

Efeitos da inalação da fumaça do tabaco na densidade de mastócitos e no processo de colagenização em tecido gengival de ratas

Effects of tobacco smoke inhalation on mast cell density and collagenation process in rat gingival tissue

Efectos de la inhalación de humo de tabaco sobre la densidad de mastocitos y el proceso de colagenación en el tejido gingival de rata

Recebido: 15/06/2021 | Revisado: 24/06/2021 | Aceito: 28/06/2021 | Publicado: 12/07/2021

Taíssa Cássia de Souza Furtado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8186-1798>
Universidade de Uberaba, Brasil
E-mail: taissacassia@hotmail.com

Liliane Salgado Chaves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0730-3613>
Universidade de Uberaba, Brasil
E-mail: lilianesalgc@gmail.com

Ana Paula Espindula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9282-4482>
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: ana.espindula@uftm.edu.br

Fabrizio Antônio Gomide Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7520-2879>
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: fabrizio.cardoso@uftm.edu.br

Júlio César Tsukide

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0972-1907>
Universidade de Uberaba, Brasil
E-mail: jtsukide@gmail.com

Jorge Alfredo Léo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8639-0772>
Fatra Ensino Superior, Brasil
E-mail: jorgealeopalm@gmail.com

Sanívia Aparecida de Lima Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2587>
Universidade de Uberaba, Brasil
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: sanivia.pereira@uftm.edu.br

Rodrigo César Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3157-0826>
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: rodrigo.rosa@uftm.edu.br

Resumo

O tabaco é um dos principais fatores de risco para doenças periodontais embora essa relação ainda não seja completamente compreendida. O objetivo do estudo foi realizar avaliação histopatológica da gengiva de ratas exposta à inalação da fumaça de tabaco. Trinta ratas *wistar*, foram agrupadas em três grupos: ratas não expostas à fumaça do tabaco (n=10); ratas expostas à inalação da fumaça do tabaco por 30 dias (n=10); ratas expostas à inalação da fumaça do tabaco por 60 dias (n=10). Após eutanásia foram coletados plasma e gengiva. No grupo 60 dias foi observada maior frequência de apoptose, exocitose, necrose, hiperqueratose maior densidade de mastócitos e menor porcentagem de colágeno (p>0,05). Foi observada fraca correlação, inversamente proporcional, entre o percentual de colágeno e a densidade de mastócitos (p>0,05). A inalação da fumaça do tabaco afetou negativamente o ganho de massa corporal além provocar redução no percentual de colágeno e aumento da densidade de mastócitos no tecido gengival de ratas. Assim, os achados têm importante papel no sentido de alertar as autoridades de saúde sobre os efeitos deletérios da exposição à fumaça do tabaco, em especial no tecido gengival.

Palavras-chave: Colágeno; Gengiva; Mastócitos; Ratas; Fumar tabaco.

Abstract

Tobacco is one of the main risk factors for periodontal diseases, although this relationship is not fully understood. The aim of the study was to perform a histopathological evaluation of the gingiva of rats exposed to tobacco smoke inhalation. Thirty Wistar rats were grouped into three groups: rats not exposed to tobacco smoke (n=10); rats exposed to tobacco smoke inhalation for 30 days (n=10); rats exposed to tobacco smoke inhalation for 60 days (n=10). After euthanasia, plasma and gingiva were collected. In the 60-day group, a higher frequency of apoptosis, exocytosis, necrosis, hyperkeratosis, higher density of mast cells and lower percentage of collagen were observed ($p>0,05$). A weak, inversely proportional correlation was observed between the percentage of collagen and the density of mast cells ($p>0,05$). The inhalation of tobacco smoke negatively affected body mass gain besides provoking reduction in collagen percentage and increased mast cell density in the gingival tissue of rats. Thus, the findings play an important role in alerting health authorities about the deleterious effects of exposure to tobacco smoke, especially on gingival tissue.

Keywords: Collagen; Gingiva; Mast cells; Rats; Smoking tobacco.

