plus 6.0.

***Avaliação da expressão de genes: COL1A1, COL1A2 e COL5A1, COL5A2******Reação de transcrição reversa com amplificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)******Extração de RNA***

O RNA total foi extraído do tecido ósseo das tíbias dos grupos C, FC, CS e FCS. Cerca de 5 mg de tecido ósseo foi congelado e pulverizado com *Biopulverizer* (Bio-Pulverizer BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA), pelo método de Chomezynski e Sacchi, 2006 [105], utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Co, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a separação do RNA, as amostras do tecido imerso no TRIZOL foram incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente; em seguida, após adição de 200µl de clorofórmio, elas foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos, e submetidas à centrifugação (12.000 rpm) por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um tubo novo. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500µl de álcool isopropílico às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão e mantidas no freezer a -20°C, por um período de 12 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm) por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA diluído em 1ml de etanol (85%) e submetido a nova centrifugação (5 minutos/2.500 rpm/ 4°C). Por fim, o RNA foi dissolvido em 20µl de H<sub>2</sub>O deionizada, tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC; Merck, Alemanha), que constitui um forte inibidor de ribonuclease. A avaliação da concentração e do grau de pureza das amostras de RNA foi feita em espectrofotômetro (Nano Vueplus; GE) a partir de 2µl das amostras de RNA,

dissolvidas em H<sub>2</sub>O DEPEC. Para a obtenção de RNA com alto grau de pureza, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm foi de 1,7 e 2,0.

### ***Reação em cadeia da polimerização em tempo real (qRT-PCR)***

Para a reação de qRT-PCR, foram selecionados 9 genes de interesse, específicos para camundongos. As sequências dos genes foram adquiridas pelo site [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). Para a montagem do mapa gênico da sequência escolhida, foi utilizado o software localizado no endereço eletrônico [www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgbeat](http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgbeat). A expressão dos genes foi avaliada por PCR, em tempo real, utilizando-se o equipamento Step One (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA), com o kit Super Script III Platinum SYBR® Green One-Step qRT-PCR (11736051-Life Technologies). Cada reação foi realizada com 15µl, contendo 1,45 µl de água deionizada estéril; 7,5 µl da mistura de reação 2XSYBER® Green; 0,3 µl de cada *primer*, a 10nM; 0,3 µl de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; 0,15 µl de ROX Reference Dye e 5 µl de RNA total, a 20ng/ml. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A análise da expressão gênica foi realizada pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT, usando-se o gene da GAPDH como controle interno.

As reações de qRT-PCR foram padronizadas com o intuito de encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo. Dessa forma, um único pico de fluorescência foi detectado para cada gene. Os tamanhos dos fragmentos gerados pelo qRT-PCR foram validados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo. As condições de ciclagem para todos os genes

foram as seguintes: 50°C, por 10 minutos (para síntese de cDNA), seguido de 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, 60°C, por 30 segundos, e 72°C, por 30 segundos. Foi realizada curva de *melting* (fusão) para cada gene para verificação e certificação de um único pico de fluorescência para cada amostra analisada.

### **C. Citocinas e avaliação da expressão de fatores de crescimento**

Os níveis de interleucina-6 (IL-6) (Biolegend, CA, EUA; RUO 430506); Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (R & D Systems, CA, EUA; DY791); Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Biolegend, CA, EUA; RUO 430906); Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (R & D Systems, CA, EUA; DY493); Interleucina-1 Beta (IL-1  $\beta$ ) (Biolegend, CA, EUA; RUO 432603); e transformar o fator de crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) (Biolegend, CA, EUA; RUO 432907) foram medidos no osso homogenado usando o kit de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (**Figura 15**).



## Metodologia Técnica de ELISA n=6



- Análise por ELISA das Citocinas no homogenato ósseo da tíbia
- VEGF R&D Systems, CA, USA; DY493
- TGF $\beta$  Biolegend, CA, USA RUO 432907
- IL-1 Biolegend, CA, USA; RUO 432603
- IL-6 Biolegend, CA, USA; RUO 430506
- IGF R&D Systems, CA, USA; DY791
- TNF $\alpha$  Biolegend, CA, USA; RUO 430906

**Figura 15.** ELISA do homogenato ósseo a partir do uso de kits específicos para cada citocina, conforme orientação do fabricante.

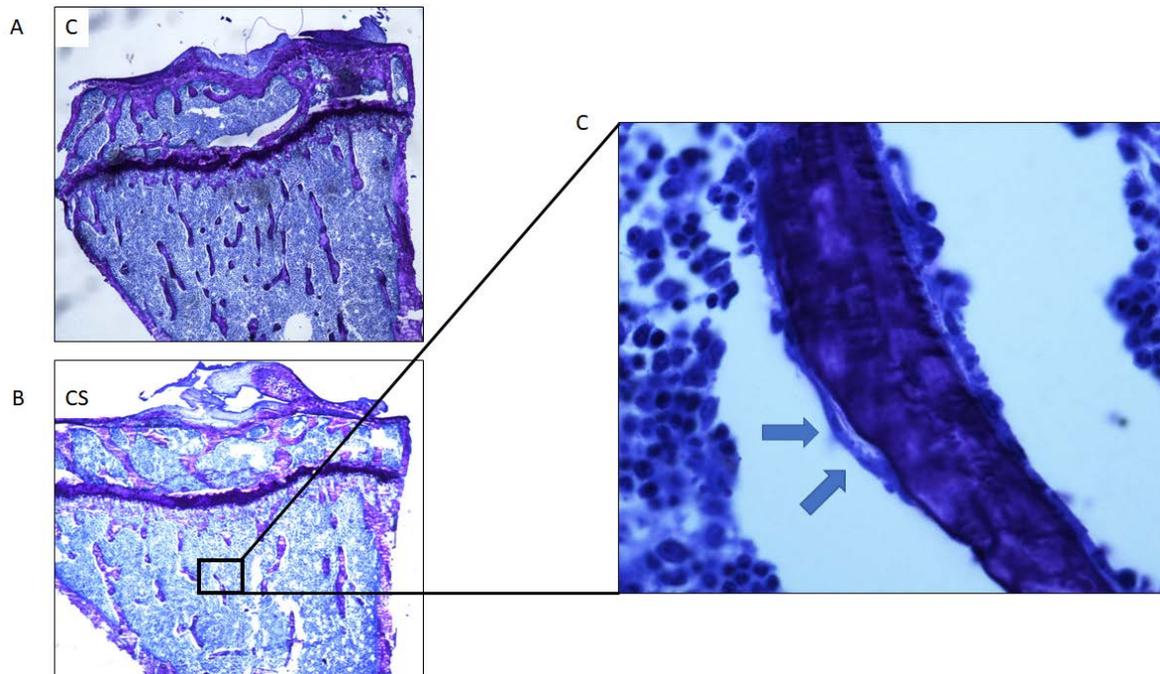
### Análise estatística

Todos os dados foram expressos como médias e erro padrão (SE). A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SigmaStat (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EUA). Para o exame da matriz mineralizada empregamos o *Teste t de Student* ou *Teste de Mann-Whitney* e para o da matriz fibrilar, a Análise de Variância para Dois Fatores (ANOVA), seguido por procedimentos de comparação (método de Holm-Sidak). A análise estatística da expressão gênica foi feita com Software GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software In. CA, USA), usando-se Análise de Variância para Dois Fatores (ANOVA), com Método de Holm-Sidak como pós-teste. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## **Resultados**

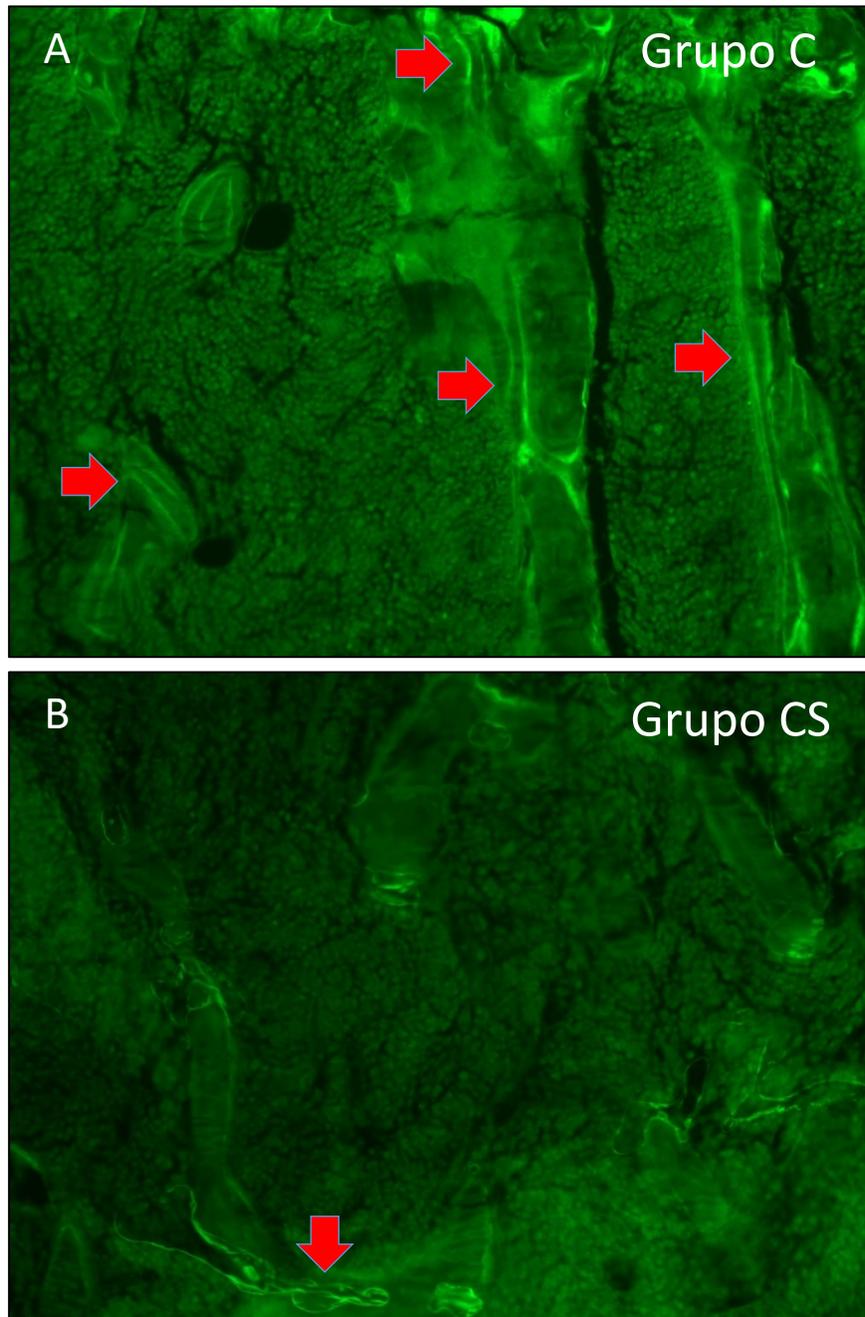
**A. Influência da fumaça de cigarro nas variáveis de formação da matriz mineral óssea**

Na **Figura 16 (Painel A)**, observamos, através da coloração do azul de toluidina, no grupo C, a matriz mineral do osso obedecendo a um padrão homogêneo, caracterizado pela intensa impregnação do corante e pelas trabéculas ósseas dispostas de maneira uniforme em todo o osso dos animais do grupo C. Em contraste, na **Figura 16 (Painel B)**, identificamos que, após a exposição à fumaça de cigarro (grupo CS), os animais do grupo CS apresentaram intensa diminuição da coloração para o azul de toluidina na matriz óssea, assim como diminuição na quantidade de trabéculas, quando comparados aos do grupo C. Em maior aumento, identificamos a presença de osteoclastos na lacuna de *Howship*. **Figura 16 (Painel C)**



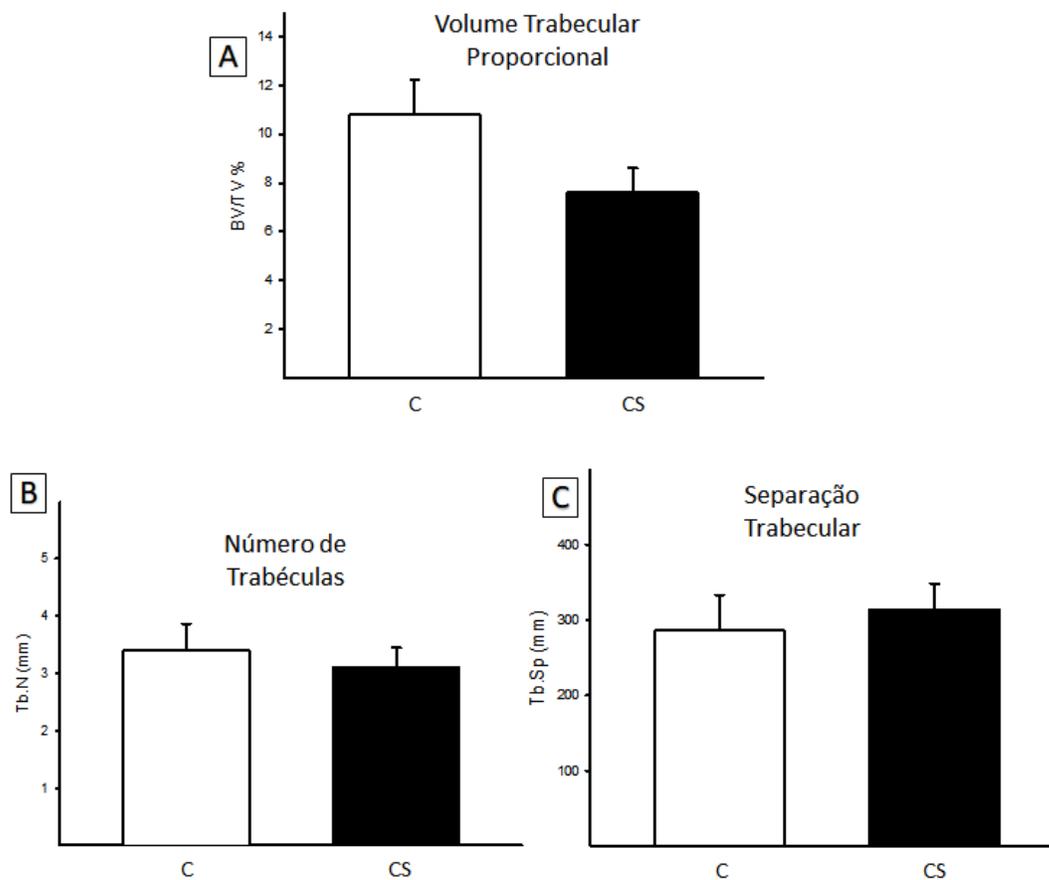
**Figura 16.** (Painéis A-C): Cortes histológicos de tecido ósseo calcificado, corados com Azul de Toluidina. Nos Painéis A e B, identificamos aumento do espaço entre as trabéculas ósseas no grupo CS (Painel B), quando comparado ao grupo C (Painel A). No painel C, no grupo CS, observamos um afinamento das trabéculas, quando comparadas às do grupo controle. Notar, no Painel C, a presença de osteoclastos na lacuna de Howship, no grupo CS.

Na **Figura 17 (Painéis A-B)**, percebemos, por meio da marcação com tetraciclina, intensa fluorescência na forma de linhas verdes duplas nos grupos C e CS. Na **Figura 17 (Painel A)**, notamos que o espaço entre as linhas de formação é maior do que o observado no grupo CS, indicando alterações na formação de tecido ósseo (**Figura 17, Painel B**).



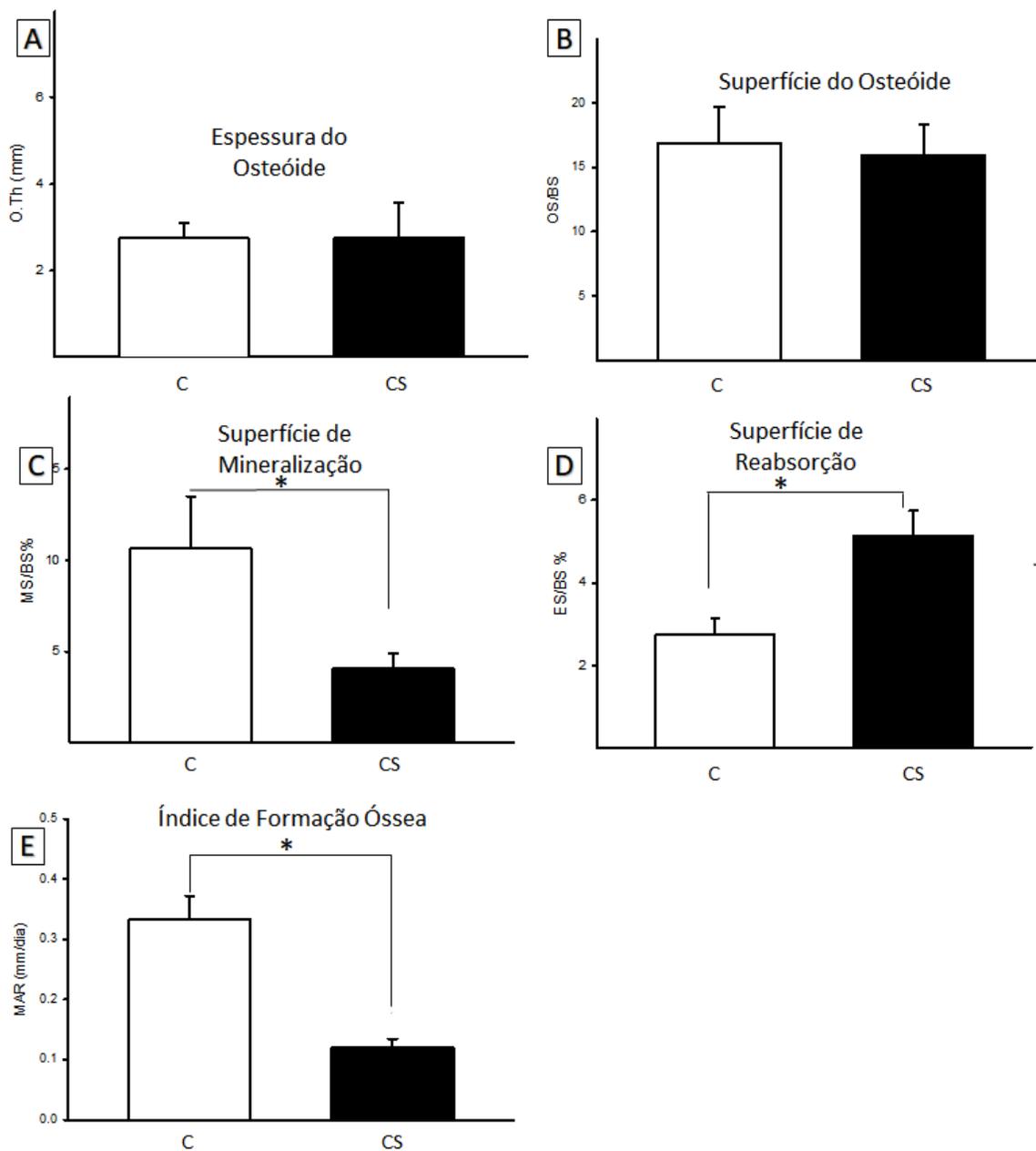
**Figura 17.** (Painéis A e B): Corte histológico representativo de tecido ósseo calcificado, marcado com tetraciclina, identificando as linhas de aposição óssea. No Painel A, observamos um espaço entre as trabéculas ósseas nos animais do grupo C, quando comparados aos do grupo CS (Painel B). Notar, em B, a redução do espaço entre as linhas de aposição óssea. Aumento de 250 vezes.

Na **Figura 18 (Painéis A-C)**, visualizamos a relação entre as variáveis estruturais por histomorfometria. O volume trabecular foi menor nos animais CS, em relação ao volume ósseo total; no entanto, devido à grande variabilidade, não obtivemos significância estatística (BV/TV: 7,59 x 10,81;  $p = 0.093$ ).