Resumen

El tabaco es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades periodontales, aunque esta relación no se comprende del todo. El objetivo del estudio fue realizar una evaluación histopatológica de la encía de ratas expuestas a la inhalación de humo de tabaco. Treinta ratas Wistar se agruparon en tres grupos: ratas no expuestas al humo del tabaco (n = 10); ratas expuestas a la inhalación de humo de tabaco durante 30 días (n = 10); ratas expuestas a la inhalación de humo de tabaco durante 60 días (n = 10). Después de la eutanasia, se recolectaron plasma y encía. En el grupo de 60 días se observó una mayor frecuencia de apoptosis, exocitosis, necrosis, hiperqueratosis, mayor densidad de los mastocitos y menor porcentaje de colágeno ($p>0,05$). Se observó una correlación débil e inversamente proporcional entre el porcentaje de colágeno y la densidad de los mastocitos ($p>0,05$). La inhalación del humo del tabaco afectó negativamente aumento de masa corporal y llevó a una reducción en porcentaje del colágeno y aumentó densidad de la célula de mástil en el tejido gingival de ratas. Así, los hallazgos desempeñan un papel importante en alertar a autoridades sanitarias sobre los efectos perjudiciales de la exposición al humo del tabaco, especialmente sobre tejido gingival.

Palabras clave: Colágeno; Encías; Mastocitos; Ratas; Tabaco para fumar.

1. Introdução

O tabagismo é um fator de risco para as principais causas de morte no mundo (Colombo et al., 2014; Oshi 2018), com repercussões negativas em vários sistemas do organismo humano, apresentando relação direta às diversas alterações da cavidade bucal (Who, 2017). A relação entre fumo, prevalência e severidade da doença periodontal tem sido discutida há bastante tempo e pesquisas têm sugerido que o hábito de fumar é um dos fatores de risco de maior predomínio para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Salum et al., 2007; Leite et al., 2018). São encontrados poucos relatos na literatura da relação entre a densidade de mastócitos e a degradação de colágeno (Golijanin et al., 2015; Hafez, 2019; Amaral et al., 2020).

Os tecidos conjuntivos são compostos por estruturas biológicas complexas que são: os fibroblastos, osteoclastos e condrócitos, por células que possuem ação imunológica: polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos, fibras e principalmente, pela matriz extracelular (Hay, 1999).

De origem hematopoiética, os mastócitos respondem a sinais de imunidade adaptativa e inata, liberando de forma tardia ou imediata mediadores inflamatórios. São as primeiras células imunes a estimularem o processo inflamatório pela liberação de mediadores vasoativos e citocinas pró-inflamatórias. Essas células foram descritas no ano de 1979, por Paul Ehrlich, mediante sua capacidade metacromática. Os mastócitos atuam na patogênese de doenças de hipersensibilidade imediata e na mastocitose, assim como na resposta ao hospedeiro à doenças auto-imunes, na cicatrização de feridas, fibrose e infecções (Filippis et al., 2008).

A matriz extracelular, componente importante e numerosa do tecido conjuntivo, auxilia na estrutura dos tecidos, além de funcionar como meio de comunicação entre as células, sendo responsável pela morfogênese, diferenciação, migração celular, reparo e fibrose tecidual (Souza & Pinhal, 2011).

Os principais componentes da matriz extracelular são classificados em estruturas fibrilares e não fibrilares. Os

componentes fibrilares são representados pelas fibras que constituem o sistema colagênico (fibras colágenas e membrana basal) e elástico (fibras elásticas maduras, elauninicas e oxitalânicas) (Hay, 1999).

O colágeno é considerado a proteína extracelular mais abundante dos seres humanos, o que corresponde a 25% das proteínas. O colágeno tipo I é encontrado com maior frequência nos tecidos, o que corresponde a 90% de todo colágeno do organismo (osso, dentina, tendões, fâscias, cápsulas de órgãos, ligamentos e região profunda da pele) inclusive no músculo esquelético, sendo assim, é responsável principalmente pela resistência às forças tenses (Souza, 2002). Já o colágeno do tipo III, na maioria das vezes, é distribuído juntamente com o colágeno tipo I e está localizado em órgãos e tecidos onde a estrutura do arcabouço pode apresentar variações (camada superficial da derme e média dos vasos sanguíneos, mucosa do sistema digestório, respiratório e reprodutivo e em órgãos parenquimatosos). De uma forma geral, durante o processo de cicatrização, nas regiões onde existe maior sobrecarga de forças tenses, a neoformação de colágeno tipo III ocorre anteriormente ao do colágeno tipo I, pelo qual é posteriormente substituído (Ribeiro et al., 2015). Sabe-se que maus hábitos como o tabagismo pode ter impacto na formação e na degradação das fibras colágenas (Amaral et al., 2020).

Os efeitos do tabaco nos tecidos periodontais aparecem clinicamente em várias formas. Por um lado, sinais sutis de inflamação são suprimidos por sua interferência nas reações vasculares e imunológicas e, por outro lado, as funções de suporte são prejudicadas por sua ação destrutiva sobre o tecido ósseo, levando à perda óssea, formação de bolsa periodontal e perda do dente. A supressão da responsividade hemorrágica é o efeito mais precoce e o menos notado do tabaco sobre os tecidos periodontais. Esse efeito é sutil, muitas vezes não é detectado clinicamente e pode ser visto como algo positivo e saudável. No entanto, a gengiva sem sangramento ou sangramento inadequado de um fumante não está saudável. O tabagismo altera a resposta inflamatória gengival e o sangramento, e os sinais de inflamação como vermelhidão, sangramento e edema aparecem mais tardiamente, com o avançar da doença (Bergström, 2004).

Diante da pandemia da COVID-19 infere-se que fumantes ativos apresentam maior vulnerabilidade à infecção pelo novo coronavírus, prejudicando o sistema imunológico e sua capacidade de reação a infecções, o que pode aumentar a gravidade da doença (Vardavas & Nikitara, 2020).

Na literatura pesquisada estudos experimentais adotaram valores de referência de cotinina semelhante aos encontrados em humanos para caracterização da exposição passiva (2,1 a 17,5 ng/ml) ou ativa (> 17,5 ng/ml) (Chiu; Wu & Kuo, 2008; Rosa et al., 2017). Assim esse estudo justifica-se para elucidar os efeitos da inalação da fumaça do tabaco no tecido gengival de ratas, com uso de modelo experimental validados e amplamente aceito na literatura (Wang et al., 1999, Gentner & Weber, 2012; Santiago et al., 2017). Logo, o modelo experimental de exposição à fumaça principal do cigarro, expõem os animais à mesma fumaça que é inalada voluntariamente por fumantes ativos. Porém, a exposição experimental é realizada de forma involuntária, por terceiros, caracterizando assim a exposição à fumaça de segunda mão.

Neste contexto, a hipótese deste estudo é que as ratas expostas a fumaça de segunda mão, tenha maior incidência de alterações gengivais, inferindo maior predisposição à doenças periodontais. Assim, o objetivo do estudo foi realizar avaliação histopatológica da gengiva de ratas exposta à inalação da fumaça de tabaco.

2. Metodologia

Estudo experimental, analítico, quantitativo e prospectivo (Pereira et al., 2018), elaborado de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NRC 2011) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA), protocolo nº 070/2017.

Foram utilizadas 30 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com massa corporal inicial média de 150 g (± 10 g) fornecidas pelo Biotério Central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O cálculo amostral foi realizado considerando a taxa de perda de aproximadamente 30% (Santiago et al., 2017).

Os animais foram alojados em gaiolas padronizadas no Biotério de Experimentação, onde permaneceram durante todo o período experimental sob temperatura ambiente de 20 °C a 24 °C, com ciclos claro e escuro de 12 horas, com umidade relativa do ar de 55% ($\pm 10\%$) e livre acesso à água e ração (Nuvilab CR-1, Colombo, PR, Brasil).

O período experimental teve duração de 60 dias, em que os animais foram agrupados aleatoriamente em 3 grupos: Grupo I - Controle (n=10) – ratas não expostas à fumaça do tabaco, porém eram acondicionadas no equipamento sem a inalação da fumaça, pelo mesmo período de tempo da queima do cigarro dos grupos experimentais; Grupo II - 30 dias (n=10) – ratas expostas à inalação da fumaça do tabaco nos últimos 30 dias do segmento experimental; Grupo III - 60 dias (n=10) – ratas expostas à inalação da fumaça do tabaco por 60 dias.