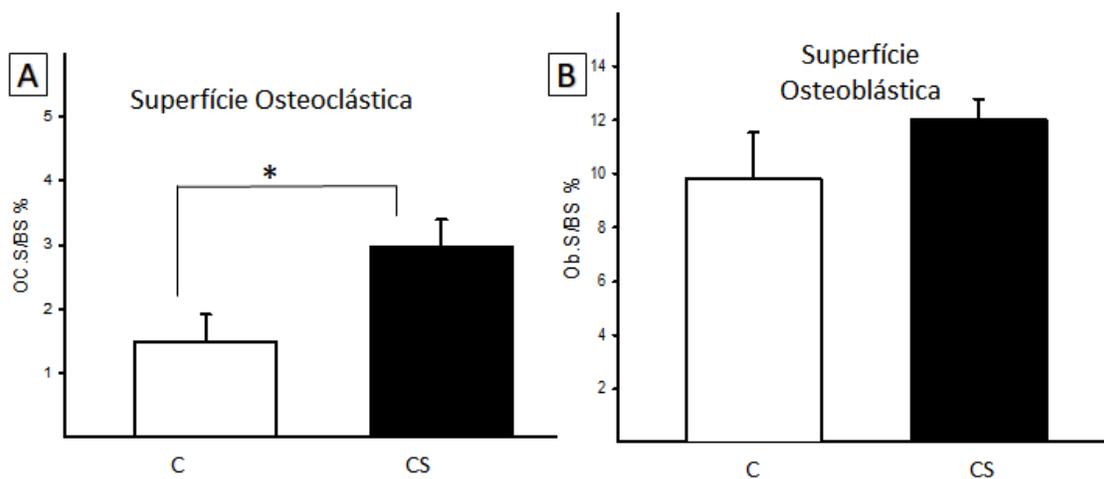
**Figura 18.** (Painéis A-C): Representação Gráfica da relação entre as variáveis estruturais nos grupos C e CS. Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Todos os valores foram quantificados em 30 campos aleatórios, não coincidentes no tecido ósseo. Os grupos foram comparados usando-se teste T-Student.

Por outro lado, na **Figura 19 (Painéis A-E)**, a análise histomorfométrica das variáveis de formação revelou que a exposição à fumaça de cigarro causou redução na espessura de trabéculas ósseas, com valores significativos do ponto de vista estatístico (TbTh: 23,62 x 30,04;  $p = 0,030$ ). O prejuízo da mineralização óssea nesses animais foi caracterizado pela diminuição da superfície de mineralização (MS/BS: 4,06 x 10,67;  $p = 0,052$ ), pela taxa de aposição mineral (MAR: 0,33 x 0,12;  $p = 0,0004$ ), refletindo em menor taxa de formação óssea (BFR/BS: 0,035 x 0,005;  $p = 0,004$ ) e, conseqüentemente, pelo prolongamento do tempo para mineralização (MIT: 85,80 x 14,52;  $p < 0,020$ ).



**Figura 19.** (Painéis A-E): Representação Gráfica da relação entre as variáveis de formação óssea (espessura e superfície do osteóide; superfície de mineralização e reabsorção) nos grupos C e CS. Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Todos os valores foram quantificados em 30 campos aleatórios, não coincidentes no tecido ósseo. Observamos, no Painel C, diminuição significativa da Superfície de Mineralização, MS/BS% (\* $p < 0,05$ ), e no Painel E, do Índice de Formação Óssea, MAR (\* $p = 0,0004$ ). No painel D, identificamos aumento da Superfície de Reabsorção, ES/BS% (\* $p = 0,0114$ ). Os grupos foram comparados usando-se - teste T-Student para OS/BS, MS/BS%, ES/BS% e MAR e Teste de Mann-Whitney para O.Th.

No que se refere à análise da superfície de reabsorção (ES/BS: 5,15 x 2,74;  $p = 0.011$ ) e da superfície osteoclástica (Oc. S/BS: 2,98 x 1.50;  $p = 0.036$ ), constatamos que foram maiores no grupo CS, evidenciando o aumento da ação osteoclástica e do remodelamento ósseo **Figura 20 (Painéis A e B)**.



**Figura 20.** (Painéis A-B): Representação Gráfica da análise da superfície de células de formação e de reabsorção óssea (superfície osteoblástica e osteoclástica) nos grupos C e CS. Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Em A, observamos aumento significativo da Superfície Osteoclástica, Oc.S/BS% ( $*p=0,0361$ ). Todos os valores foram quantificados em 30 campos aleatórios, não coincidentes no tecido ósseo. Teste estatístico utilizado: teste T-Student para Ob.S/BS e Mann-Whitney para Oc.S/BS.

Assim sendo, na Tabela 1, resumimos os resultados da análise das variáveis de formação da matriz mineral óssea nos grupos estudados.

**Tabela 1:** Parâmetros histomorfométricos de mineralização dos grupos C e CS

PARAMETROS HISTOMORFOMÉTICOS	C		CS
VOLUME TRABECULAR	10,81 ± 1.43	↓	7,59 ± 1.02
SEPARAÇÃO ENTRE AS TRABÉCULAS	285,89 ± 47.44	↑	314.14 ± 33.88
SUPERFÍCIE DE MINERALIZAÇÃO	10.67 ± 2.83	↓	4.06 ± 0.82 *
SUPERFÍCIE DE REABSORÇÃO	2.74 ± 0.41	↑	5.15 ± 0.60 *
ÍNDICE DE FORMAÇÃO ÓSSEA	0.33 ± 0.04	↓	0.12 ± 0.02 *
SUPERFÍCIE OSTEOCLÁSTICA	1.50 ± 0.42	↑	2.98 ± 0.42 *

Adicionalmente, a avaliação da histomorfometria das variáveis nos grupos FC e FCS não pôde ser analisada, pois a passagem da haste intramedular na tibia interferiu na leitura semiautomatizada do software usado para essas observações.

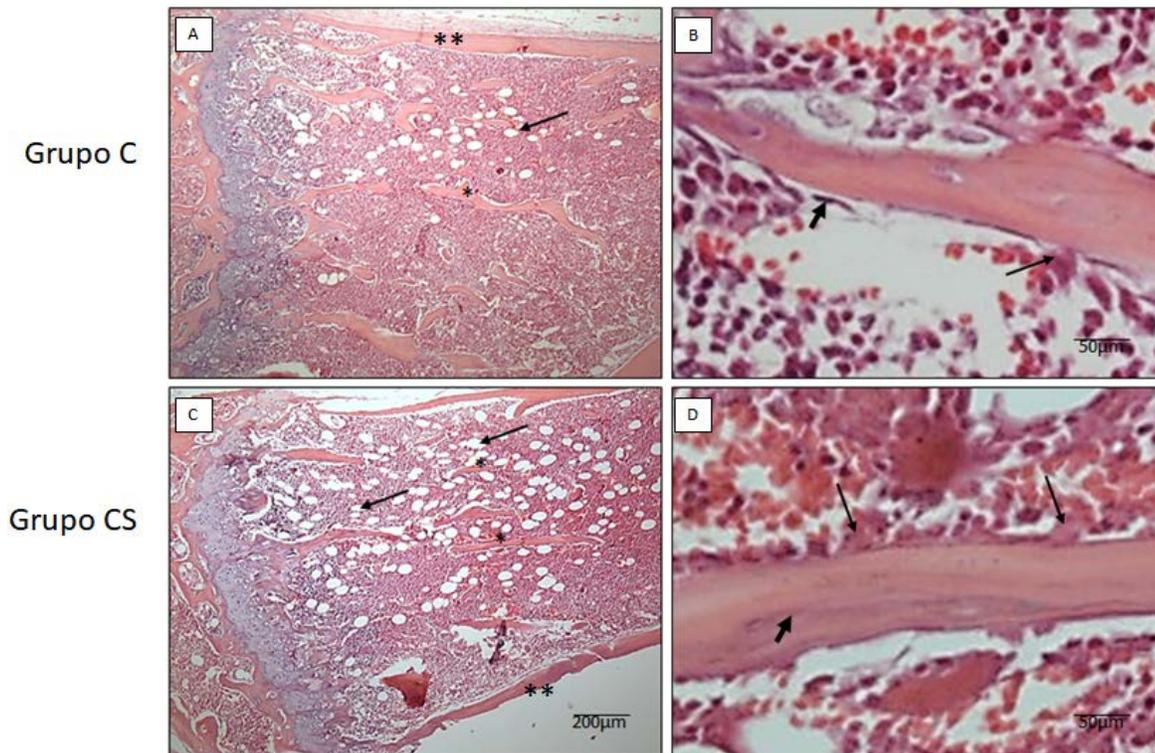
## **B. Efeito da fumaça de cigarro na matriz fibrilar óssea**

### **B.1. Análise da histoarquitetura do tecido ósseo**

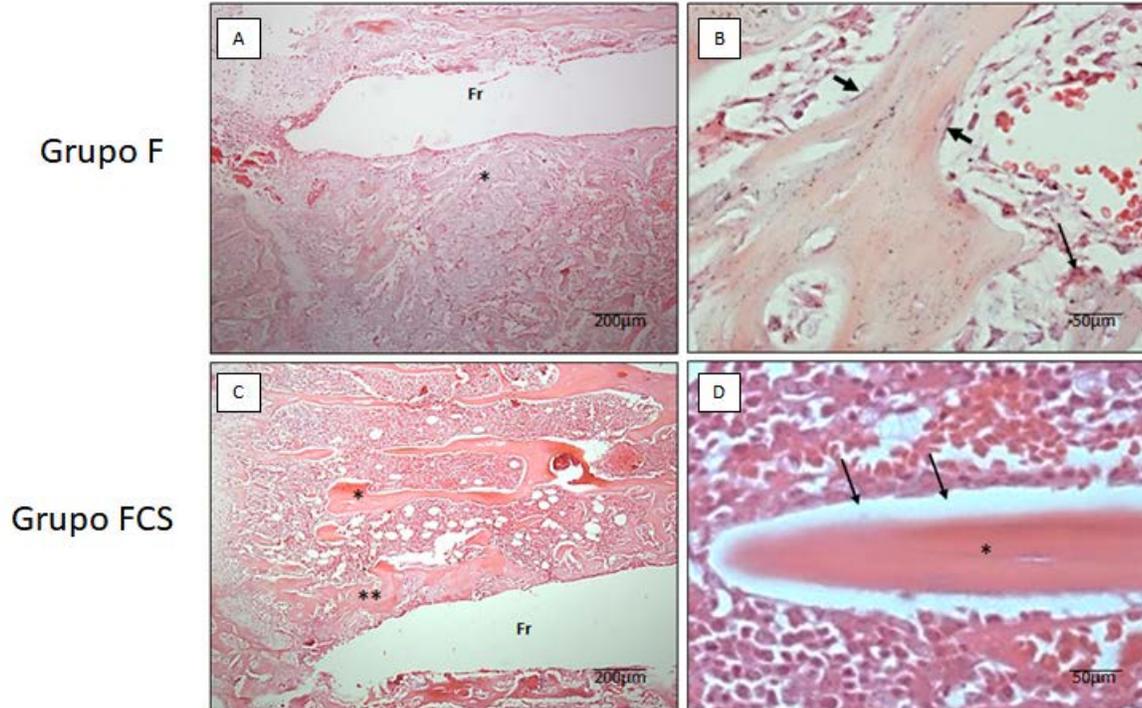
Na **Figura 21A**, notamos no grupo **C**, em menor aumento, o osso compacto de aspecto homogêneo, disposto em forma de uma massa sólida, delineando o córtex externo do tecido. Por outro lado, encontramos uma rede de trabéculas ósseas projetando-se para a cavidade do canal medular, delimitando os espaços ocupados pela medula óssea vermelha altamente celularizada.

Na **Figura 21B**, em maior aumento, identificamos osteoblastos basófilos dispostos na superfície da trabécula óssea; em outra superfície, osteoclastos nas lacunas de *Howship*, obedecendo a um padrão celular uniforme no grupo **C**.

Em contraste, na **Figura 21C**, verificamos, em menor aumento, o osso compacto, também de aspecto normal, disposto na forma de uma massa sólida e basófila, delimitando o córtex externo da tíbia; um padrão heterogêneo da rede trabecular, apresentando trabéculas interrompidas e afiladas no grupo **CS**, quando comparamos ao grupo **C**, **Figura 21 A**. Ainda, na **Figura 21 D**, em maior aumento, notamos aumento de osteoblastos basófilos dispostos na superfície da trabécula óssea e aumento da população osteoclástica nas lacunas de *Howship* no grupo **CS**, quando comparamos ao grupo **C**, **Figura 21 B**. Adicionalmente, na **Figura 21 D**, observamos desorganização das lamelas colágenas no grupo **CS** em relação ao grupo **C**, **Figura 21B**.



**Figura 21.** (Painéis A-D): Corte histológico de tecido ósseo descalcificado, corado com HE, dos grupos C e CS. Em maior aumento, notamos o osso compacto de padrão homogêneo e distribuição uniforme das trabéculas ósseas (\*) nos grupos C (A) e CS (C) (\*\*). Em maior aumento, identificamos afilamento das trabéculas, um discreto aumento de osteoblastos (seta) e aumento de osteoclastos (seta) na superfície das trabéculas (B), quando comparamos ao grupo C (D).



**Figura 22.** (Painéis A-D): Cortes histológicas de tecido ósseo descalcificado, corado com HE, dos grupos F e FCS. Em maior aumento, verificamos desorganização das trabéculas ósseas (\*) nos grupos F (A) e FCS (C) (\*\*). Em maior aumento, identificamos remodelamento trabecular, aumento de osteoblastos (seta) e de superfície de reabsorção óssea (B), quando comparamos ao grupo C (D).

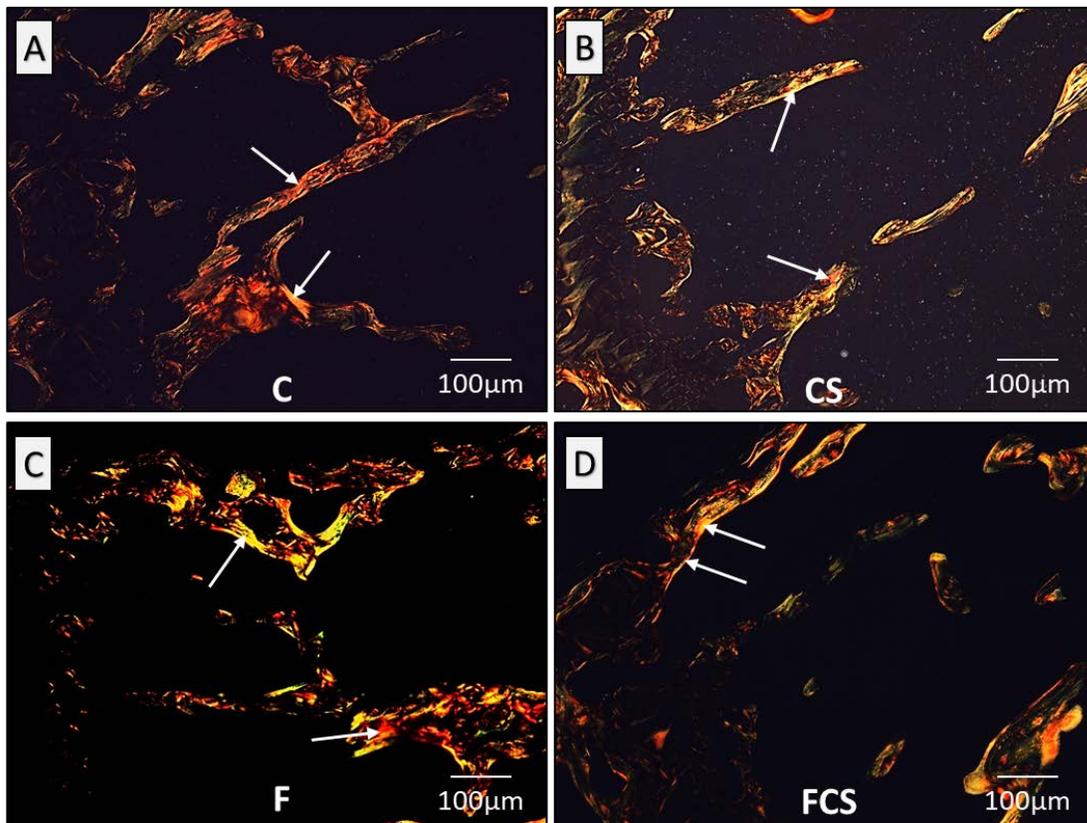
Na **Figura 22 A**, observamos, em menor aumento, a região da fratura óssea inserida na rede de trabéculas, que estão dispostas de maneira heterogênea e desorganizada no tecido ósseo do grupo F. Em maior aumento (**Figura 22B**), percebemos aumento da população osteoblástica e intenso remodelamento trabecular, quando comparamos ao grupo C (**Figura 21B**).

Na **Figura 22C**, no grupo FCS, notamos desorganização, afinamento das trabéculas e extensas placas de reabsorção óssea envolvendo a rede trabecular.

Em maior aumento, identificamos intensa síntese de osteoide, caracterizada por uma região clara circundando as trabéculas ósseas (**Figura 22D**).

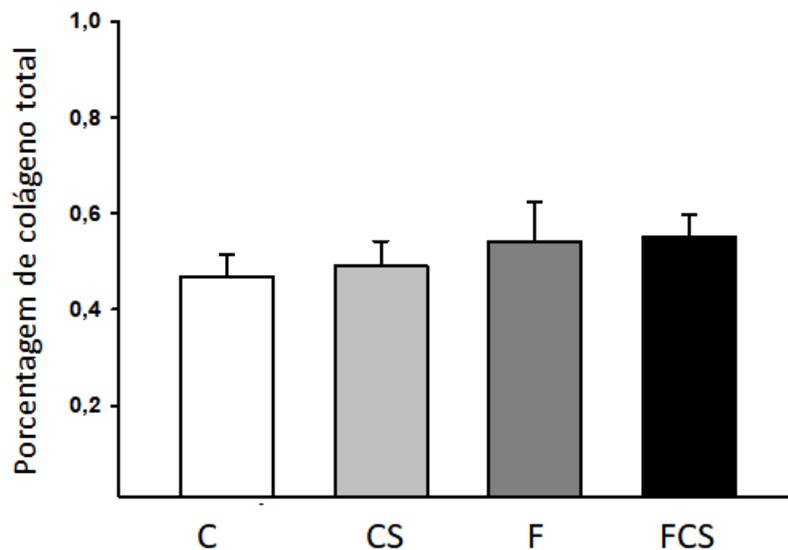
### **B.2. Relação entre a formação de fibras grossas e finas do colágeno do osso após a exposição à fumaça de cigarro**

Na **Figura 23 (Painéis A-D)**, observamos o tecido ósseo em microscópio de luz polarizada, o que permitiu diferenciar a proporção de fibras grossas (birrefringência vermelho-alaranjado) e de fibras finas (birrefringência verde-amarelada) nesse tecido. Identificamos, nos animais do grupo C, as trabéculas ósseas compostas predominantemente por fibras grossas, caracterizadas pela presença de birrefringência vermelho-alaranjado, obedecendo a um padrão homogêneo em toda a extensão. Em contraste, os grupos CS e FC mostraram trabéculas ósseas compostas predominantemente por fibras finas, indicadas pela birrefringência verde-amarelada vista nesse tecido. Por outro lado, no grupo FCS, verificamos trabéculas constituídas de fibras grossas e finas, caracterizadas pela presença de uma birrefringência difusa avermelhado-esverdeada.



**Figura 23.** (Painéis A-D): Cortes histológicos de tecido ósseo corados com Picrosirius e analisados em microscópio de polarização. Notar em (A), nos animais do grupo C, a birrefringência avermelhada e homogênea da trabécula óssea (fibras grossas). Em contraste, em (B), evidenciamos um padrão heterogêneo amarelo-esverdeado (fibras finas) nos animais dos grupos CS, FC e FCS. Teste estatístico utilizado: Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

Os resultados quantitativos, provenientes da análise histomorfométrica da composição das fibras finas e grossas de colágeno no osso, não mostraram diferença significativa entre os grupos estudados **Figura 23 (Painéis A-D)**.