A exposição de ratos à fumaça do tabaco foi realizada de acordo com métodos previamente descritos (Wang et al., 1999; Gentner & Weber, 2012; Santiago et al., 2017). Portanto, os animais foram expostos a fumaça principal do cigarro, aquela que passa pelo filtro, sendo essa semelhante a dos fumantes ativos. Todavia, a exposição não foi voluntária, sendo exposta com uso de equipamentos, sendo denominada fumaça de segunda mão.

Durante a queima do cigarro uma bomba peristáltica (Provitec AWG 5.000 AXD, São Paulo, SP, Brasil) aspirou a fumaça principal com 80% da vazão máxima (0,9 L / min), transferindo-a para uma câmara de distribuição e depois para os compartimentos cilíndricos, de acondicionamento dos animais. O equipamento possuía temporizador, utilizado para controlar a introdução de fumaça do cigarro por 15 segundos (s) e sua substituição por ar ambiente por 30s, completando um ciclo de 45s. Após a exposição a fumaça era aspirada para o exterior através de um exaustor acoplado.

Os animais foram adaptados ao tubo durante uma semana sem queima de cigarros e posteriormente expostos à fumaça de dois cigarros consecutivos pela manhã e dois cigarros consecutivos à tarde, com intervalo de seis horas, por 30 e 60 dias de acordo com o grupo experimental. O tempo de exposição diária foi de 40 min, sendo duas exposições de 20 min ao dia, com um total de 2400s. Ao considerarmos o tempo total de um ciclo que é de 45s, temos um total de aproximadamente 53 ciclos expositivos diários. Deste modo, levando em consideração que o tempo de exposição à fumaça em cada ciclo, 15s, cada animal foi exposto à 795s, ou seja, 13,25 min de exposição diária à fumaça do cigarro. Tendo considerado a vazão da bomba (0,9 Litros/min) e o tempo de exposição diária de cada animal à fumaça do tabaco (13,25 min), estima-se que os ratos foram expostos à aproximadamente 12 litros de fumaça por dia.

O percentual de monóxido de carbono foi aferido a cada sete dias no interior de cada câmara cilíndrica, utilizando um medidor portátil de monóxido de carbono (Instrupemp, ITMCO-1500, São Paulo, SP, Brasil). As quatro câmaras apresentaram níveis semelhantes de concentração ao monóxido de carbono, em cada ciclo ($338,79 \pm 1,16$ mg/L). Foi utilizado cigarros Marlboro (Phillips Morris, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil), cada unidade contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono, de acordo com as informações do fabricante.

Os animais foram pesados semanalmente utilizando balança semianalítica (Balança Eletrônica Digital de 0 a 3kg, TOLEDO, mod. 9094) com capacidade de até 5200g, com resolução de precisão de 0,1g.

Ao final do experimento os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva (3mL/100g) de Tiopental (tiopentato sódico, solução a 1,25%) administrado por via intraperitoneal. As amostras de sangue foram mantidas em caixas com gelo após a coleta e centrifugadas dentro de 2 horas, com a coleta e armazenamento do plasma à -20°C .

A dosagem de cotinina plasmática foi realizada por meio de análise por cromatografia gasosa, conforme metodologia de rotina do Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP / USP). Padrão: cotinina em solução de 1,0 mg / mL em metanol (Sigma-AldrichTM - Missouri, EUA).

Os níveis de cotinina plasmática dos animais são similares aos encontrados em fumantes humanos passivos. Logo, foi utilizado um estudo suéco com mulheres grávidas para estabelecer relação clínica com os níveis de exposição experimental à

fumaça do tabaco. Assim, foi adotado valores <17,5 ng/ml cotinina como fumantes passivos, fumante moderado entre 17,6-113 ng/ml e > 113 ng/ml fumantes de mais de 10 cigarros por dia (Chiu et al., 2008).