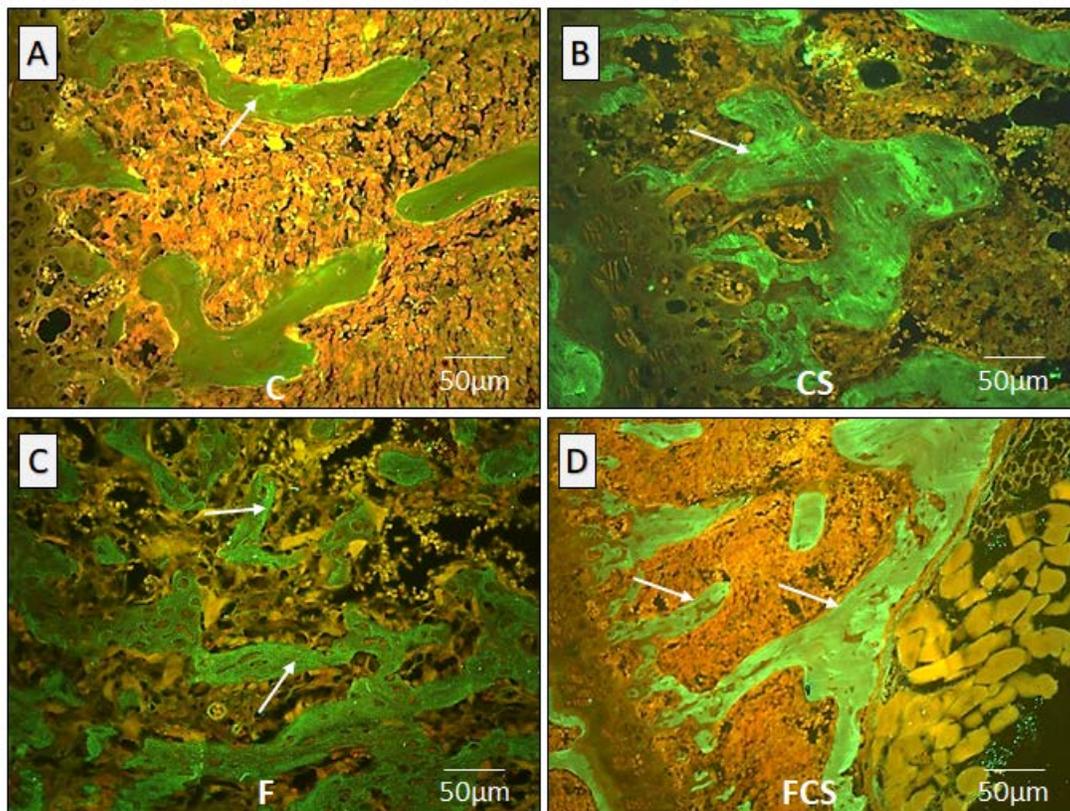
**Figura 24.** Representação Gráfica da quantificação das fibras de colágeno grossas e finas nos grupos C, CS, F e FCS. Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Todos os valores foram quantificados em 10 campos aleatórios, não coincidentes, no tecido ósseo. Teste estatístico utilizado: Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

### **B.3. Efeito da exposição à fumaça de cigarro na composição da matriz**

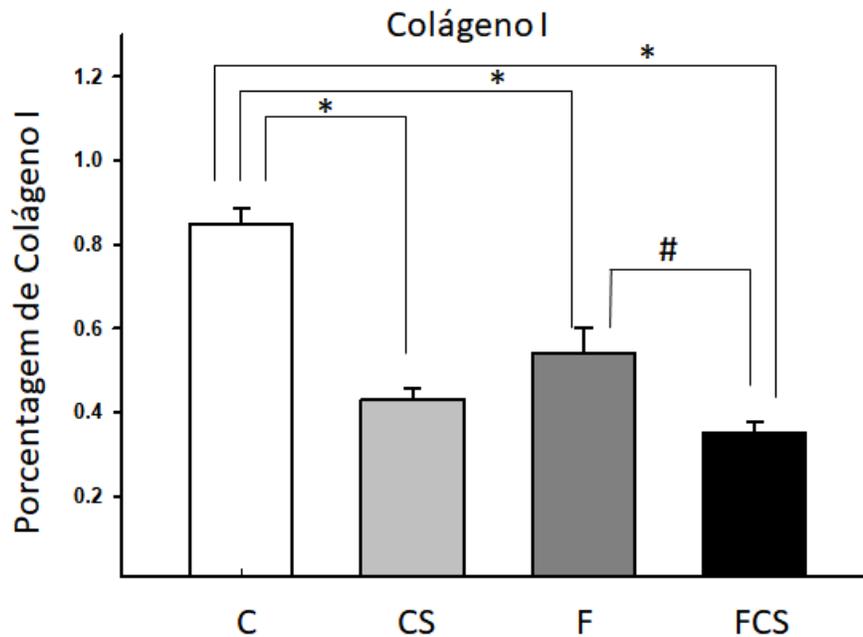
#### **fibrilar do osso**

A **Figura 25 A** mostra, no grupo C, a distribuição normal do colágeno do tipo I ao longo das trabéculas ósseas, característico da matriz fibrilar óssea, o que contrasta com a disposição irregular e heterogênea dessa proteína nos grupos CS, FC e FCS (**Figura 25, Painéis B-D**). Esses resultados coincidem com o padrão morfológico observado pela coloração de Picosirius, que indicou diminuição de fibras mais espessas nos animais dos grupos CS, FC e FCS (**Figura 23, Painéis A-**

D). Adicionalmente, na análise morfométrica dos grupos CS, FC e FCS, identificamos uma diminuição significativa das fibras de colágeno I, quando comparadas com as do grupo C (**Figura 26,Tabela 2**) ( $p = 0,010$ ).



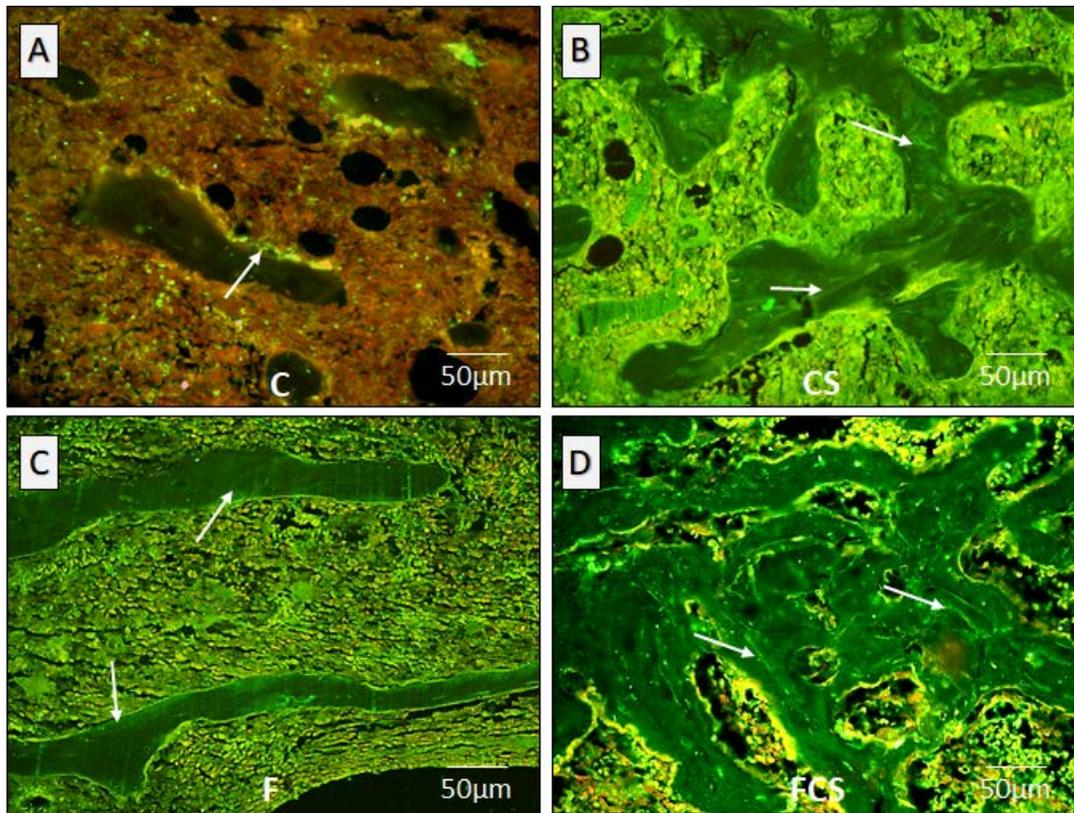
**Figura 25.** (Painéis A-D): Cortes histológicos representativos da Imunofluorescência para colágeno do tipo I. Observamos em A, grupo C, a distribuição uniforme e retilínea do colágeno do tipo I no tecido ósseo (setas) e irregular e heterogênea nos grupos CS, FC e FCS (setas). Notar, em B, a mudança do padrão da fluorescência para o colágeno I no grupo CS, que se intensifica nos grupos FC e FCS. Teste estatístico utilizado: Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.



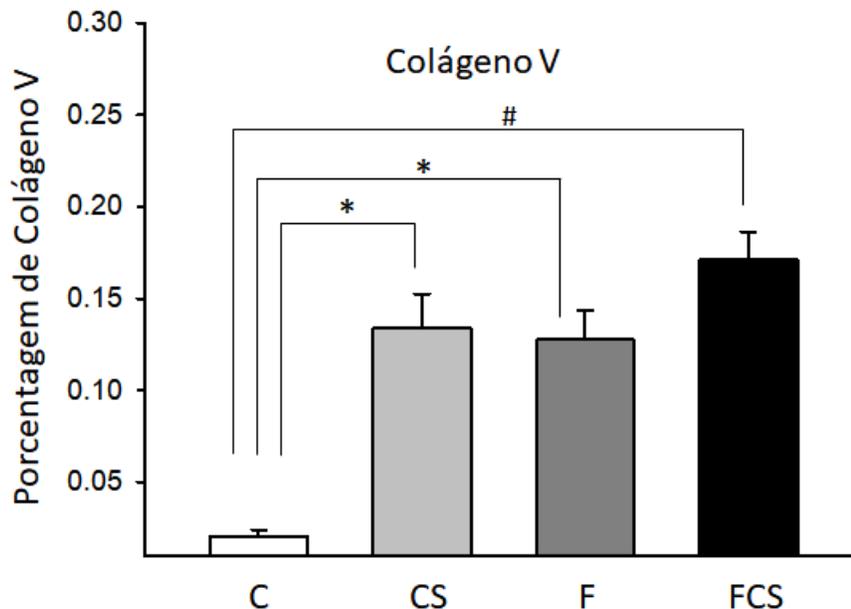
**Figura 26.** Representação Gráfica da quantificação das fibras de colágeno I nos grupos C, CS, FC e FCS (\* $p < 0,001$ ) e entre FC e FCS (\* $p < 0,01$ ). Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Todos os valores foram quantificados em 10 campos aleatórios, não coincidentes, no tecido ósseo. Os grupos foram comparados usando-se Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

Por outro lado, na **Figura 27A**, demonstramos, no grupo C, a imunomarcção para o colágeno do tipo V apresentando um padrão normal ao redor dos vasos das trabéculas ósseas, o que contrasta com a maior intensidade de fluorescência e as irregularidades nas paredes dos vasos e ao longo da trabécula óssea nos grupos CS, FC e FCS (**Figura 27, Painéis B-D**). Esses achados confirmam os resultados da avaliação pela coloração de Picosirius, que indicaram, nos grupos CS e FC, trabéculas ósseas compostas por fibras finas, percebidas pela birrefringência esverdeada, quando comparadas com as do grupo C (**Figura 23, Painéis A-D**). Ainda, na análise morfométrica dos grupos CS, FC e FCS, encontramos um

aumento significativo das fibras de colágeno V, quando comparadas com as do grupo C (**Figura 28, Tabela 2**) ( $p < 0,0001$ ).



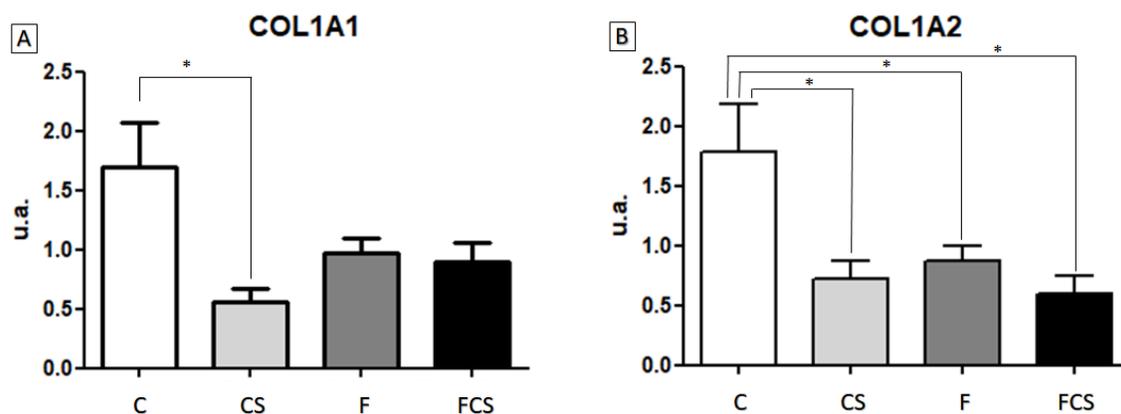
**Figura 27.** (Painéis A-D): Cortes histológicos representativos da Imunofluorescência para colágeno do tipo V. Notamos em A, grupo C, a distribuição do colágeno do tipo V mostrando a fluorescência ao redor dos vasos da trabécula óssea (setas) e mais intensa ao redor das paredes dos vasos de padrão heterogêneo nos grupos CS, FC e FCS (setas). Notar, em B, o padrão difuso da imunomarcção fluorescente para o colágeno V no grupo CS, que se intensifica nos grupos FC e FCS (setas). Teste estatístico utilizado: Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.



**Figura 28.** Representação Gráfica da análise morfométrica das fibras de colágeno V nos grupos C, CS, FC (\* $p < 0.0001$ ) e entre os grupos C e FCS (\* $p < 0.05$ ). Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Todos os valores foram quantificados em 10 campos aleatórios, não coincidentes, no tecido ósseo. Os grupos foram comparados usando-se Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

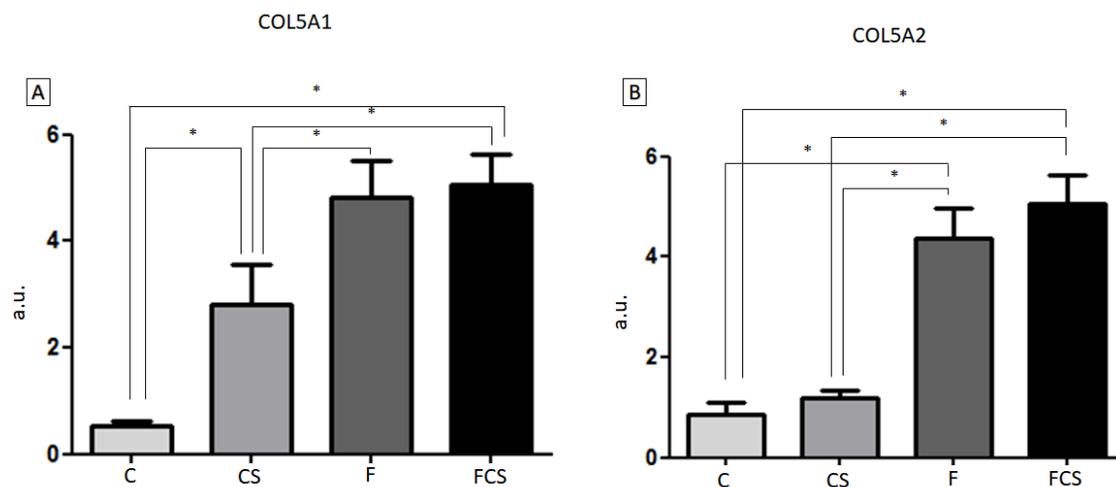
#### **B4. Análise de Expressão de Genes COL1A1, COL1A2, COL5A1 e COL5A2**

Na **Figura 29 (Painel A)**, verificamos que a expressão gene COL1A1 apresentou-se significativamente diminuída no grupo CS, em comparação ao grupo C (\* $p = 0,008$ ), com uma tendência à diminuição nos grupos FC e FCS, embora sem relevância estatística. Por outro lado, a expressão do gene COL1A2 mostrou diminuição significativa nos grupos CS, FC e FCS, quando comparados ao grupo C (**Figura 29, Painel B**).



**Figura 29.** (Painéis A e B): Representação gráfica da análise da expressão dos genes COL1A1 e COL1A2 nos grupos C, CS, FC e FCS. Notar a diminuição da expressão para o gene COL1A1 no grupo CS ( $*p < 0.0001$ ) e para o gene COL1A2 nos grupos CS, FC e FCS, em relação ao grupo C ( $*p < 0.0001$ ). Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Os grupos foram comparados usando-se Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

No que se refere à **Figura 30 (Painel A)**, visualizamos aumento significativo da expressão do gene COL5A1 entre os grupos CS, FC e FCS, quando comparados ao grupo C ( $*p < 0.0001$ ). Além disso, houve aumento da expressão do gene COL5A2 entre os grupos FC e FCS, em comparação ao grupo C ( $*p < 0,0001$ ) (**Figura 30, Painel B**). Não observamos diferença significativa na expressão do COL5A2 entre os grupos C e CS.



**Figura 30.** (Painéis A e B): Representação gráfica da análise da expressão dos genes COL5A1 e COL5A2 nos grupos C, CS, FC e FCS. Notar o aumento da expressão para o gene COLVA1 nos grupos CS, F e FCS ( $*p<0.008$ ) e para o gene COL1A2 nos grupos CS, FC e FCS, em relação ao grupo C ( $*p<0.005$ ). Os valores expressos são as médias  $\pm$  (SE) de 6 animais em cada grupo. Os grupos foram comparados usando-se Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

**Tabela 2:** Resultados da análise morfométrica e da Expressão Gênica da matriz fibrilar óssea

MATRIZ FIBRILAR		C	CS	F	CSF
HISTOLOGIA	COLÁGENO I	0,85 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,02 *	0,54 $\pm$ 0,06 *	0,35 $\pm$ 0,02 * #
	COLÁGENO V	0,02 $\pm$ 0,003	0,13 $\pm$ 0,02 *	0,12 $\pm$ 0,01 *	0,17 $\pm$ 0,01 *
	COL 1 A1	1,70 $\pm$ 0,37	0,56 $\pm$ 0,11 *	0,97 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,17
PCR TEMPO REAL	COL 1 A2	1,78 $\pm$ 0,41	0,72 $\pm$ 0,15 *	0,86 $\pm$ 0,12 *	0,60 $\pm$ 0,15 *
	COL 5 A1	0,53 $\pm$ 0,08	2,80 $\pm$ 0,74 *	4,83 $\pm$ 0,67 *	5,05 $\pm$ 0,58 *
	COL 5 A2	0,85 $\pm$ 0,24	1,19 $\pm$ 0,15	4,37 $\pm$ 0,59 *	5,05 $\pm$ 0,58 *

\* Comparado com Grupo C # Comparado com Grupo F

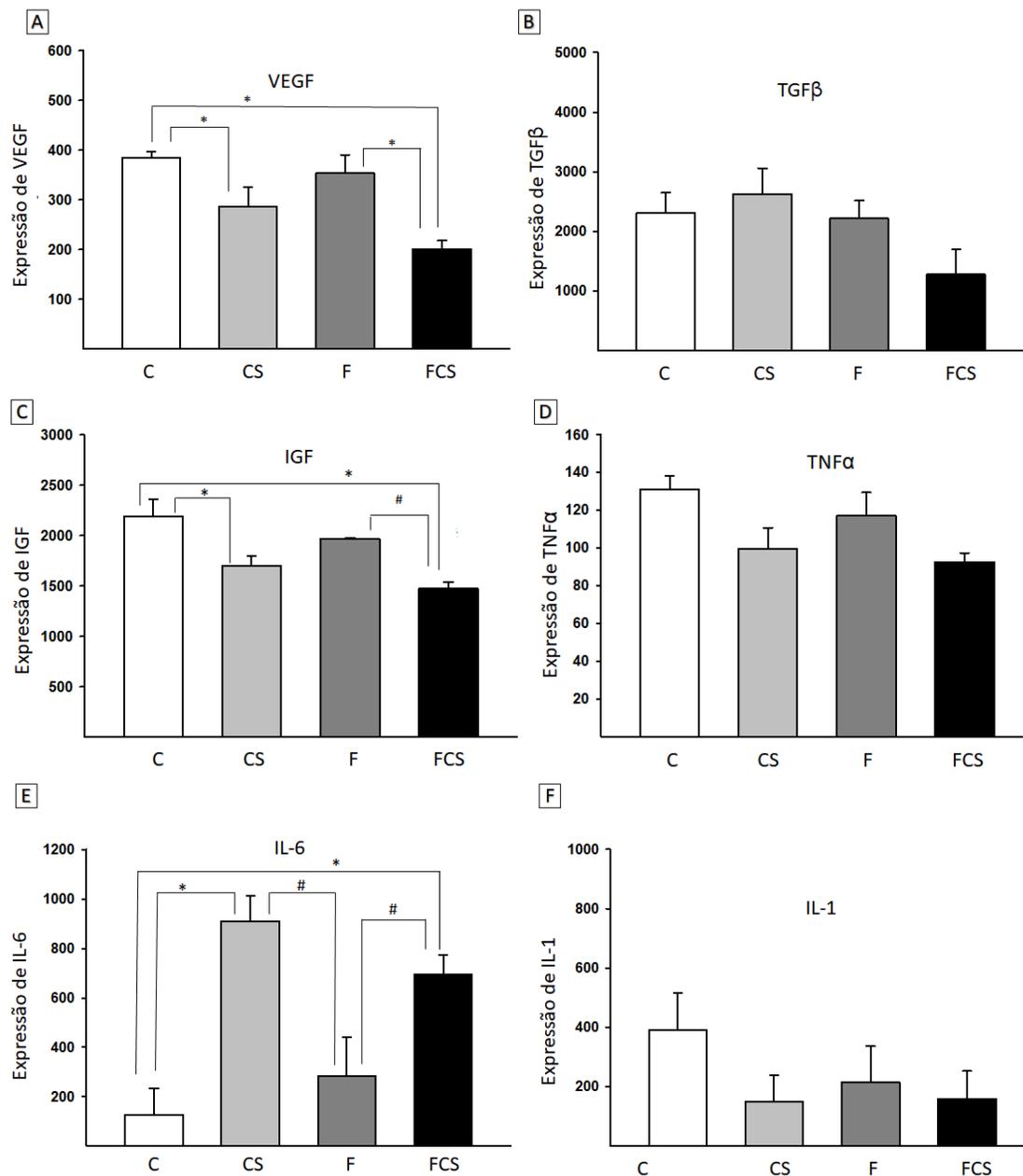
**C. Ação da fumaça de cigarro na expressão citocinas e fatores de crescimento do tecido ósseo**

Os valores de expressão de VEGF mostraram diminuição significativa nos grupos CS e FCS, em relação ao grupo C e ao grupo F ( $p < 0,001$ ). A redução de expressão de VEGF no grupo FCS foi importante também, quando comparada com a dos grupos CS e FC ( $p = 0,047$ ).

Houve um aumento relevante na expressão de IL-6 nos grupos expostos à fumaça de cigarro (CS e FCS), quando comparados aos grupos-controle (C e FC) ( $p < 0,001$ ).

O oposto foi observado na expressão de IGF-1, a qual foi significativamente menor nos grupos expostos à fumaça de cigarro (CS e FCS), quando comparados aos grupos-controle (C e FC) ( $p < 0,001$ ).

Para expressão de IL-1, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , encontramos uma tendência de menor expressão nos grupos Fumo, mas tal resultado não atingiu relevância estatística (**Figura 31, Painel A-F**).



**Figura 31.** (Painéis A-F): Representações gráficas da análise das interleucinas no macerado ósseo. **A)** Notar a diminuição de VEGF nos grupos CS e FCS, quando comparados ao C (\*  $p < 0,001$ ). O grupo FCS mostrou-se comparado ao grupo F isolado (\*  $p < 0,001$ ). **B)** Observamos tendência de diminuição de TGFβ no grupo FCS. **C)** IGF apresentou-se diminuída nos grupos CS e FCS comparados ao grupo C (\*  $p < 0,001$ ). O grupo FCS também mostrou diminuição comparado ao grupo F (#  $p < 0,05$ ). **D)** A expressão de TNFα não apresentou diferenças entre os grupos. **E)** IL-6, identificamos aumento nos grupos CS e FCS comparados aos grupos C (\*  $p < 0,001$ ) e F (#  $p < 0,05$ ). **F)** Não observamos diferenças na expressão de IL-1 entre os grupos. Os valores expressos são as médias ± (SE) de 6 animais em cada grupo. Teste estatístico utilizado: Análise de Variância para Dois Fatores, seguido de pós-teste Holm Sidak.

**Tabela 3:** Mostrando os resultados numéricos da expressão de Citocinas no macerado ósseo nos grupos C, CS, F e FCS

CITOCINAS	C	CS	F	CSF
VEGF	383.96 ± 13.12	↓ 287.02 ± 37.97 *	↑ 353.56 ± 87.04 *	↓ 200.97 ± 17.07 *
IGF	2188.70 ± 172.27	↓ 1697.58 ± 98.71 *	1962.88 ± 16.96	↓ 1472.83 ± 67.28 *
IL-1	389.81 ± 124.89	↓ 149.96 ± 89.00	↓ 213.84 ± 122.25	↓ 159.95 ± 93.16
IL-6	127.88 ± 105.65	↑ 910.27 ± 103.20 *	283.26 ± 157.11	↑ 694.89 ± 78.20 *
TGFβ	2315.41 ± 336.44	2630.13 ± 428.30	2215.72 ± 301.03	↓ 1277.58 ± 423.72
TNFα	131.25 ± 7.07	↓ 99.76 ± 10.92	116.99 ± 12.42	↓ 92.57 ± 4.82

## **Discussão**

Neste estudo, observamos que a exposição à fumaça de cigarro altera a composição e a proporção das fibras de colágeno pertencentes à matriz fibrilar óssea, culminando na diminuição do colágeno tipo I e no aumento do tipo V. Ainda, o fumo retarda a mineralização pela diminuição de IGF e VEGF e pelo aumento da expressão de IL-6, sugerindo dano na função osteoblástica e fragilidade da matriz fibrilar óssea.

Nossos resultados mostram que a exposição à fumaça de cigarro pode levar ao aumento da atividade inflamatória no tecido ósseo, determinado pela liberação local de citocinas, comprometendo a síntese de colágeno e a mineralização óssea. Tais alterações são observadas pela exposição isolada à fumaça de cigarro no grupo CS, mas causam maior prejuízo em condições de maior demanda fisiológica, como na resposta à injúria tecidual pós-traumática observada no grupo FCS.

Após uma fratura, o processo de consolidação envolve três fases principais: reação inicial (inflamatória), reparação (formação do calo ósseo) e remodelamento tardio. O fumo tem sido identificado como agente prejudicial, causando impacto negativo nas células formadoras, retardando o reparo ósseo e aumentando o risco de evolução para pseudartrose <sup>106</sup>.

Na fase regenerativa, os fibroblastos iniciam a deposição de um estroma que suporta a rede de neoangiogênese. Nessa fase, a presença de nicotina pode inibir o crescimento dos capilares e comprometer o próximo estágio, o remodelamento dos componentes da matriz <sup>107</sup>.

É importante notar que essas três fases não ocorrem de forma independente, sendo normalmente concomitantes. Quando o crescimento vascular acontece de forma efetiva, a matriz fibrilar pode ser depositada, seguida pela secreção de osteoide e pela mineralização deste, levando à formação do calo cartilaginoso, remodelado secundariamente para calo ósseo. O remodelamento pode ocorrer lentamente ao longo de meses e até de anos <sup>108</sup>.

Nós observamos que, na presença de uma fratura, a exposição à fumaça de cigarro aumentou a severidade do dano tecidual justamente em um momento no qual a demanda fisiológica exigiria maior resposta, a fim de possibilitar a regeneração óssea. Apesar de não identificarmos diferenças no volume de colágeno trabecular total entre os grupos estudados, a proporção de colágeno do tipo I diminuiu significativamente, enquanto a proporção de colágeno V aumentou nos grupos fumo (CS) e na associação do fumo com a fratura (FCS), sugerindo efeito cumulativo.

Esses resultados foram confirmados pela análise da expressão gênica, que indicou diminuição da expressão dos genes COL1A1 e COL1A2 e aumento da expressão de COL5A1 e COL5A2 nos grupos fumo (CS, FC e FCS). Ainda, notamos uma mudança no perfil de síntese dos genes para as cadeias de colágeno V e identificamos aumento significativo da expressão para o gene COL5A1 entre os grupos C e CS, o que não ocorreu com a expressão da cadeia COL5A2. Esse é um fato inédito e muito interessante em nossos resultados, pois sugere que o fumo pode interferir na estrutura molecular do colágeno do tipo V e, conseqüentemente, na sua

interação com as fibrilas de colágeno do tipo I, retardando a regeneração do osso com fratura sob a ação do fumo.

Até o momento, já está bem estabelecido que o colágeno do tipo V copolimeriza-se com os tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I/III/V). A porção tripla hélice helicoidal da molécula de colágeno V encontra-se oculta no interior dessas fibrilas, sendo o domínio globular amino-terminal (-NH<sub>3</sub>) projetado para a superfície <sup>64, 67</sup>. Esse domínio globular regula o crescimento fibrilar, impedindo fisicamente que novos monômeros acrescentem-se à fibrila. Devido a essa característica, o colágeno tipo V tem função importante na organização, no crescimento e no dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, sendo atualmente considerado o nucleador da fibrilogênese do colágeno tipo I <sup>52, 54</sup>. Em tecidos tendíneos, Connizzo e col. (2016), usando camundongos heterozigotos ou NULL para a expressão do gene COL5A1, respectivamente, demonstraram que, na diminuição ou na ausência de colágeno do tipo V, ocorre aumento na espessura das fibrilas de colágeno em tendões supraespinhais; porém, no grupo NULL, as fibrilas de colágeno apresentavam padrão heterogêneo e desorganizado, confirmando o papel regulador do colágeno V na fibrilogênese, no controle da polimerização e na interação das cadeias de colágeno do tipo I <sup>109</sup>.

Nossos resultados mostram que o gene COL5A1 foi mais expresso no grupo CS, em relação ao grupo C, sugerindo uma tentativa de reparação através da regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno do tipo I. No entanto, no osso sob o

efeito da exposição à fumaça de cigarro, essa síntese é estimulada, levando à formação de uma matriz com características fibrilares mais finas e mais frágeis.

Wenstrup e col. (2006) confirmaram a importância do papel regulador do colágeno V, demonstrando a incapacidade em formar fibrilas de colágeno em camundongos NULL para o colágeno V <sup>72</sup>. Ainda, Smith e col. (2013) evidenciaram, em modelo experimental, que o colágeno do tipo V está distribuído preferencialmente na superfície celular de tenócitos, enquanto o colágeno I localiza-se ao longo do tecido tendíneo, sugerindo que o colágeno do tipo V tem função de iniciador da fibrilogênese <sup>110</sup>. Lulinska-Kuklik e col., através de estudo realizado com atletas profissionais de futebol com histórico de ruptura do Ligamento Cruzado Anterior, também identificaram variações na expressão gênica de COL5A1, podendo ser tal variação um fator de risco para lesões ligamentares em grupos de alto risco <sup>111</sup>.

Heffernan e col. (2017), do mesmo modo, obtiveram resultados semelhantes estudando jogadores de Rugby. Os autores constataram risco elevado de lesões ligamentares e tendíneas em atletas com variações na expressão gênica de COL5A1. Desportistas homozigotos para os alelos C, nas combinações rs12722 e rs3196378, têm índice menor de lesões, bem como maior longevidade e sucesso na carreira esportiva <sup>112</sup>.

Na mesma linha de pensamento, Altinisik e col. (2015) identificaram a associação de polimorfismo no gene COL5A1 com a gênese de diversas tendinopatias, corroborando estudos prévios, nos quais a variação na expressão de

COL5A1 estaria relacionada à epicondilite lateral, à tendinopatia de Aquiles e ao aumento no risco de roturas ligamentares <sup>113</sup>.

No presente estudo, verificamos que a exposição isolada à fumaça de cigarro influencia a síntese dos genes COL5A1 e COL5A2, com predomínio da expressão para o gene COL5A1, sugerindo que o fumo interfere na fibrilogênese desse tipo de colágeno. Além disso, o aumento do colágeno do tipo V no tecido pode alterar a regulação do diâmetro das fibras heterotípicas, constituídas de colágeno dos tipos I, III e V, o que predispõe à formação de fibras de colágeno mais finas ou com diâmetro menor, levando a uma maior fragilidade tecidual. Esses achados corroboram os resultados obtidos por meio da coloração de Picrosirius, que mostrou predominância de fibras finas nos animais expostos à fumaça de cigarro.

A alteração da fibrilogênese do colágeno pode ser explicada através da agressão tecidual e celular causada pela exposição persistente ao fumo por longos espaços de tempo, que predispõe ao desenvolvimento de um processo inflamatório crônico, resultante da produção exacerbada de metaloproteinases, as quais podem levar à exposição de novos antígenos, ou seja, à ativação de anticorpos com consequente degradação da matriz <sup>114</sup>. Por outro lado, a alteração na proporção de tipos de colágeno é provavelmente o mecanismo principal que explica a diminuição na densidade mineral e o aumento na fragilidade óssea, principalmente, em um ambiente de reparo tecidual pós-traumático.

Essa hipótese é baseada nos resultados apresentados em nosso estudo, os quais demonstram que, considerando os estágios do remodelamento ósseo, ocorre

intensa ativação osteoclástica e prejuízo da atividade osteoblástica nos animais expostos à fumaça de cigarro, com e sem fratura. Ainda, todos os parâmetros relacionados à reabsorção óssea mostraram ativação dos osteoclastos, com aumento da superfície de reabsorção no grupo CS. No entanto, os parâmetros relacionados à função osteoblástica, associados à diminuição do número, espessura e volume das trabéculas, à menor superfície de mineralização e ao índice de formação óssea, indicaram que a exposição à fumaça de cigarro diminuiu a osteoblastogênese.

Adicionalmente, Karunaratne e col. (2016), por meio de modelo experimental de indução de osteoporose com corticoesteroides, visualisaram que a alteração no padrão de orientação das fibrilas de colágeno interfere negativamente na mineralização da matriz óssea de camundongos. Tal efeito ocorreria devido ao prejuízo no padrão de posicionamento dos cristais de hidroxiapatita, normalmente depositados em linhas paralelas ao eixo longo das fibrilas <sup>115</sup>.

Além do mais, nossos resultados histomorfométricos mostram que as amostras obtidas nos grupos FC e FCS, submetidos à osteotomia, apresentaram aumento da espessura trabecular; no entanto, o grupo CS demonstrou significativa redução da área trabecular e da síntese de osteoide e alteração da matriz fibrilar óssea.

Estudos anteriores também justificam os resultados deste trabalho, pois indicam que a nicotina estimula a osteoclastogênese e tem efeito paradoxal dose-dependente nos osteoblastos <sup>116</sup>. Em doses pequenas, ela incita a proliferação; em

doses altas, induz efeitos tóxicos, acarretando apoptose celular. Nossos resultados corroboram o estudo descrito, uma vez que observamos aumento da superfície de osteoclastos e tendência a aumento do número de osteoblastos no grupo CS. Embora tenhamos detectado aumento de osteoblastos, nossos dados quantitativos indicam que a função celular dessas células possivelmente esteja prejudicada.

Essa hipótese é caracterizada pela análise da expressão de citocinas, a qual comprovou a presença de processo inflamatório propício à osteoclastogênese, já que percebemos elevação de IL-6 e redução de VEGF e de IGF-1 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, CS e FCS.

O VEGF é uma citocina fundamental na promoção de neovascularização (angiogênese). Ela é necessária para a regeneração tecidual (osteogênese), no processo de remodelação fisiológico e principalmente no período pós-traumático. Essa citocina também tem efeito direto na promoção da osteoblastogênese e da osteoclastogênese <sup>117</sup>. Por outro lado, o IGF-1 é o fator de crescimento mais abundante presente na matriz óssea, sendo considerado um potente estimulante de proliferação osteoblástica, um promotor de ativação celular e do aumento de expectativa de vida média dessas células. É tido como um importante promotor do desenvolvimento esquelético em vertebrados <sup>118</sup>.

A diminuição da expressão de VEGF e IGF-1, verificada em nosso estudo, possivelmente deve estar associada à redução das variáveis histomorfométricas de formação, Tb.Th; MAR; MS/BS; MLT e BFR/BS, e pode interferir negativamente em relação à alteração na proporção do colágeno dos tipos I e V na matriz fibrilar óssea.

Citocinas pró-inflamatórias são reguladoras da resposta imune a infecções, inflamações e trauma. Essas citocinas incluem IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , Interferon  $\gamma$  e IL-6. Notavelmente, IL-6 tem ação osteoclastogênica <sup>119</sup>.

O aumento das variáveis histomorfométricas de reabsorção visto no grupo CS pode ser explicado pela elevação da expressão de IL-6. Estudos apontam que os efeitos de IL-6 são interconectados com os de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , no que tange à reabsorção óssea, mostrando que a elevação de IL-6 induz a elevação de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Provavelmente, em nosso estudo, a coleta de amostras para análise de citocinas ocorreu em um momento anterior a esse mecanismo de *feedback* acontecer. Para esclarecer essa hipótese, um estudo temporal deverá ser realizado, para que possamos avaliar com mais detalhes tais eventos moleculares.

O TGF- $\beta$  é a citocina anabólica mais estudada, tendo sido indicada como um potente indutor de osteoblastogênese e de osteogênese. Observamos uma tendência à diminuição na expressão de TGF- $\beta$  no grupo FCS. Possivelmente, esses níveis mais baixos estão associados à diminuição da atividade osteoblástica, explicando a maior dificuldade em compensar a elevação de atividade osteoclástica, demonstrada pela histomorfometria.

Tendo em vista que a exposição à fumaça de cigarro altera a composição das fibras de colágeno da matriz fibrilar óssea, retarda a mineralização e modifica a interação entre os diferentes tipos de colágeno, podemos sugerir que as toxinas presentes no fumo podem interferir na integridade do tecido ósseo, o que se intensifica em processos pós-traumáticos, como a fratura óssea.

A alteração na proporção de tipos de colágeno é provavelmente o mecanismo principal que explica a diminuição na densidade mineral e o aumento na fragilidade óssea, principalmente em um ambiente de reparo tecidual pós-traumático.

Certamente, esse prejuízo inflamatório e estrutural interfere na regeneração da matriz fibrilar osteoide e na sua mineralização, comprometendo a velocidade de reparação, bem como a qualidade e a integridade do novo tecido ósseo.

Assim, nossos achados reforçam a ideia de que um maior entendimento dos mecanismos de reabsorção, regeneração e mineralização matricial pode otimizar o futuro de tratamentos clínicos e cirúrgicos de afecções osteoarticulares, como a osteoporose e a recuperação pós-traumática.

## **Conclusões**

A alteração na proporção dos tipos de colágeno na matriz óssea é provavelmente o principal mecanismo para explicar a maior fragilidade fisiológica para o reparo tecidual no indivíduo tabagista. Certamente, esses mecanismos inflamatórios prejudicam a regeneração da matriz e sua consequente mineralização secundária, comprometendo a qualidade e a integridade do tecido em neoformação.

## **Referências Bibliográficas**

1. WHO global report in prevalence of tobacco smoking 2015 World Health Organization. WHO: Geneva, Switzerland, 2015; pp.1-359
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 2006; **3**(11): e-42
3. Lang P, Celli B, Agusti A, et al. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N Engl J Med 2015; **373**(2): 111-22
4. Gaston MS, Simpson AH. Inhibition of fracture healing. J Bone Joint Surg Br 2007 Dec; **89**(12):1553–60.
5. Netscher DT, Clamon J. Smoking: adverse effects on outcomes for plastic surgical patients. Plast Surg Nurs 1994 Winter; **14**(4):205–10
6. Cobb TK, Gabrielsen TA, Campbell 2nd DC, Wallrichs SL, Ilstrup DM. Cigarette smoking and nonunion after ankle arthrodesis. Foot Ankle Int 1994Feb; **15**(2):64–7.
7. Pryor WA. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environ Health Perspect 1997 Jun; **105**(Suppl. 4):875–82
8. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002 Aug; **283**(2):L246–55.
9. Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. J Foot Surg 1990 Jan–Feb; **29**(1): 84–7.
10. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950–1995. J Toxicol Environ Health 1997 Mar; **50**(4):307–64.

11. Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol* 1998 Sep–Oct; **16**(5):557–64.
12. Hukkanen J, Jacob 3rd P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005 Mar; **57**(1): 79–115.
13. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, Schultz RC. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1985 Apr; **75**(4):544–51.
14. Lefkowitz RJ. Editorial: smoking, catecholamines, and the heart. *N Engl J Med* 1976 Sep 9; **295**(11):615–6.
15. Waeber B, Schaller MD, Nussberger J, Bussien JP, Hofbauer KG, Brunner HR. Skin blood fIKG reduction induced by cigarette smoking: role of vasopressin. *Am J Phys* 1984 Dec; **247**(6 Pt 2):H895–901.
16. Winniford MD, Wheelan KR, Kremers MS, Ugolini V, van den Berg Jr E, Niggemann EH, et al. Smoking-induced coronary vasoconstriction in patients with atherosclerotic coronary artery disease: evidence for adrenergically mediated alterations in coronary artery tone. *Circulation* 1986 Apr; **73**(4):662–7.
17. Bornmyr S, Svensson H. Thermography and laser-Doppler flowmetry for monitoring changes in finger skin blood flow upon cigarette smoking. *Clin Physiol* 1991 Mar; **11**(2):135–41.

18. van Adrichem LN, Hovius SE, van Strik R, van der Meulen JC. Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br J Plast Surg* 1992 Jan; **45**(1):9–11.
19. Folsom AR. Epidemiology of fibrinogen. *Eur Heart J* 1995 Mar; **16**(Suppl. A):21–3. discussion 3–4.
20. El-Zayadi AR, Selim O, Hamdy H, El-Tawil A, Moustafa H. Heavy cigarette smoking induces hypoxic polycythemia (erythrocytosis) and hyperuricemia in chronic hepatitis C patients with reversal of clinical symptoms and laboratory parameters with therapeutic phlebotomy. *Am J Gastroenterol* 2002 May; **97**(5):1264–5.
21. Leow YH, Maibach HI. Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen. *Clin Dermatol* 1998 Sep–Oct; **16**(5):579–84.
22. Sorensen LT, Jorgensen S, Petersen LJ, Hemmingsen U, Bulow J, Loft S, et al. Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis. *J Surg Res* 2009 Apr; **152**(2):224–30.
23. Cigarette Smoking influences the clinical and occupational outcome of patients with tibial shaft fractures. Moghaddam et al, *J Bone Mineral Metab* (2011) 29:633-644 DOI 10.1007/s00774-011-0309-1
24. Harmful lifestyles on orthopedic implantation surgery: a descriptive review on alcohol and tobacco use. Fini et al, *J Bone and Mineral Metab* (2011) 29:633-644 DOI 10.1007/s00774-0309-011-1

25. Raggat LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010; 285:25103-8
26. Roodman GD. Advances in bone biology: The osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17:308-32
27. Sodek J, McKee ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 2000; 24:99-126.
28. Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21: 115-37.
29. Sodek J, Overall CM. Matriz metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matriz.* 1992; 1(suppl):35262.
30. Elmardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif tissue Int.* 1990; 46:23945.
31. Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. *Cell Tissue.*1998; 293:173-6.
32. Tanaka K, Yamaguchi Y, Hakeda Y. Isolated chick osteocytes stimulated formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Metab.* 1995; 13:6170.

33. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest.* 1999; 79:8394.
34. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res.* 2003; 38:223-6.
35. Clarke B Normal bone anatomy and physiology. *Clin Am Soc Nephrol* 2008; 3:5131-9
36. Lynch MP, Capparelli C, Stein GS, Lian JB. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J Cell C=Biochem* 1998; 68:31-49
37. Raisz LG, Rodan GA. Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. *Metabolic bone diseases and clinically related disorders.* San Diego: Academic Press; 1998. p. 1-22.
38. Noble B. Microdamage and apoptosis. *Eur J Morphol.* 2005; 42:91-8.
39. Garcia-Moreno C, Catalán MP, Ortiz A, Alvarez L, De la Piedra C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone.* 2004; 35:170-7.
40. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen on the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1243-50.
41. Palumbo C, Ferretti M, De Pol A. Apoptosis during intramembranous ossification. *J Anat* 2003; 203:589-98.

42. Cerri, PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005; 286:833-40.
43. Lynch MP, Capparelli C, Stein GS, Lian JB. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J Cell C=Biochem* 1998; 68:31-49
44. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:793-802.
45. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell.* 2001; 33:318-25.
46. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 213-7.
47. Miller SC, Jee WSS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int.* 1987; 41:1-5.
48. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res.* 2005; 40:287-93.
49. Marks JR SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat.* 1988; 183:1-44.
50. Eriksen *Rev Endocr Metab Disorder* (2010) 11:219-227 DOI 10.1007/s11154-010-9153-1

51. Clarke B Normal bone anatomy and physiology. Clin Am Soc Nephrol 2008; 3:5131-9
52. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens: structure, function and byosynthesis. Advanc Drug Delivery Reviews 2003; 55:1531-46.
53. Prockop, DP, Kiviriko, KL, Tuderman, L, Guzman, NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. N. England J. Med 1979; 301:12-23.
54. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011; 3(1): a004978
55. D'Arcangelo G., Miao G.G., Shu-Cheng C. et al. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler Nature 374, 719 - 723 (20 April 1994)
56. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. Annu Rev Biochem 2009; 78: 929-958.
57. Alberts, B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da Célula. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed; 2010. cap19.1131-1204. Junções Extracelulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular.
58. Smith LT. Holbrook KA. Madri JA. Collagen Types I, III, and V in Human Embryonic and Fetal Skin American J Anatomy 1986;175:507-521.
59. Wang Y., Azais T., Robin M., Vallée A., Catania C., Legriel P., et al (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. Nat. Mater. 11, 724–733. doi:10.1038/nmat3362.

60. Wittkowske C. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Nov 2016 doi: 10.3389/fbioe.2016.00087
61. Bruckner P. Suprastructures of extracellular matrices: Paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 7–18.
62. LeRoy EC. Systemic sclerosis: a vascular perspective. *Rheum Dis Clin N Am* 1996; 22:675-94.
63. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *C Rev Allerg Immunol* 2009; 36:15075.
64. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Science* 1990; 95:649-657.
65. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1993;121(5):1181-9.
66. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol* 1984; 116(3): 417-426.
67. Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580:143-60.

68. Chung E, Rhodes K, Miller EJ. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 23;71(4):1167-74.
69. Bonod-Bidaud C, Roulet M, Hansen U. In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis-Dermis Interface. *J Invest Dermat* 2012; 132: 1841-184.
70. Smith SM1, Birk DE. Focus on molecules: collagens V and XI. *Exp Eye Res.* 2012; 98:105-6.
71. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 2001, 32(3): 223-37
72. Wenstrup R J. Florer J. B. Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly *J Biol Chem* 2004
73. Ruggiero F, Champlaud MF, Garrone R, Aumailley M. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Experimental cell Research* 1994; 210(2):215-23.
74. Ruggiero F, Comte J, Cabañas C, Garrone R. Structural requirements for  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci* 1996;109 (7):1865-74.
75. Yaoi Y, Hashimoto K, Koitabashi H, Takahara K, Ito M, Kato I.(1990) Primary structure of the heparin-binding site of type V collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1035(2):139-45.
76. Delacoux F, Fichard A, Geourjon C, Garrone R, Ruggiero F. (1998) Molecular Features of the Collagen V Heparin Binding Site. *J Biol Chem.* 273(24):15069-76.

77. Ricard-Blum S, Beraud M, Raynal N, Farndale RW, Ruggiero F. (2006) Structural Requirements for Heparin/Heparan Sulfate Binding to Type V Collagen. *J Biol Chem.* 281(35):25195-204
78. Wong LS, Martins-Green M. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen.* 2004 Jul-Aug;12(4):471-84.
79. Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R (2009) Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab* 27:555–561
80. Nakayama Y, Mezawa M, Araki S, Sasaki T, Wang S, Han J, Li X, Takai H, Ogata Y (2009) Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. *J Periodontal Res* 44: 657–663
81. Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K, Hinder RA (1995) Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med* 18:877–882
82. Kalpana C, Menon VP (2004) Protective effect of curcumin on circulatory lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Toxicol Mech Methods* 14:339–343
83. Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Berstein H, Berstein C, Garewal H, Payne CM (2003) Nicotine increases oxidative stress, activates NF- $\kappa$ B and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by

a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 145:53–66

84. Jimi E, Ghosh S (2005) Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208:80–87

85. Hermizi H, Faizah O, Ima Nirwana S, Ahmad Nazrun S, Luke DA, Norazlina M (2007) Nicotine impaired bone histomorphometric parameters and bone remodeling biomarkers in Sprague–Dawley male rats. *Ann Microsc* 7:10–24 9

86. Akmal M, Kesani A, Anand B, Singh A, Wiseman M, Goodship A (2004) Effect of nicotine on spinal disc cells: a cellular mechanism for disc degeneration. *Spine* 29:568–575

87. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Manzi FR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr (2005) The influence of cigarette smoke inhalation on bone density. A radiographic study in rats. *Braz Oral Res* 19:47–51

88. Szulc P, Garnero B, Claustaf F, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD (2002) Increased bone resorption in moderate smokers with low body weight: the minos story. *J Clin Endocrinol Metab* 87:666–674

89. Bulmanski Z, Brady M, Stoute D, Lallier TE Cigarette smoke extract induces select matrix metalloproteinases and integrin expression in periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 83:787-96 doi:10.1902/jop.2011.110395

90. El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res*. 2006

Dec;24(12):2150-8.

91. 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 Jul;24(7):1472-9.

92. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Oct;110(4):447-52.

93. Li Ma, LW Zheng, LK Cheung. Inhibitory effect of nicotine on bone regeneration in mandibular distraction osteogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 12, 3256-3262, May, 2007

94. Chen F, Osterman AL, Mahony K. Smoking and bony union after ulna-shortening osteotomy. *Am J Orthop(Belle Mead NJ)*.2001 Jun;30(6):486-9.

95. W-Dahl A, Toksvig-Larsen S. Cigarette smoking delays bone healing: a prospective study of 200 patients operated on by the hemicallotaxis technique. *Acta Orthop Scand*. 2004 Jun;75(3):347-51.

96. Moeller AM, Pedersen T, Villebro N, Munksgaard A. Effect of smoking on early complications after elective orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Mar;85(2):178-81.

97. Glassman SD, Anagnost SC, Parker A, Burke D, Johnson JR, Dimar JR. The effect of cigarette smoking and smoking cessation on spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000 Oct 15;25(20):2608-15.

98. Wang Y, Nishida S, Elalieh H, Long R, Halloran B, Bikle D 2006. Role of IGF-1 Signaling in Regulating Osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006 June; DOI 10.1359/JBMR060610
99. Sheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel M, Ziegler R, Pfeilschifter J 2000, Serum Interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*
100. Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, Brounais B 2008. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (2009) 19-28 DOI: 10.101016/j.cytogfr.2008.11.004
101. Gerber HP, Vu TH, Ryan A, Kowalsky J, Wery Z, Ferrara N 1999 VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature America* June 1999
102. Zimmerman G, Henle P, Kusswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A Richter W, Weiss S. TGF-  $\beta$ 1 as a marker of delayed fracture healing. 2005 *Bone* 36 779-785
103. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *European Respiratory Journal* 2012 39: 254-264; doi: 10.1183/09031936.00003411
104. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature,

symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610

105. Chomczynski P & Sacchi N The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on, *Nature Protocols* Vol 1 No 2 2006 581-585 doi:10.1038/nprot.2006.83

106. Kallala R, Barrow J, Graham SM, Kanakaris N, Giannoudis PV The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin Drug Saf* 12:209-33 doi:10.1517/14740338.2013.770471

107. Raggatt LJ, and Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285: 25103-25108

108. Hadjidakis DJ, Androulakis, II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-96 doi:1092/1/385 [pii]10.1196/annals.1365.035

109. Connizzo BK, Adams SM, Adams TH, Birk DE, and Soslowsky LJ. Collagen V Expression is Crucial in Regional Development of the Supraspinatus Tendon. *J Orthop Res*. 2016 December; 34(12): 2154–2161. doi:10.1002/jor.23246

110. Smith SM, Zhang G, and Birk DE. Collagen V localizes to pericellular sites during tendon collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol*. 2014 January; 33: 47–53. doi:10.1016/j.matbio.2013.08.003

111. Lulinska-Kuklik E, Rahim M, Domanska-Senderowska D, Ficek K, Michalowska-Sawczyn M, Moska W, Kaczmarczyk M, Brzezianski M, Brzezianska-Lasota E, Cieszczyk P, Alison V. September. Interactions Between COL5A1 Gene

and Risk of the Anterior Cruciate Ligament Rupture. *Journal of Human Kinetics* volume 62/2018, 65-71 DOI: 10.1515/hukin-2017-0177

112. Heffernan SM, Kilduff LP, Erskine RM, Day SH, Stebbings GK, Cook CJ, Raleigh SM, Bennett MA, Wang G, Collins M, Pitsiladis YP and Williams AG. COL5A1 gene variants previously associated with reduced soft tissue injury risk are associated with elite athlete status in rugby. *BMC Genomics* 2017, 18(Suppl 8):820 DOI 10.1186/s12864-017-4187-3

113. Altinisik J, Meric G, Erduran M, Ates O, Ulusal AE, and Akseki D. The BstUI and DpnII Variants of the COL5A1 Gene Are Associated with Tennis Elbow. *The American Journal of Sports Medicine*, Vol.43, No.7 DOI: 10.1177/0363546515578661 2015

114. Bulmanski Z, Brady M, Stoute D, Lallier TE Cigarette smoke extract induces select matrix metalloproteinases and integrin expression in periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 83:787-96 doi:10.1902/jop.2011.110395

115. Karunaratne A, Xi L, Bentley L, Sykes D, Boyde A, Esapa CT, et al. Multiscale alterations in bone matrix quality increased fragility in steroid induced osteoporosis. *Bone*. The Authors. 2016;84(C): 15–24

116. Daftari TK, Whitesides TE, Jr., Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC (1994) Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)* 19:904-11

117. Hu K, Olsen BR Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev Dyn* 246:227-334 doi:10.1002/dvdy.24463

118. Wang T, Zhang X, Bikle DD Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol* 232:913-21 doi:10.1002/jcp.25641

119. Luo Y, Zheng SG Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and it's Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol* 7:604 doi:10.3389/fimmu.2016.00604

## **Apêndice I**

**Title:** Smoking increases collagen V and worsens mineralization in a model of tibial fracture

Smoking lowers bone mineralization density and increases the synthesis of collagen V in tibial fracture model

**Running Title:** Smoking increases collagen V in bone matrix

**Authors:** Alexandre Póvoa Barbosa<sup>1</sup>, Juliana Dias Lourenço<sup>2</sup>, Jader Joel Machado Junqueira<sup>2</sup>, Larissa Emídio de França Silva<sup>2</sup>, Janaina S. Martins<sup>3</sup>, Manoel Carneiro Oliveira Junior<sup>4</sup>, Isadora Begalli<sup>1</sup>, Ana Paula Pereira Velosa<sup>1</sup>, Clarice Rosa Olivo<sup>2</sup>, Thiago Bernardes Bastos<sup>1</sup>, Vanda Jorgetti<sup>3</sup>, Rodolfo de Paula Vieira<sup>5</sup>, Walcy Rosolia Teodoro<sup>1</sup>, Fernanda D. T. Q. S. Lopes<sup>2</sup>.

**Affiliations:**

1. Rheumatology Division (LIM-17), School of Medicine, University of São Paulo, Sao Paulo, SP, Brasil.
2. Department of Medicine, Laboratory of Experimental Therapeutics (LIM-20), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
3. Department of Medicine, Laboratory of Renal Physiopathology (LIM-16), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
4. Nove de Julho University (UNINOVE), Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI), São Paulo, SP, Brasil.
5. Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), School of Medical Sciences of São José dos Campos Humanitas and Universidade Brasil, São José dos Campos, SP, Brasil.

**Address for Correspondence:**

Alexandre Povoá Barbosa ORCID: 0000-0002-1132-1032

[ortopedia\\_barbosa@yahoo.com.br](mailto:ortopedia_barbosa@yahoo.com.br); [ortopediabarbosa@gmail.com](mailto:ortopediabarbosa@gmail.com)

Fernanda Degobbi T. Q. S. Lopes ORCID: 0000-0002-6402-3055

[fernandadtqsl@gmail.com](mailto:fernandadtqsl@gmail.com)

JD Lourenço: [juliana.dl31@gmail.com](mailto:juliana.dl31@gmail.com)

JJM Junqueira: [jader\\_junqueira@yahoo.com.br](mailto:jader_junqueira@yahoo.com.br)

LEF Silva: [larissa\\_emidio@hotmail.com](mailto:larissa_emidio@hotmail.com)

JS Martins: [janainamartins@usp.br](mailto:janainamartins@usp.br)

MC Oliveira Junior: [manoeljunior@hotmail.com](mailto:manoeljunior@hotmail.com)

I Begalli: [isa\\_begalli@hotmail.com](mailto:isa_begalli@hotmail.com)

APP Velosa: [apvelosa@gmail.com](mailto:apvelosa@gmail.com)

CR Olivo: [clariceolivo@gmail.com](mailto:clariceolivo@gmail.com)

TB Bastos: [thiago.bernardes.bastos@gmail.com](mailto:thiago.bernardes.bastos@gmail.com)

V Jorgetti: [vandajor@usp.br](mailto:vandajor@usp.br)

RP Vieira: [rodrelena@yahoo.com.br](mailto:rodrelena@yahoo.com.br)

WR Teodoro: [walcyteodoro@terra.com.br](mailto:walcyteodoro@terra.com.br)

**Abstract:**

**Background:** We aimed to verify the effects of cigarette smoke exposure on bone healing in a tibia fracture mice model. **Methods:** Mice were assigned to four groups according to exposure and surgery: C room air; F room air and tibia osteotomy; CS cigarette smoke; FCS cigarette smoke and tibia osteotomy. **Results:** Histomorphometry analysis revealed that cigarette smoke exposure significantly reduced the thickness of bone trabeculae associated with decrease in mineralizing surface and mineral apposition rate, reflecting in lower bone formation rate and longer mineralization time. Resorption surface and osteoclastic surface were greater in the CS group, indicating an increase in the resorptive action induced by cigarette smoke. There was a decrease in type I collagen deposition in the CS and FCS groups compared to C group and an increase in type V collagen in the CS, FC and FSC groups compared to C group. The cytokine expression evaluation demonstrated that CS exposure induced a decrease in bone forming cytokines and an increase in inflammatory associated cytokines, and these changes were intensified under fracture conditions. Collagen I gene expressions were reduced in the CS and FCS groups compared to C group. Collagen V  $\alpha 1$  gene expression was increased in CS and F groups, while Collagen V  $\alpha 2$  gene expression was increased only in fracture groups. **Conclusion:** Cigarette smoke exposure alters the bone matrix composition and worsens bone mineralization, leading to bone fragility through increased collagen V synthesis and deposition and impaired collagen I fibril formation and assembly.

**Keywords:**

Smoking, Collagen, Fracture Healing, Bone Remodeling.

**Background:**

Smoking continues to be the leading global cause of preventable deaths; it kills approximately 6 million people and causes more than half a trillion dollars of economic damage each year [1]. Despite annual declines in smoking prevalence, the number of people who smoke has risen due to population growth [2]. In 2013, 21% of adults worldwide (1.1 billion people) were current smokers [1].

The decrease in human longevity that is caused by smoking has been attributed mainly to cancer [3], chronic obstructive pulmonary disease [4], and atherosclerotic disease [5]. The latter remains the major cause of death worldwide, largely associated with heart attack and stroke. Additionally, several authors have shown the influence of smoking in the impairment of bone tissue remodeling, which compromises the integrity of the adult skeleton and mineral homeostasis [6-9].