Amostras das gengivas da porção lingual na região dos molares foram coletadas e fixadas em formol a 10%. Os fragmentos foram submetidos à processamento histológico, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Foram confeccionadas as lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina para realização das avaliações histopatológica de rotina, além do uso de Azul de Toluidina e Picrossirius Red, para determinação da densidade de mastócitos e quantificação da porcentagem de colágeno, respectivamente.

Para a quantificação morfométrica do colágeno, as lâminas coradas com Picrossirius Red foram analisadas em um microscópio óptico Axio 4.1 padrão (Zeiss, Berlin, Germany) usando uma objetiva de 20X e um filtro polarizador. Todos os campos das lâminas contendo tecido muscular foram analisados. As imagens foram transmitidas ao monitor do computador com o auxílio de uma câmera de captura de imagens AxioCam (Zeiss, Berlin, Alemanha). O software Axiovision 4.8 (Zeiss, Berlin, Germany) foi usado para a análise morfométrica da porcentagem de colágeno. Em luz polarizada o colágeno apresenta birrefringência com coloração amarelada, avermelhada ou esverdeada, sendo quantificado de forma semi-automática (Bertoldo et al., 2019; Amaral et al., 2020). A densidade de colágeno foi expressa como uma porcentagem de colágeno por área avaliada. Todas as análises foram realizadas por um único examinador e às cegas.

Para determinar a densidade dos mastócitos, as lâminas coradas pelo Azul de Toluidina foram analisadas com a objetiva de 40X. Com o auxílio de uma lâmina micrométrica, foi calculada a área de cada campo (0,14 mm²), sendo multiplicada pelo número total de campos analisados para obter a área total. Com o número total de mastócitos e a área total analisada, a densidade de mastócitos foi calculada e expressa em mastócitos por µm².

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares GraphPad Prism 5.0 e Bioestat 5.0, apresentando distribuição normal. Assim, os dados foram analisados pelo teste de ANOVA, seguida do teste de Tukey. As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de Pearson. Foi adotado nível de significância de 5%.

3. Resultados

A Tabela 1 apresenta os valores obtidos dos níveis séricos das dosagens de cotinina, em que os animais dos grupos 30 e 60 dias foram classificados como fumantes passivos.

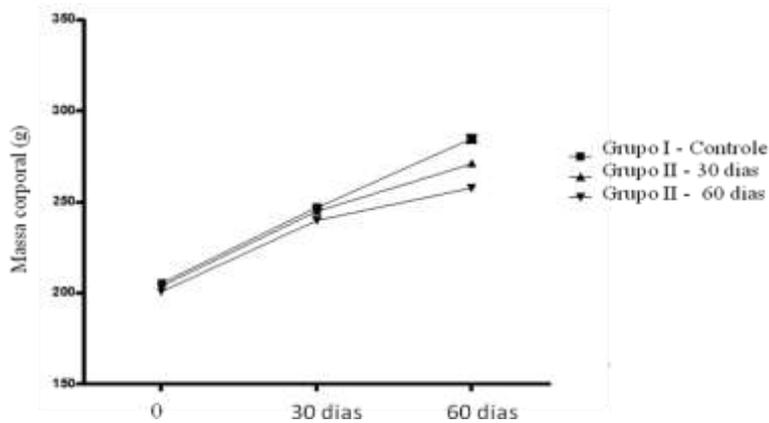
Tabela 1: Valores médios dos níveis de cotinina plasmática.

Grupos	Níveis de Cotinina (Média ± Desvio Padrão)	Classificação	Comparação / Nível de significância
I - Controle	0,0049 ± 0,008 ng/mL	Não Fumante	Diferença significativa entre o grupo controle e os grupos 30 e 60 dias (p<0,001).
II - 30 dias	9,15 ± 0,9 ng/mL	Fumante Passivo	
III - 60 dias	12,9 ± 1,1 ng/mL	Fumante Passivo	

Legenda: As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA seguida do pós-teste de Tukey (p<0,001). Valores expressos em média ± desvio padrão. Fonte: Autores.

Os animais dos grupos 30 e 60 dias apresentaram significativa redução do ganho de massa corporal, em relação ao grupo controle, respectivamente de 4,8% e 9,3% (p<0,001) (Figura 1).