The structural components of bone consist of the extracellular matrix (organic and inorganic) and cells. The organic components include collagen fibers, proteoglycans, matrix proteins, cytokines and growth factors. Collagen type I is the most prevalent matrix protein of bone, representing approximately 90% of the organic components [10]. Although it accounts for less than 3% of the total collagen, collagen type V is an important organic component in the bone matrix. It is classified as a regulatory fibril-forming collagen and regulates the fibrillogenesis of collagen types I and III [11]. The triple helix portion of the collagen V molecule is hidden within these fibrils, with the amino terminal globular domain (-NH<sub>3</sub>) oriented toward the surface [12,13]. This globular domain regulates fibrillary growth, physically preventing new collagen I monomers from attaching to fibrils. Due to this characteristic, collagen V has an important role in the organization, lengthening and widening of heterotypic fibrils and is currently considered the nucleator of type I collagen fibrillogenesis [14].

Previous studies demonstrated *in vitro* these collagen subtypes fibril interactions [12, 14]. Isolated collagen I typically forms fibrils with several different diameters. When collagen V was added the mean diameter decreased proportionally. This effect only occurs with the integrity of the (NH<sub>2</sub>) amino domain of collagen V demonstrating that this interaction is an important mechanism controlling collagen fibril dimensions.

Experimental and *in vitro* studies showed that smoking has the potential to act on bone remodeling, inducing the loss of bone [15]; reductions in bone length, weight and mineral density [16]; the promotion of osteoclastogenesis; and the inhibition of osteoblastogenesis [17]. Additionally, some authors demonstrated that the fibroblasts of periodontal ligaments exposed to cigarette smoke extract exhibited increased synthesis of

collagen from fine fibers, such as collagen types III and V, which is implicated in the loss of teeth in smoking patients [18]. However, the understanding of the effect of smoking on bone matrix collagen fibrillogenesis is still unclear.

Regarding bone remodeling and homeostasis, smoking has been shown to have a negative impact on delaying the healing of fractures and increasing the risk of nonunion [19,20]. Fracture healing comprises a cascade of the synthesis of matrix proteins to restore the bone composition at the fracture site and involves the increased release of cytokines and growth factors. The reactive organic radicals contained in cigarette smoke could interfere in this fracture healing process by cell toxicity and inflammatory process induction that are mediated by cytokines released into the circulatory system [21,22].

Although many studies have demonstrated the deleterious effects of smoking in bone remodeling and fracture healing, the exact mechanism that explains the impact of smoke on bone metabolism is not yet fully understood.

### **Objectives:**

Since type V collagen has regulatory characteristics and its metabolism is regulated by growth factors that can be affected by cigarette smoking, a possible relationship between the effects of cigarette smoking and type V collagen-induced bone remodeling and fracture healing may exist. To our knowledge, no previous study has focused on the effects of cigarette smoke on changes in the bone matrix, inflammatory response and cellular constitution.

The present study aimed to verify the effects of cigarette smoke exposure on bone healing in an experimental tibial fracture model, evaluating the process of mineralization, the differentiation of bone cells and the establishment of the bone fibrillary matrix. We hypothesized that cigarette smoke exposition can alter the bone matrix fibrillar composition leading to an incomplete mineralization and consequent fragility.

### **Methods:**

#### **Ethics Statement**

C57BL/6 male mice (6-8 weeks old) were provided by the Central Animal Facility of the School of Medicine of the University of São Paulo. All animals received human care in compliance with the Guide for

the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council Committee publication, updated in 2011). This study was approved by the Review Board for human and animal studies from the University of São Paulo School of Medicine (Project Number 022/14).

The mice were randomly assigned into four groups: the Control Group (C) animals were exposed to room air (n=29); the Fracture Group (F) animals were exposed to room air and submitted to right tibia surgical osteotomy fifteen days before euthanasia (n=23); the Cigarette Smoke Group (CS) animals were exposed to cigarette smoke for 45 days (n=29); and the Fracture Cigarette Smoke Group (FCS) animals were exposed to cigarette smoke for 45 days and submitted to right tibia surgical osteotomy fifteen days before euthanasia (n=23). All mice had free access to food and water.

Mice from each group were randomly selected for four evaluations as described below.

- A.** Bone Mineral Matrix Evaluation: 12 mice (6 from the C group and 6 from the CS group);
- B.** Bone Fibrillar Matrix Evaluation: 48 mice (12/group);
- C.** Cytokine and Growth Factor Expression Evaluation: 24 mice (6/group); and
- D.** COL5A1/COL5A2 Gene Expression Evaluation: 20 mice (5/group).

#### **A. Bone Mineral Matrix Evaluation:**

To study the effects of cigarette smoke exposure on bone metabolism, animals were randomly divided into two experimental groups. The control group (C) was composed of animals exposed to room air that received an intraperitoneal dose of oxytetracycline (20 mg/kg) at days 35 and 42 of the experiment. The cigarette smoke group (CS) was composed of animals that were exposed to CS for 45 days for 30 minutes/day 5 days/week and received an intraperitoneal dose of oxytetracycline (20 mg/kg) at days 35 and 42 of the experiment (Figure 1a).

#### *Histomorphometric Measurements:*

All histomorphometric parameter measurements were performed at random points in the metaphyseal region located 5 mm from the lowest point of the growth plate and 1 mm from the lateral cortex, excluding the cortical bone [23]. The selected area is the secondary spongiosa area, which is rich in trabecular bone. All parameters and indexes were measured according to the *American Society of Bone Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee* [24].

The right tibiae were surgically extracted, cleared of soft tissue, immersed in 70% ethanol and processed as previously described [23]. Tissue cuts were made with a tungsten carbide knife (Leica, Heidelberg, Germany) creating 5  $\mu\text{m}$  thick sections. The sections were stained with 0.1% toluidine blue, pH 6.4, and coverslips with Entellan H mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany). Dynamic, structural and static bone formation and resorption parameters were measured at the proximal metaphyses of a total of 30 fields using the software OsteoMeasure (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, USA), specific for bone histomorphometry. The ratio of trabecular bone volume to total bone volume (BV/TV) and the osteoid thickness (O.Th) represents the static and structural histomorphometric indexes. We also determined the osteoblastic surface (Ob.S/BS) and the osteoclastic surface (Oc.S/BS) per tissue area, the trabecular separation (Tb.Sp), the trabecular number (Tb.N) and the trabecular thickness (Tb.Th). The percentage of the total trabecular surface was used to express the areas of eroded surface (ES/BS) and osteoid surface (OS/BS). The mineral apposition rate (MAR) was determined measuring the distance between the two oxytetracycline in relation with the time interval between the two oxytetracycline doses. The mineralizing surface (MS/BS) is the proportion of cancellous surface that has been mineralized was calculated as the double-labeled surface plus one-half of the single-labeled surface. The mineralization lag time (MLT) is the time interval between the deposition and mineralization of any volume of the matrix as detected by oxytetracycline staining. The bone formation rate (BFR/BS) is the volume of mineralized bone formed per unit time was obtained as the product of the mineral apposition rate and the mineralizing surface. All data were obtained in a blinded fashion.

## **B. Bone Fibrillar Matrix Evaluation:**

### *Histological Bone Preparations:*

The tibiae were decalcified in EDTA solution and then embedded in paraffin, and 3- to 4- $\mu\text{m}$  sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and picosirius red to evaluate the total collagen amount with polarized light using an Olympus BX-51 microscope (Center Valley, Pennsylvania) [25].

### *Immunofluorescence of collagen types I and V:*

To perform type I and V collagen (Col I and Col V, respectively) immunostaining, 4  $\mu\text{m}$  thick tibiae slices from the C, FC, CS and FCS groups were mounted on slides with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dewaxed in xylol and hydrated in graded ethanol. Antigen retrieval was

accomplished using enzymatic treatment with pepsin from 8 mg/mL porcine gastric mucosa (10,000 dry units/mL; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) in 0.5 M acetic acid buffer for 30 minutes at 37°C. For immunodetection of Col I and Col V, the nonspecific sites were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. Afterwards, the samples were incubated overnight at 4°C with antihuman Col I (1:30; Rockland, Limerick, PA, USA) and antihuman Col V (1:40) rabbit polyclonal antibodies diluted in PBS.

Specimens were washed in PBS with 0.05% Tween 20 and incubated for 60 minutes at room temperature with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluted in PBS containing 0.005% Evans blue. For negative controls, sections were incubated with PBS and normal rabbit serum instead of the specific antibody. Specimen were visualized by immunofluorescence microscopy (Olympus BX51) [25].

#### **C. Cytokine and Growth Factor Expression Evaluation:**

The levels of Interleukin-6 (IL-6) (Biolegend, CA, USA; RUO 430506); Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) (R&D Systems, CA, USA; DY791); Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) (Biolegend, CA, USA; RUO 430906); Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (R&D Systems, CA, USA; DY493); Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) (Biolegend, CA, USA; RUO 432603); and Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) (Biolegend, CA, USA; RUO 432907) were measured in the bone homogenate using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions.

#### **D. COL5A1/COL5A2 Gene Expression Evaluation:**

To analyze the COL5A1 and COL5A2 expression levels in the tibiae of the C, FC, CS and FCS groups, the extracted tibiae were macerated to isolate total RNA according to Trizol® (Invitrogen) RNA isolation protocol. Total RNA was quantified by optical density measurements (Nano Vue Plus® Spectrophotometer; GE). Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) gene expression analysis was done using GAPDH as a housekeeping gene. All reverse transcription reaction mixtures were prepared using Superscript Platinum III One-Step kits (Invitrogen) and performed on a Step One® thermocycler (Applied Biosystems). cDNA synthesis was performed at 50°C for 10 minutes. Then, RT-PCR reactions were performed with the primers.

The sequences of the genes were acquired from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). To assemble the gene map of the chosen sequence, software from the UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) was used.

The RT-PCR conditions were 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute for 35 cycles. The relative expression was calculated based on the control group sample levels using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [26].

### **Cigarette Smoke Exposure**

Cigarette smoke exposure was performed in an inhalation chamber (28 L) with two inlets for synthetic air and smoke supplies as previously described by Toledo *et al.* [27]. Airflow of 2 L/min was maintained inside the chamber, and in the second inlet, the synthetic airflow passed through a Venturi System connected to a lit cigarette that suctioned the smoke into the chamber (Figure 1b). This flow rate produced carbon monoxide (CO) levels ranging from 250 to 350 ppm. The animals were exposed to commercially filtered cigarettes (0.8 mg nicotine, 10 mg tar and 10 mg CO per cigarette), and the carboxyhemoglobin concentration in mice exposed to cigarette smoke was maintained at  $10 \pm 1.3\%$ . Mice allocated to the CS and FCS groups were kept in the chamber and exposed to these CO levels twice a day for 30 minutes per exposure, 5 days per week over 45 days. Animals were exposed to  $12 \pm 1$  cigarettes at each of the 30-minute exposures. The control groups were exposed to room air.

### **Surgical procedure**

All surgical procedures were performed by the first author. Animals were anesthetized with an intraperitoneal administration of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg), accordingly to University of São Paulo Anaesthesia Department Guidelines and a hole was drilled in the right anterior tibial tubercle through patellar tendon insertion using a 30-gauge needle. Intramedullary fixation was administered by inserting an “insect pin” that was cut flush with the tibial tubercle prior to the creation of the fracture. Then, a transverse osteotomy was performed, with modifications from the original description [28], 1 cm distal to the anterior tibial tubercle using sharp scissors. All animals received daily intramuscular doses of tramadol (1.5 mg/kg) and metamizole (20 mg/kg) from the first day after the surgery until day 45.

The surgical extraction of the right tibiae was done after animal euthanasia with intraperitoneal injection of Sodium Tiopental (50mg/kg) and cava vein exsanguination.

### **Statistical analysis**

All data are expressed as the mean and standard error (SE). A statistical analysis was performed using SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), using a two-way ANOVA followed by all possible pairwise multiple comparisons (Holm-Sidak method). A p value  $\leq 0.05$  was considered significant. The analyses were done comparing each group

### **Results:**

As stated previously, mice from each group were randomly selected for evaluations as described.

- A.** Bone Mineral Matrix Evaluation: 12 mice (6 from the C group and 6 from the CS group);
- B.** Bone Fibrillar Matrix Evaluation: 48 mice (12/group);
- C.** Cytokine and Growth Factor Expression Evaluation: 24 mice (6/group); and
- D.** COL5A1/COL5A2 Gene Expression Evaluation: 20 mice (5/group).

After the exposition period no physical or behavioral differences were observed between the animals of the four groups without any adverse events. After analyzing the bone tissues in the different groups (C, CS, F and FCS), we observed some structural pattern changes (Figure 2). The bone tissue of the C group presented a uniform histoarchitecture of bone trabeculae (Figure 2a) and a normal distribution of osteoblasts and osteoclasts as evidenced by a sharp pattern of the osteoblasts and limited presence of osteoclasts in the bone trabeculae (Figure 2b). In contrast, the bone tissue of the CS group presented a reduction in the thickness of the bone trabeculae (Figure 2c) and an increase in the size of the osteoclasts with a clear cytoplasm around the bone trabeculae and evidence of active resorption (Figure 2d). On the other hand, the animals of the FC group showed intense remodeling of the trabeculae (Figure 2e) and an increased number of osteoblastic and osteoclastic cells (Figure 2f). This process was intensified in the FCS group, as evidenced by the intense reduction of the trabeculae (Figure 2g) and increased bone synthesis (Figure 2h).

### **A. Histomorphometric and morphological analysis of the bone mineral matrix**

Regarding the bone structure variables, despite the lower ratio of trabecular bone volume to total bone volume in the CS animals, no statistical significance was found due to large variation among animals (BV/TV:  $7.59 \times 10.81$ ;  $p=0.093$ )

Analysis of the bone formation variables revealed that, compared to control conditions, cigarette smoke exposure significantly reduced the thickness of bone trabeculae (Tb.Th:  $23.62 \times 30.04$ ;  $p=0.030$ ). The impairment of bone mineralization in these animals was demonstrated by decreased mineralizing surface (MS/BS:  $4.06 \times 10.67$ ;  $p=0.052$ ) and mineral apposition rate (MAR:  $0.33 \times 0.12$ ;  $p=0.0004$ ) compared to those of the control animals, which were reflected in reduced bone formation rate (BFR/BS:  $0.035 \times 0.005$ ;  $p=0.004$ ) and consequently in increased mineralization time (MLT:  $85.80 \times 14.52$ ;  $p<0.020$ ) as compared to controls.

Both the resorption surface (ES/BS:  $5.15 \times 2.74$ ;  $p=0.011$ ) and osteoclastic surface (Oc.S/BS:  $2.98 \times 1.50$ ;  $p=0.036$ ) were greater in the CS group than in the control group, demonstrating the cigarette-induced increase in resorptive action (table 1).

### **B. Histomorphometric and morphological analysis of bone fibrillar matrix**

In Figure 4a, we visualized the collagen fibers in the bone tissue of all evaluated groups (C, CS, FC and FCS) at a high magnification with Picrosirius staining under polarized light. The C group showed bone trabeculae composed predominantly of thick fibers, characterized by the presence of homogeneous red birefringence. In contrast, the CS and FC groups showed bone trabeculae composed of thin fibers, as indicated by green birefringence, and in the FCS group, the collagen fibers presented thick and thin fibers characterized by diffuse red and green birefringence. Our histomorphometric data showed a trend toward increased total collagen in the CS, FC and FCS groups as compared to that in the C group. However, we did not observe significant differences between these groups.

The immunofluorescence staining for type I collagen (Figure 4b) demonstrated a uniform rectilinear pattern in the bone trabeculae and a significant decrease in the CS group, F group and FCS group compared to the C group ( $p<0.001$ ). We also found a less collagen type I staining in the FCS group than in the F group ( $p=0.01$ ).

The analysis of the immunostaining of type V collagen (Figure 4c) showed a more heterogeneous pattern and an intense green birefringence around the vessels that became diffuse along the bone trabeculae in the CS, FC and FCS groups as compared to the pattern in the C group ( $p < 0.0001$ ).

### **C. Cytokine and growth factor expression analysis**

The values of VEGF expression showed a significant decrease in the CS, FC and FCS groups compared to the level in the C Group ( $p < 0.001$ ), and the FCS group also showed a significant decrease in VEGF compared to the CS and FC groups ( $p = 0.047$ ). There was a significant increase in IL-6 expression in the groups exposed to cigarette smoke (CS and FCS) compared to that in the control groups (C and FC) ( $p < 0.001$ ). The expression of IGF-1 was significantly lower in the groups exposed to cigarette smoke (CS and FCS) than in the control groups (C and FC) ( $p < 0.001$ ). For IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression, we found a trend toward lower expression without statistical significance (Figure 6).

### **D. COL1A1 and COL1A2 gene expression analysis**

We found a significant decrease in COL1A1 tissue expression in CS ( $p = 0.008$ ) and FCS ( $p < 0.05$ ) compared to C group (Figure 5 a). The analyses of the COL2A2 chain found similar results with significant decrease in gene expression in CS, F and FCS compared with C group ( $p < 0.005$ ) (Figure 5 b).

### **E. COL5A1 and COL5A2 gene expression analysis**

The gene expression of type V collagen chains in the bone tissue showed COL5A1 gene (Figure 5 c) had increased expression in the CS, FC and FCS groups compared to that in the C group ( $p < 0.05$ ), and it had a higher expression in the FCS than in the CS group ( $p < 0.005$ ). In addition, there was increased expression of the COL5A2 gene (Figure 5d) in the FC and FCS groups compared to the levels in the C group ( $p < 0.0001$ ).

### **Discussion:**

In this study, we showed that cigarette smoke exposure decreases IGF and VEGF expression and increases IL-6 expression, which induces impaired bone mineralization, increases the deposition of collagen V and decreases the expression and deposition of collagen I in the bone matrix. Additionally, bone matrix

remodeling is more marked when the cigarette smoke exposure is associated with an experimental tibial fracture.

Bone remodeling is a complex process by which mature tissue is, through normal physiological processes, continuously replaced by new tissue. This process involves coordinated cellular and molecular events in which bone is reabsorbed and formed, allowing for the maintenance of shape, response to functional demands and healing of bone fractures [29]. Considering the bone remodeling stages, in our study, we verified a deleterious effect of CS exposure through a more intense osteoclastic activation that impairs bone mineral density. All of the parameters related to bone resorption in the CS group reflected increased osteoclastic proliferation and activation. Through histomorphometric analysis of the bone mineral matrix, we verified that CS exposure induced an increase in osteoclastogenesis (resorptive variables) with an increase in the osteoclastic surface (Oc.S/BS,  $p=0.036$ ) and the eroded surface (ES/BS,  $p=0.011$ ). An inhibition of osteoblastogenesis (formative variables) was also verified by the reduced thickness of bone trabeculae, the decreased mineralizing surface and bone formation rate and the increased time required to conclude matrix mineralization.

Histological findings showed that the bone samples from fracture groups demonstrated intense remodeling of the trabeculae and an increased number of osteoblastic and osteoclastic cells and that the CS exposure decreased this response, with a significant reduction of the trabeculae area and bone synthesis. In fact, as stated previously [30], nicotine has a dose-dependent paradoxical effect in osteoblasts; at low doses, nicotine stimulated osteoblast proliferation, and at high doses, nicotine exerted toxic effects on these same bone-forming cells [31,32]. Thus, our results are in agreement with these findings since we observed higher values for the surface of both osteoclasts and osteoblasts in the CS groups.

Regarding the effects of cigarette smoke exposure and fractures on cytokines, we verified a reduction in VEGF and IGF-1 expression with cigarette smoke exposure and fracture compared to that with cigarette smoke exposure alone ( $p<0.001$ ). It is well established that VEGF is a cytokine with notable importance in the promotion of neovascularization (angiogenesis), which is necessary for bone regeneration (osteogenesis) in a fracture site [33,34,35]. VEGF also has direct effects on osteoblast and osteoclast differentiation and function [36]. IGF-1 is the single most abundant growth factor present in the bone matrix and is considered to potently stimulate osteoblast proliferation, activation and cell lifespan. IGF-1 is considered a major growth-promoting signal in vertebrate skeletal development [37]. Considering these functions, the decrease in VEGF and IGF-1

expression that was observed in our study was most likely associated with the reduction of the formative histomorphometric variables ( $p < 0.05$ : Tb.Th; MAR; MS/BS; MLT and BFR/BS) and interfered with the subsequent collagen subtype deposition.

On the other hand, increased IL-6 expression ( $p < 0.001$ ) was found in the cigarette smoke and fracture exposure group compared with the cigarette smoke alone group. As stated, proinflammatory cytokines are regulators of host responses to infection, inflammation and trauma. These cytokines include IL-1, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  and IL-6. Notably, IL-6 stimulates osteoclast formation [38]. In our study, we believe that the increased expression of the resorptive histomorphometric variables observed in the CS groups could be explained by IL-6 overexpression. Furthermore, some studies reported that the bone reabsorption effects of IL-6 are interconnected with those of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , demonstrating that the increase in IL-6 expression induces a subsequent increase in IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels [39]. In our study, we quantified IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels at a time point before these cytokine feedback mechanisms could be observed.

TGF- $\beta$ , the most studied anabolic bone cytokine, has been suggested to be a potent osteoblast inducer. Lower TGF- $\beta$  expression levels were observed in the FCS group than in the other groups, though this difference was not statistically significant. This decrease in TGF- $\beta$  was likely associated with a decrease in osteoblast activity, explaining the reduced capacity of the bone to compensate for the increased osteoclast function.

Furthermore, the pathophysiological mechanisms involved in CS exposure can result in increased bone fracture risk by two processes: through bone mineral density-dependent factors and through direct effects that are independent of bone mineral density, such as collagen synthesis and growth factor expression (40). In our study, we verified that CS exposure resulted in the maintenance of inflammatory conditions and, consequently, the release of cytokines, which compromised bone mineralization and altered the collagen types of animals compared with normal conditions, even in the absence of traumatic disruption. Notably, the presence of a tibial fracture with CS exposure increased the severity of bone damage in our study. Importantly, after a bone fracture, the healing process includes three major phases: the early reactive (inflammatory), reparative (callus formation) and late remodeling phases. Furthermore, smoking has been shown to have a negative impact on bone-forming cells, delaying fracture repair and increasing the risk of nonunion [31]. At the reparative phase, fibroblasts begin to deposit a stroma that helps to support vascular ingrowth. In this phase, the presence of nicotine could inhibit this capillary ingrowth [30] and compromise the next stage of remodeling the matrix components. Additionally,

these three bone healing stages do not occur independently and could be concomitant [32]. When an effective vascular ingrowth occurs, the collagen matrix could be deposited while the osteoid is secreted and subsequently mineralized, leading to the formation first of the soft callus that ultimately will transform to the remodeled bone. Bone reparation occurs slowly over months or years.

Concerning the bone fibrillary architecture, it is well established that type I collagen constitutes the framework of the fibrillary matrix, while type V composes only 2 to 5% of the total collagen and is found copolymerized with types I and III collagen to form heterotypic fibrils. The triple helical portion of the collagen V molecule is hidden within these fibrils, with the amino terminal globular domain (-NH<sub>3</sub>) projected toward the surface [12,13]. This globular domain regulates fibrillar growth, physically preventing new monomers from attaching to fibrils. Due to this characteristic, collagen V has important functions in the organization, lengthening and widening of the heterotypic fibrils and is considered the nucleator of type I collagen fibrillogenesis [41]. Regarding the bone fibrillary matrix, although we were not able to detect statistically significant differences in the proportion of total collagen among the groups, we found that exposure to cigarette smoke impaired collagen I expression and deposition and was associated with a marked increase in type V collagen expression. These findings were more striking when the bone was analyzed under more extreme conditions, such as the coexposure of CS and tibial fracture, suggesting a cumulative effect of both smoking and bone fracture ( $p < 0.0001$ ). These findings corroborated with the decrease in COL1A1 and COL1A2 gene expression and the increase in COL5A1 and COL5A2 gene expression by concomitant CS exposure and bone fracture. Interestingly, CS exposure alone induced an increase in type V collagen, which could be associated with the inflammatory process that follows smoking exposure. Thus, we can propose that the imbalance in the collagen types I and V in bone matrix remodeling of the groups exposed to CS could downregulate fibrillogenesis by two mechanisms. First, the decrease in type I collagen can directly affect the fragility of the bone matrix constitution, leading to bone weakness. Furthermore, considering that the main function of collagen V is to regulate the diameter of heterotypic fibrils [11,12,13,14], the increase in this collagen can predispose the deposited collagen heterotrimer fibers to have smaller diameters. In summary, in both hypotheses, the bone fibrillary matrix can be compromised, which is likely affected more by the CS exposure combined with fracture of the tibia. Conversely, in another study, COL5A1 mRNA expression was high during the proliferation and differentiation phases and low during the mineralization phase of bone development, and it was upregulated by

TGF- $\beta$  during osteogenesis of MC3T3-E1 cells and in the long bone development of the E17.5 mouse embryo [42]. In our study, we did not find a relationship among TGF- $\beta$ , COL5A1 and collagen V expression in the bone tissue of the CS and fracture groups. We believe that the increased expression of collagen V in CS groups is likely related to the time the animals were exposed to cigarette smoke or to another unknown factor associated with smoking exposure.

We strongly believe in the value of animal models in this kind of study design even though we could improve our performance using lesser animals, like using the left tibia as the control I the fracture groups, but we decided for a separate group of animals in order to make the groups more similar, using the same side for analyses. The skeleton in rats and humans responded similarly to mechanical influences, hormones, and other agents.

Previous publications in experimental field and clinical studies demonstrated that female subjects are more prone to alterations in bone density and architecture. A significant drawback in our study was the fact that we only utilized male mice due to our Central Animal Facility availability. A future study can involve male and female subjects in order to better understand the negative effects of cigarette smoke in bone metabolism improving translational interpretation.

Another limitation is that our model only exposed the subjects to smoke aspirated through the filter to the exposure chamber. Human smokers inhale tobacco not only from filter tip of the cigarette but also breathe the sidestream smoke released into the air from the burning end. The toxicity in human smokers can be even worse that we found in our study.

### **Conclusion:**

The altered proportion of the collagen types in the bone is likely the main mechanism that explains the increased bone fragility, specifically when considering the fracture repair environment. Certainly, these inflammatory and structural conditions impair the bone matrix healing and secondary mineralization processes, compromising the quality and integrity of new bone tissue.

We are continuing the investigation of bone alterations following a longer period of cigarette smoke exposure and a comparison with exposure cessation. We hope that the results and determination of the mechanism involved will help improve our knowledge of bone mineral metabolism and optimize current and

future clinical treatments.

## **Declarations**

## **Abbreviations**

1. BV/TV: bone volume
2. O.Th: osteoid thickness;
3. ES/BS: eroded surface;
4. OS/BS: osteoid surface;
5. Ob.S/BS: osteoblastic surface;
6. Oc.S/BS: osteoclastic surface;
7. Tb.Sp: trabecular separation;
8. Tb.N: trabecular number;
9. Tb.Th: trabecular thickness;
10. MAR: mineral apposition rate;
11. MS/BS: mineralizing surface;
12. MLT: mineralization lag time;
13. BFR/BS: bone formation rate;
14. IL-6: Interleukin-6;
15. IGF-1: insuline 1 like growth factor;
16. TNF- $\alpha$ : tumor necrosis fator  $\alpha$ ;
17. VEGF: vascular endothelial growth factor;
18. IL-1 $\beta$ : Interleukin-1  $\beta$ ;
19. TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ;
20. RT-qPCR: reverse time quantitative polymerase chain reaction
21. C Control group
22. CS Cigarette Smoke group
23. F Fracture Group

24. FCS Fracture Cigarette Smoke Group
25. RANKL receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand
26. TRACP tartarate-resistant acid phosphatase

### **Ethics approval and consent to participate**

The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Ethics Committee on Animal use

Ethics Committee on Animal use of the FMUSP E-mail: ceua.fm@usp.br

The Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo, in a session of 26/06/2014, approved the protocol of Research n ° 022/14 entitled: "Smoking increases collagen V and worsens mineralization in a model of tibial fracture" that will use 48 animals of the mouse species, presented by the Department of Clinical Medicine.

It is up to the researcher to elaborate and present to the CEP-FMUSP, the final report on the research, (law procedures for the scientific use of animals-law No. 11,794-October 8, 2008).

Researcher (a) responsible: Walcy Rosolia Teodoro researcher (a) performer: Alexandre Povia Barbosa

Ceua-FMUSP, 26<sup>th</sup> June 2014.

### **Availability of data and material**

All data are available for evaluation if requested.

### **Competing Interests**

All authors have no conflicts of interest regarding this manuscript.

### **Authors contribution**

AP Barbosa performed the study design, performed all experiments, analyzed data, interpreted results of experiments, prepared figures, drafted manuscript, edited and revised manuscript

JD Lourenço performed experiments: Cigarette Smoke exposure protocol

JJM Junqueira Jader performed experiments, edited and revised manuscript

LEF Silva performed experiments and ELISA analysis

JS Martins performed histomophometric analysis

MC Oliveira Junior performed experiments regarding ELISA analysis

I Begalli performed the collagen staining protocol and RT-PCR experiments

APP Velosa analyzed data, interpreted results of experiments, edited and revised manuscript

CR Olivo performed experiments: Cigarette Smoke exposure protocol

TB Bastos performed experiments: Cigarette Smoke exposure protocol and bone surgery

V Jorgetti performed histomophometric analysis, analyzed data and interpreted results of experiments

RP Vieira performed experiments regarding ELISA analysis

WR Teodoro performed the study design, interpreted results of experiments, drafted manuscript, edited and revised manuscript

FDTQS Lopes performed the study design, interpreted results of experiments, drafted manuscript, edited and revised manuscript

### **Consent for publication**

All authors have read and approved manuscript publication.

### **Funding**

Financial support for laboratory input was provided by the University of São Paulo “Instituto dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas – FMUSP”.

The authors didn't receive any kind of financial support for data collection, analyses, interpretation or writing

### **Acknowledgements**

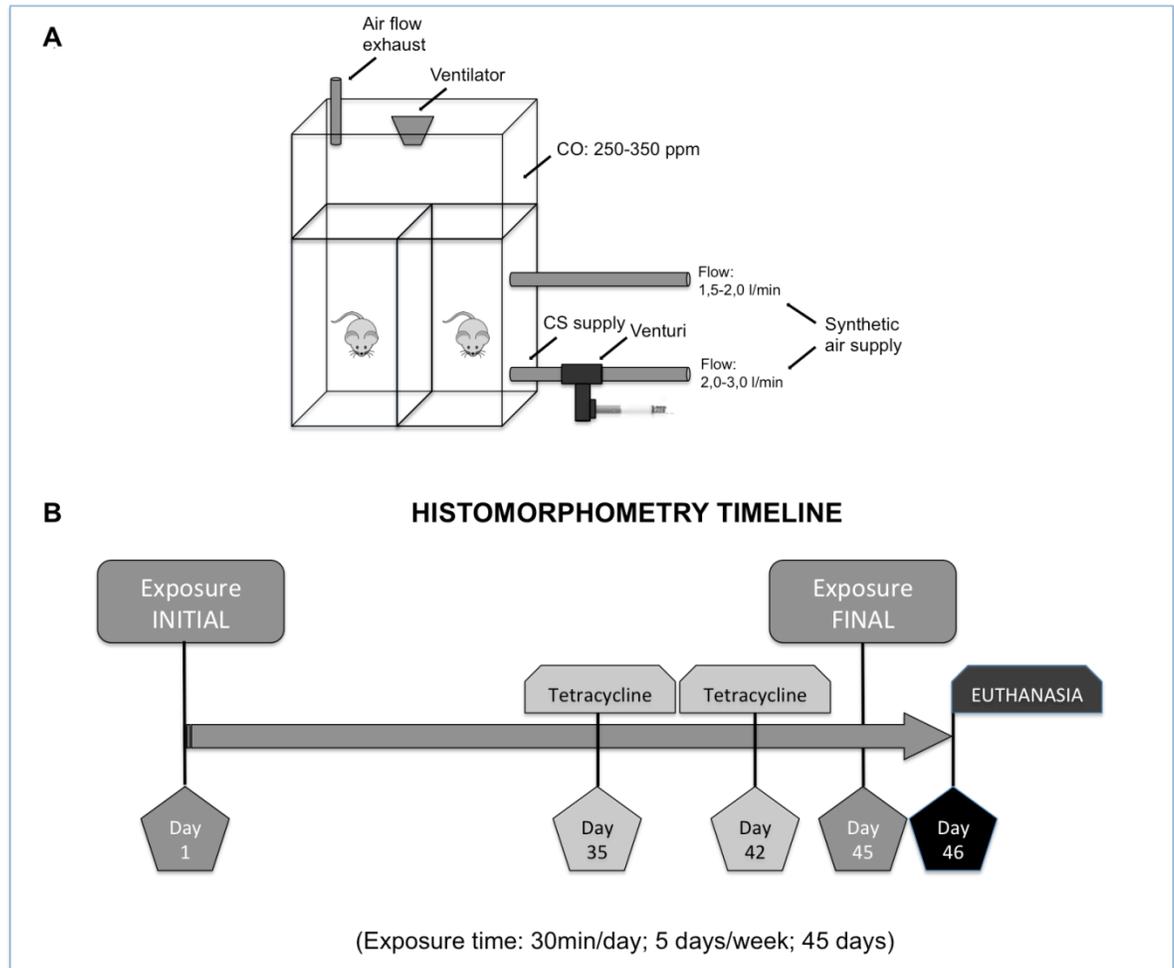
Not Applicable

## References

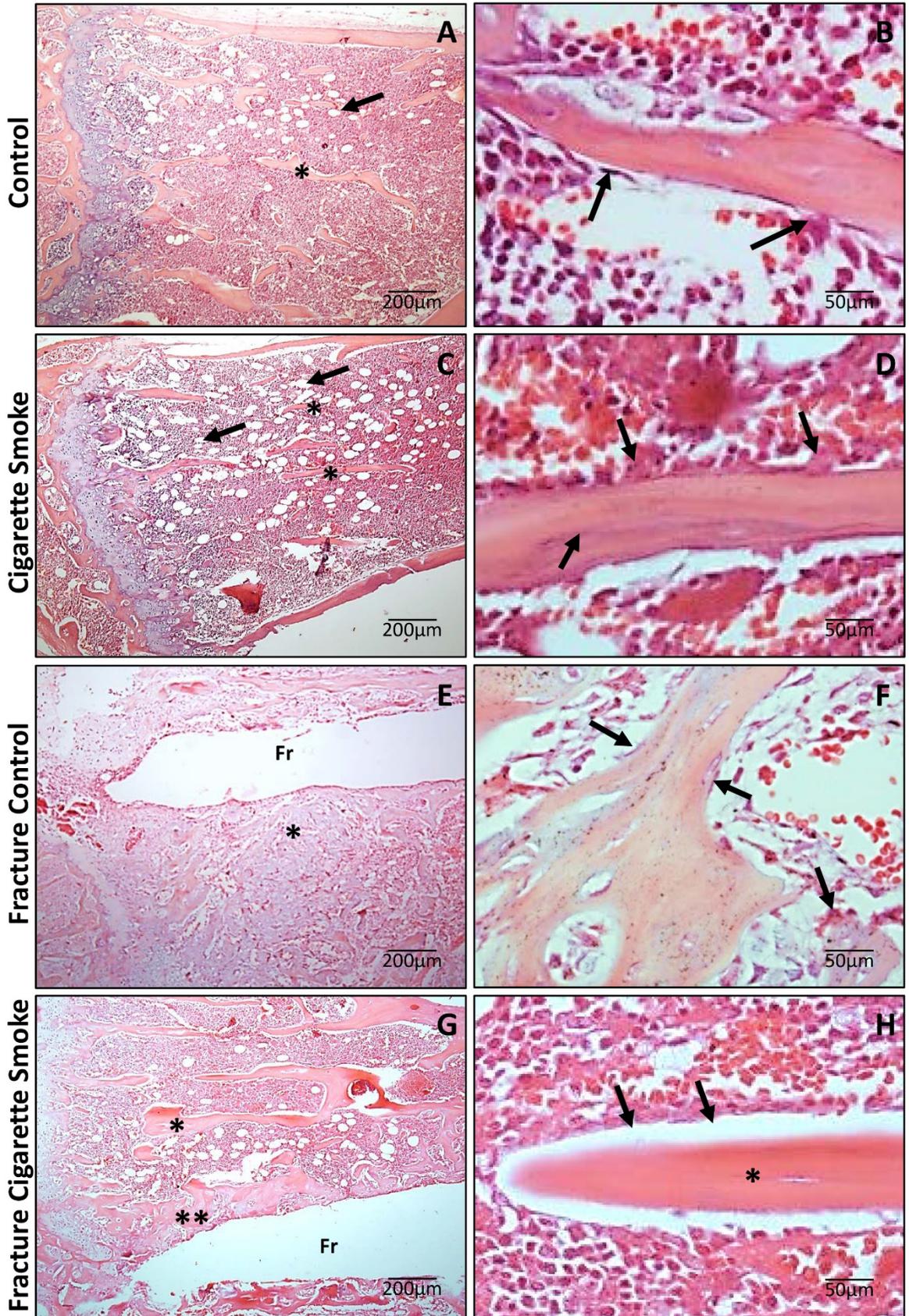
1. WHO global report of tobacco smoking 2015 Organization WH Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. WHO: Geneve, Switzerland, 2015; pp 1-359
2. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, “et al”. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012 (in eng). *JAMA* 311:183-92 doi:1812960 [pii]10.1001/jama.2013.284692
3. Hecht SS (2006) Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms (in eng). *Langenbecks Arch Surg* 391:603-13 doi:10.1007/s00423-006-0111-z
4. Forey BA, Thornton AJ, Lee PN Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence relating smoking to COPD, chronic bronchitis and emphysema. *BMC Pulm Med* 11:36 doi:1471-2466-11-36 [pii]10.1186/1471-2466-11-36
5. Breitling LP Current genetics and epigenetics of smoking/tobacco-related cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:1468-72 doi:ATVBAHA.112.300157 [pii]10.1161/ATVBAHA.112.300157
6. Adams CI, Keating JF, Court-Brown CM (2001). Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury* 32:61-5 doi:S0020-1383(00)00121-2 [pii]
7. Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM (2005) Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma* 19:151-7 doi:00005131-200503000-00001 [pii]
8. Porter SE, Hanley EN, Jr. (2001) The musculoskeletal effects of smoking. *J Am Acad Orthop Surg* 9:9-17
9. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285:25103-8 doi:R109.041087 [pii]10.1074/jbc.R109.041087
10. Feng X (2009) Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol* 3:189-96 doi:10.2174/187231309788166398
11. Birk DE, Bruckner P (2011) Collagens, suprastructures and collagen fibril assembly. In: Mecaum RP, editor. *The extracellular matrix: An overview*. Springer-Verlag 1:77–115
12. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF (1990) Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 95 ( Pt 4):649-57
13. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, Birk DE (1993) Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 121:1181-9
14. Adachi E, Hayashi T (1986) In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen (in eng). *Connect Tissue Res* 14:257-66
15. Broulik PD, Jarab J (1993) The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice (in eng). *Horm Metab Res* 25:219-21 doi:10.1055/s-2007-1002080
16. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, “et al” (2003). Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol* 74:1440-6 doi:10.1902/jop.2003.74.10.1440
17. Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone JE, 3rd, Dziak R (2006) Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 17:121-7
18. Bulmanski Z, Brady M, Stoute D, Lallier TE Cigarette smoke extract induces select matrix metalloproteinases and integrin expression in periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 83:787-96 doi:10.1902/jop.2011.110395
19. Chen F, Osterman AL, Mahony K (2001) Smoking and bony union after ulna-shortening osteotomy. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 30:486-9
20. Little CP, Burston BJ, Hopkinson-Woolley J, Burge P (2006) Failure of surgery for scaphoid non-union is associated with smoking. *J Hand Surg Br* 31:252-5 doi:S0266-7681(05)00409-2 [pii]10.1016/j.jhsb.2005.12.010

21. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:S7-21
22. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19:459-66 doi:S1084-9521(08)00043-8 [pii]10.1016/j.semcd.2008.07.004
23. Difford J (1974) A simplified method for the preparation of methyl methacrylate embedding medium for undecalcified bone. *Med Lab Technol* 31:79-81
24. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, "et al". Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28:2-17 doi:10.1002/jbmr.1805
25. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, "et al" (2004) Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract* 200:681-91 doi:S0344-0338(04)00135-9 [pii]10.1016/j.prp.2004.05.007
26. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8 doi:10.1006/meth.2001.1262S1046-2023(01)91262-9 [pii]
27. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, "et al". Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J* 39:254-64 doi:09031936.00003411 [pii]10.1183/09031936.00003411
28. El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ (2006) Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res* 24:2150-8 doi:10.1002/jor.20263
29. Hadjidakis DJ, Androulakis, II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-96 doi:1092/1/385 [pii]10.1196/annals.1365.035
30. Daftari TK, Whitesides TE, Jr., Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC (1994) Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)* 19:904-11
31. Kallala R, Barrow J, Graham SM, Kanakaris N, Giannoudis PV The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin Drug Saf* 12:209-33 doi:10.1517/14740338.2013.770471
32. Bishop RC, Moore KA, Hadley MN (1996) Anterior cervical interbody fusion using autogeneic and allogeneic bone graft substrate: a prospective comparative analysis. *J Neurosurg* 85:206-10 doi:10.3171/jns.1996.85.2.0206
33. Young MF (2003) Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3:S35-42 doi:10.1007/s00198-002-1342-7
34. Mak KM, Png CY, Lee DJ Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat Rec (Hoboken)* 299:613-29 doi:10.1002/ar.23330
35. Li B, Wang H, Qiu G, Su X, Wu Z Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions. *Biomed Res Int* 2016:2869572 doi:10.1155/2016/2869572
36. Hu K, Olsen BR Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev Dyn* 246:227-34 doi:10.1002/dvdy.24463
37. Wang T, Zhang X, Bikle DD Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol* 232:913-21 doi:10.1002/jcp.25641
38. Luo Y, Zheng SG Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol* 7:604 doi:10.3389/fimmu.2016.00604
39. Yavropoulou MP, Yovos JG (2008) Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8:204-16
40. Yoon & N. M. Maalouf & K. Sakhaee, *Osteoporos Int* (2012) 23:2081–2092
41. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(1): a004978
42. Kahai S, Vary CPH, Gao Y, Seth A. Collagen, type V,  $\alpha 1$  (COL5A1) is regulated by TGF- $\beta$  in osteoblasts. *Matrix Biology*, Vol 23 Issue 7 2004; 445-455 doi.org/10.1016/j.matbio.2004.09.004

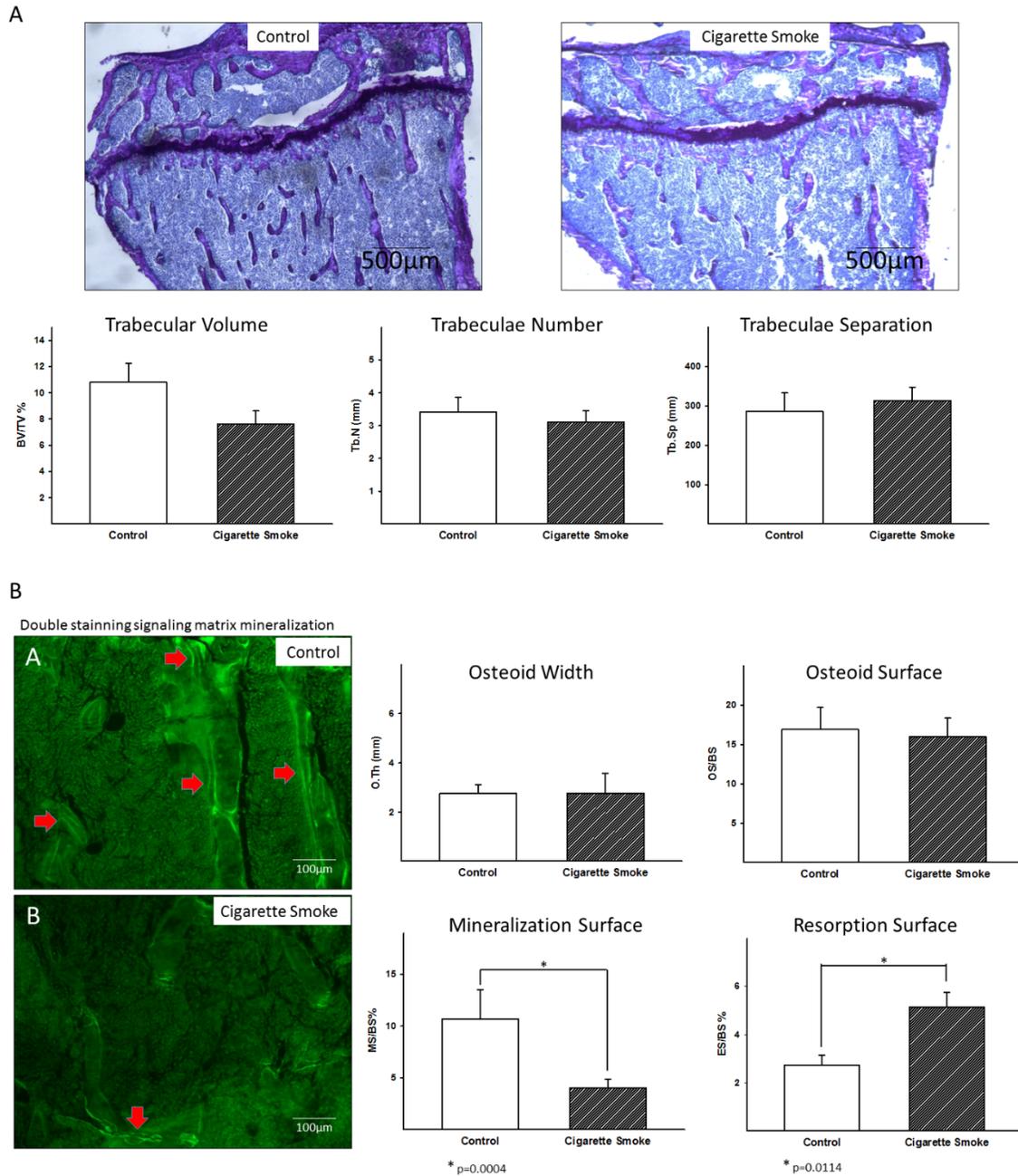
## Figure Legends



**Fig. 1** (a) The timeline of the histomorphometry protocol: Animals were maintained in this 28 L plastic box for 30 minutes a day, 5 days a week for 45 days. Tetracycline was injected intraperitoneally on days 35 and 42 prior to the euthanasia; (b) Schematic representation of the smoke exposure chamber. This image was provided by the authors.



**Fig. 2** (a-h) The panel shows photomicrographs of the proximal tibiae of all groups evaluated at low and high magnification after H&E staining. In (a) and (b), the uniform histoarchitecture and the normal distribution of the osteoblast and osteoclasts are noted. In (c), the CS group exhibited a reduction in the thickness of the bone trabeculae. In (d), the increase in osteoclasts with clear cytoplasm of these cells around the bone trabeculae and evidence of reabsorption are shown. (e) The animals of the FC group showed intense remodeling of the trabeculae and (f) increased osteoblast and osteoclast cells. (g) The FCS group showed intense reduction of the trabeculae and increased bone synthesis (h)



**Fig.3** (a) The panel shows photomicrographs of the proximal tibia of C and CS groups at low magnification after toluidine blue staining. The CS group showed a tendency of lower trabecular volume, number and a higher separation between the trabeculae (NS). The results are illustrated by the graphics below. (b) The panel shows photomicrographs of the proximal tibia of C and CS groups at high magnification after tetracycline staining. (A) C group showed a higher incidence of double staining demonstrating the presence of

osteoid deposition and mineralization (red arrows) (B) CS group have shown limited presence of tetracycline staining with almost null evidence of double staining. The graphic illustration showed a significant decrease in the Mineralization Surface in CS group compared with C ( $p=0.0004$ ) and increased Resorption Surface in the CS group ( $p=0.0114$ ). (NS=not significant).

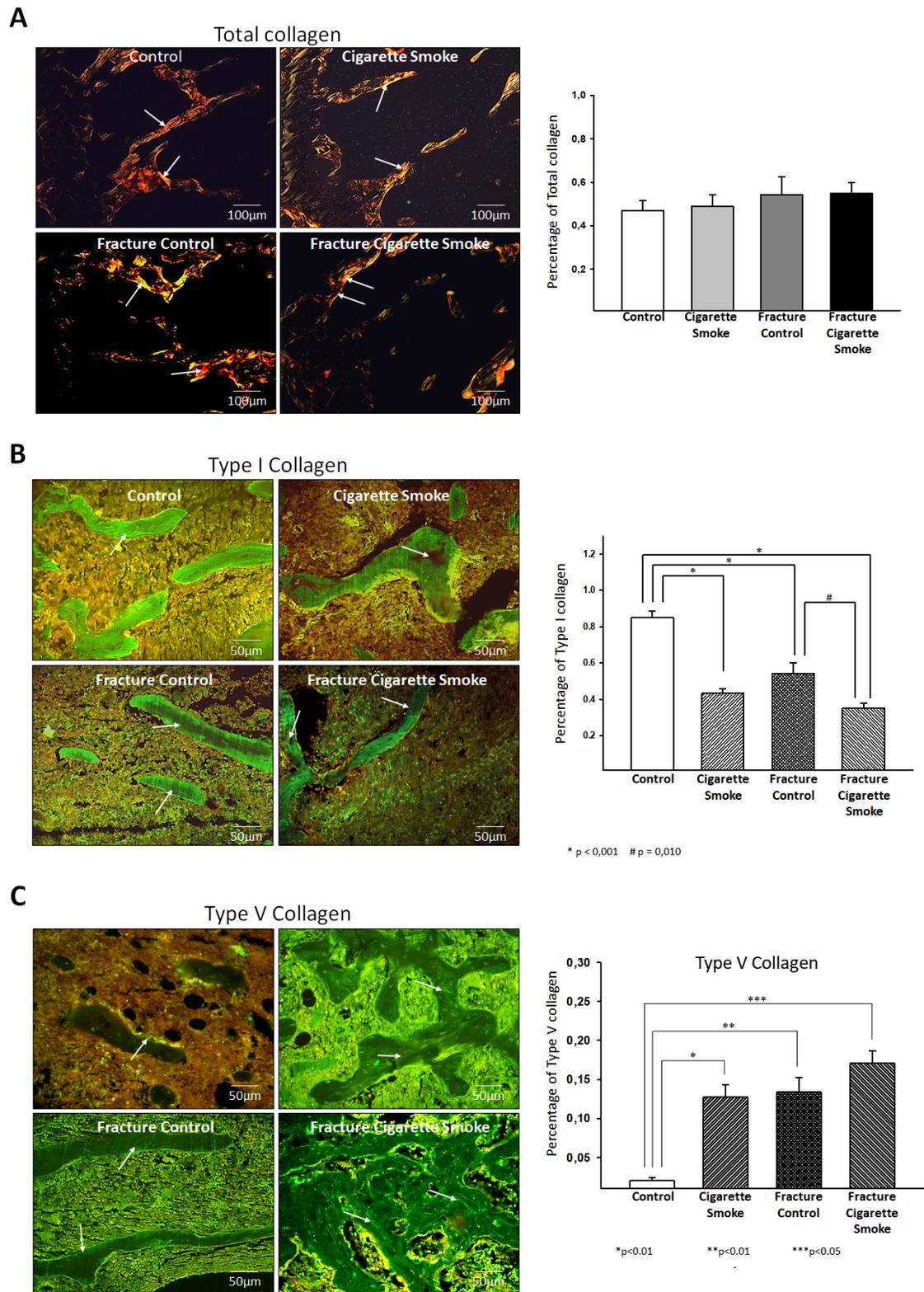
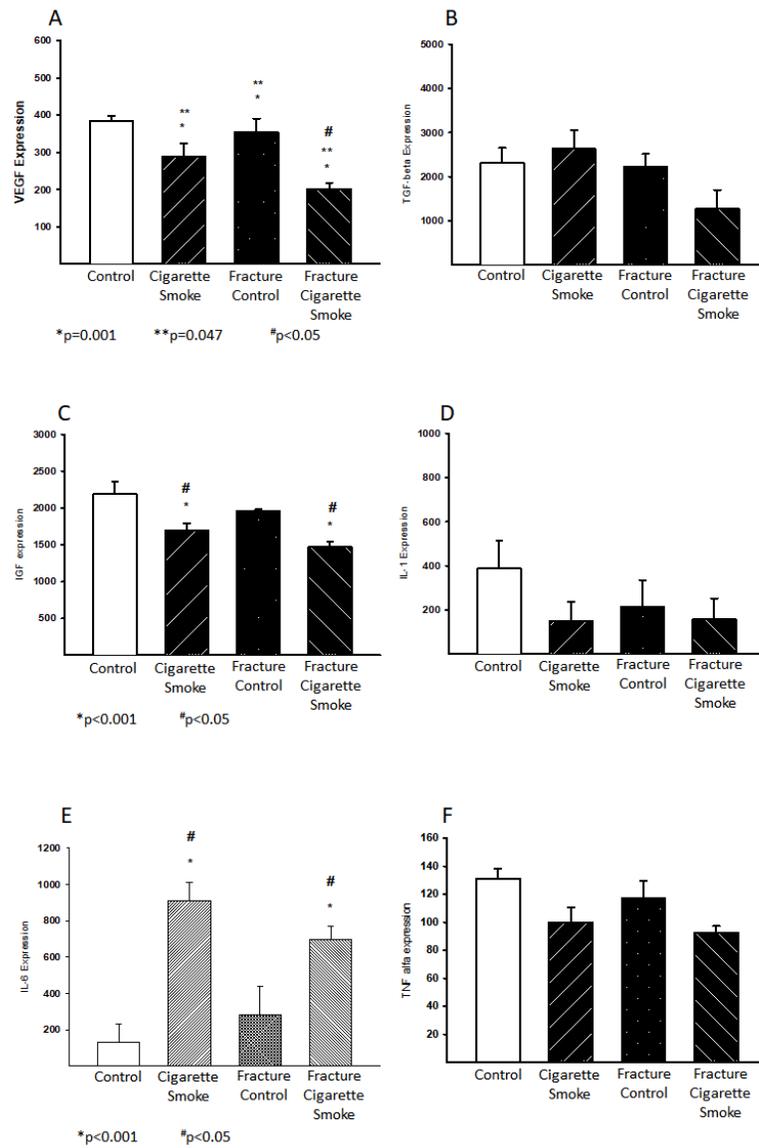


Figure 4

**Fig. 4** (a) The collagen fibers in the bone tissue of all groups evaluated were stained by Picrosirius and viewed under polarized light. The C group showed bone trabeculae composed predominantly of thick fibers (red birefringence). The CS and FC groups showed the bone trabeculae composed of thin fibers (green birefringence). In the FCS group, the collagen fibers were thick and thin fibers (green birefringence) (arrows).

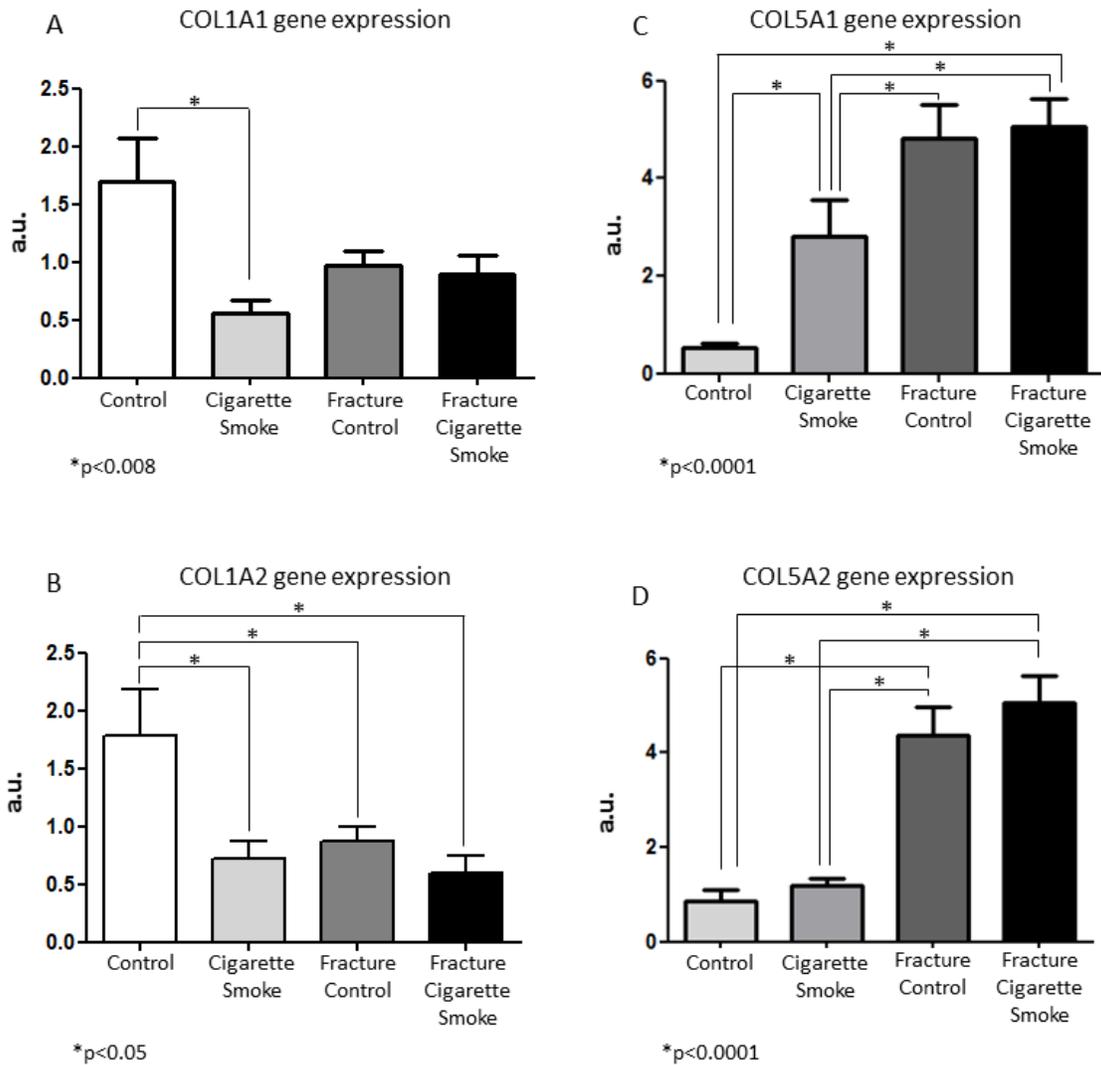
(b) The immunofluorescence staining of type I collagen demonstrates a uniform rectilinear pattern in the bone trabeculae (arrows) and a significant increase in the FCS group compared to that in the CS group ( $p=0.0197$ ).

(c) The immunofluorescence staining for type V collagen demonstrates a heterogeneous and intense pattern around the vessels (arrows) and is otherwise diffuse in the CS, FC and FSC groups when compared to the pattern in the C group ( $p<0.0001$ ). (NS=not significant).



**Figure 6**

**Fig. 5** Graphic illustration of VEGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in bone homogenate. There were significant differences among VEGF, IGF-1 and IL-6 expression ( $p<0.05$ ) and no significant results for TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression among the groups ( $p=NS$ ).



**Fig. 6** (a-b) Gene expression of type I and V collagen chains in the bone tissue. (A) The COL1A1 gene was found with a decrease in expression in group CS compared to that in the group C. (B) The COL1A2 gene had a decreased expression in groups CS, F and FCS when compared to that in group C. (C) The COL5A1 gene had increased expression in the CS, FC and FCS groups compared to that in the C group ( $p<0.05$ ). (D) The increased expression of the COL5A2 gene in the FC and FCS groups compared to that in the C group ( $p<0.0001$ ) is shown.

## **Apêndice II**



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/06/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **022/14** intitulado: “**Impacto do Tabagismo na Composição da Matriz Extracelular Óssea: Modelo de Fratura de Tíbia em Camundongos**” que utilizará **48** animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Walcy Rosolia Teodoro Pesquisador (a)  
Executante: Alexandre Povia Barbosa

CEUA-FMUSP, 26 de Junho de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da

FMUSP e-mail:

[ceua.fm@usp.br](mailto:ceua.fm@usp.br)