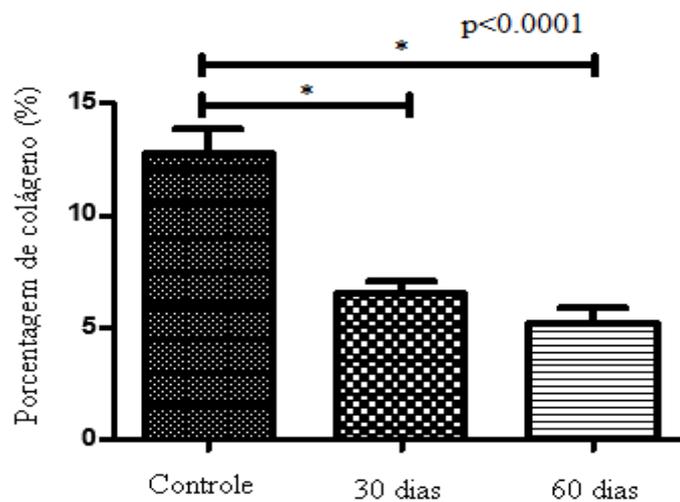
Figura 1: Gráfico da massa corporal dos animais em gramas (g).



Legenda: As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,001$). Controle *versus* 30 dias, $p < 0,001$; Controle *versus* 60 dias, $p < 0,001$; 30 dias *versus* 60 dias, $p < 0,001$. Fonte: Autores.

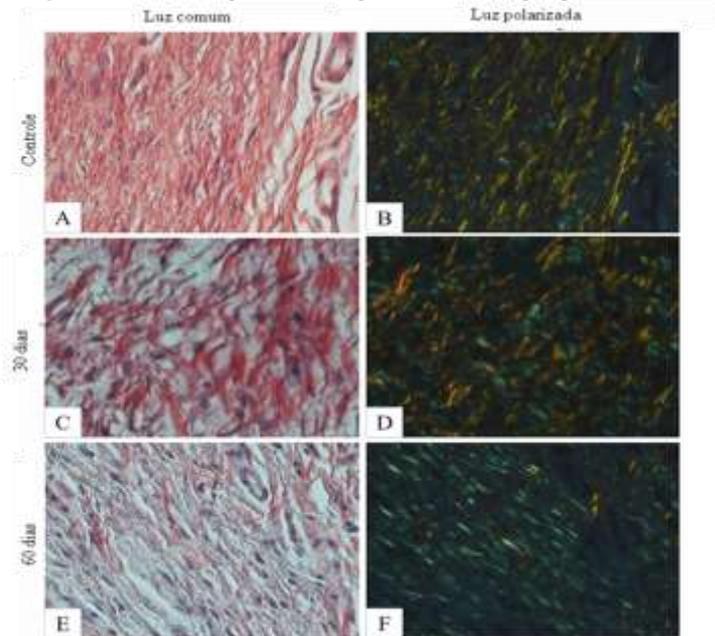
Nas análises histomorfológicas foi possível observar redução da porcentagem de colágeno no grupo 30 dias e 60 dias em comparação com grupo controle, respectivamente de 49,2% e de 59,4% ($p < 0,0001$) (Figura 2 e Figura 3).

Figura 2: Gráfico do percentual de colágeno (%).



Legenda: As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguida do Dunn's multiple comparisons test ($p < 0,0001$). Valores expressos em média \pm desvio padrão. * indica diferença estatística. Fonte: Autores.

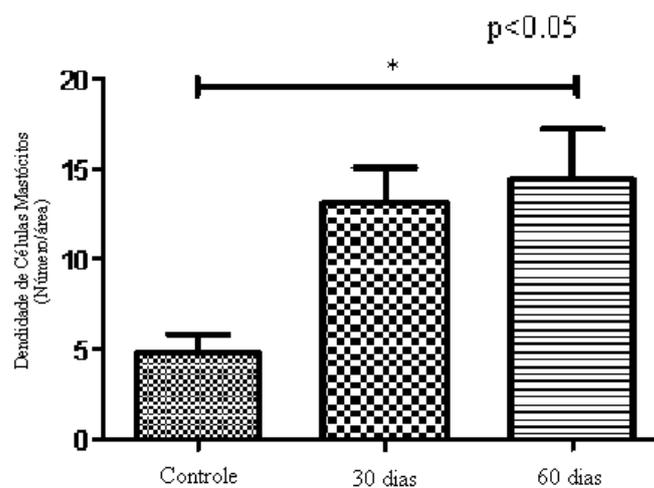
Figura 3: Porcentagem de colágeno no tecido gengival de ratas.



Legenda: Aumento de (40X). 3A- Grupo controle (Imagem Picosirius não polarizada); 3B- Grupo controle (Imagem Picosirius polarizada); 3C- Grupo 30 dias (Imagem Picosirius não polarizada); 3D- Grupo 30 dias (Imagem Picosirius polarizada); 3E- Grupo 60 dias (Imagem picosirius não polarizada); 3F- Grupo 60 dias (Imagem Picosirius polarizada). Fonte: Autores.

Foi observada presença discreta de apoptose e exocitose das células epiteliais, além de presença intensa de necrose e hiperqueratose em 37,5% das amostras analisadas no grupo 30 dias e 71,4% das amostras analisadas no grupo 60 dias. Em relação a densidade de mastócitos, foi observado aumento no tecido gengival dos animais dos grupos expostos à fumaça do tabaco. Estes achados foram mais evidenciados no grupo 60 dias, em que observou um aumento de 197,4% em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 4 e Figura 5).

Figura 4: Gráfico da densidade de mastócitos (Número/Área).



Legenda: As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão. * indica diferença estatística. Fonte: Autores.

fumante que não fumantes (Bergström, 2004; César Neto et al., 2012; Alexandridi et al., 2018).

É evidente a existência de alterações morfológicas na gengiva de fumantes, em comparação à não-fumantes. Assim, o hábito de fumar é um fator de risco de doença periodontal, em que o fumo é um dos principais modificadores, que agrava a severidade e dificulta seu tratamento e manutenção (Almeida et al., 2006; Salum et al., 2007). A forma generalizada de periodontite agressiva está mais associada ao hábito de fumar do que a forma localizada (Johnson et al., 2007).

O modelo experimental utilizado no estudo foi capaz de expor os animais a níveis semelhantes ao fumo passivo em humanas, sendo adotado como referência os níveis de cotinina plasmática. É importante ressaltar que os animais foram expostos a fumaça principal do cigarro, aquela que passa pelo filtro, a mesmo que é inalada por fumantes ativos. Todavia, a exposição não foi voluntária, realizada por meio de equipamentos, sendo denominada fumaça de segunda mão. Neste contexto, a cotinina é o marcador mais adequado para avaliar o grau de exposição à fumaça do tabaco em humanos, permitindo classificar confiavelmente o grau de exposição em estudo clínico (Chiu et al., 2008) e experimentais (Rosa et al., 2017, Santiago et al., 2017). Logo, os níveis de cotinina obtidos no plasma dos animais submetidos a fumaça de segunda mão pode ser classificada como passiva.

Os animais permaneceram em experimentação na idade de 6 a 18 semanas, que corresponde aproximadamente 18 a 45 anos da idade em humanos (Andreollo et al., 2012). Assim, nossos achados são importantes para caracterizar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro, principalmente em adolescentes e adultos jovens.

Os achados da literatura apontam altos níveis de cotinina no fluido gengival em crianças expostas a fumaça passiva do cigarro (Erdemir, 2010), o que apresenta efetiva relação com o aumento da incidência de cárie e periodontite (Sutton, 2017).

A exposição ao tabaco gera efeitos colaterais sobre a gravidez e normalmente problemas de desenvolvimento apresentados pelos fetos que tiveram contato com a nicotina (Sampaio, Santos & Paz, 2020). A exposição também gera atraso na cicatrização de feridas, aumento do estresse oxidativo, assim como dano tecidual associado à nitração de proteínas e a oxidação lipídica e diminuição e atraso da resposta inflamatória. Assim, é relatada a diminuição da deposição de colágeno e da angiogênese. Fato que repercute diretamente na resistência dos vasos, tornando-os mais fracos e suscetíveis à lesão, surgindo assim a presença de coágulos. Deste modo, evidências apontam que os níveis de elastase são elevados, o que reduz a elastina, e leva a redução de plasticidade da ferida. Esses achados têm implicações importantes para entender como as feridas em fumantes ativos ou passivos curam mal e/ou reabrem (Dhall, 2016).

Os animais expostos à fumaça de segunda mão apresentaram redução significativa da massa corpórea. Esta perda possivelmente está relacionada a aceleração do metabolismo, que leva a maior gasto de energia para metabolizar as substâncias presentes na fumaça do tabaco e menor ingestão de alimentos pela ação anorética promovida pelo efeito da nicotina (Ijomone et al., 2014), o que inferimos ter acontecido no estudo.

Os achados do estudo apontam o efeito acumulativo da fumaça do tabaco, sendo observadas maiores alterações histopatológicas na gengiva dos animais do grupo 60 dias. Este efeito foi caracterizado pelo aumento da densidade de mastócitos, que infere processo inflamatório gengival crônico, que parece estar relacionado com a significativa redução do percentual de colágeno no tecido gengival de ratas. A redução no processo de colagenização do tecido gengival de ratos pode ter sido causada pela nicotina e pela cotinina, levando a um aumento na expressão de metaloproteinases, como as colagenases que induzem a destruição das fibras colágenas tipo I, II e III (Barnoya & Glantz, 2004). Na literatura pesquisada é encontrado estudos que relatam que o tabagismo prejudica o fluxo sanguíneo gengival, mediante a vasoconstrição, e a revascularização óssea e dos tecidos moles, reduz a inflamação. Essa redução pode estar relacionada também a alterações da resposta imune humoral e celular (Johnson et al., 2007).

O tabagismo vem sendo associado a níveis menores de citocinas inflamatórias, o que provavelmente, ocorre devido à presença de inibidores de expressão gênica na fumaça do cigarro (César Neto et al., 2012). Sabe-se que o tabagismo modifica a

resposta inflamatória e os pacientes podem apresentar mais em quantidade e mais profundas bolsas em comparação a não fumantes, o que favorece a colonização por micro-organismos, e conseqüentemente, leva a progressão da doença periodontal com destruição do tecido ósseo e perda do dente (Bergström, 2004).

Observamos também em nosso estudo que houve uma redução da porcentagem de colágeno e aumento de mastócitos em ambos os grupos submetidos a inalação da fumaça do tabaco. Estudos relatam a relação entre a densidade de mastócitos e a degradação de colágeno, decorrente de processo inflamatório, o que sugere associação com a degranulação dos mastócitos (Batista et al., 2005; Amaral et al., 2020).

Alguns trabalhos experimentais revelaram que sob a influência da nicotina existiria deficiência da migração e da diferenciação dos queratinócitos e conseqüentemente da repitelização (Zia et al., 2000; Bosco et al., 2004). Os fibroblastos sofreriam tanto na sua estrutura (Duygulu et al., 2006) quanto na proliferação e diferenciação (Martinez et al., 2002; Bosco et al., 2004; Skinovsky et al., 2016). Porém, existem autores que não encontraram mudanças na síntese desta proteína (Balatsouka, 2006).

4.1 Limitações

Deve-se alertar sobre a limitação de transposição das conclusões de estudos experimentais para casos em humanos, mesmo que o nosso modelo de exposição à fumaça de segunda mão reproduz adequadamente as condições de inalação da fumaça principal do cigarro.

5. Conclusão

Inferimos por meio desse estudo que a inalação da fumaça do tabaco afetou negativamente o ganho de massa corporal e propiciou redução no percentual de colágeno e aumento da densidade de mastócitos no tecido gengival de ratas. Assim, os achados têm importante papel de alertas as autoridades de saúde sobre os efeitos deletérios da exposição à fumaça do tabaco, em especial no tecido gengival.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba (UNIUBE); Cefores/Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências

- Alexandridi, F., Tsantila, S., & Pepelassi, E. (2018). Smoking cessation and response to periodontal treatment. *Aust Dent J*, 63 (2), 140-149.
- Almeida, A. F & Mussi, F. C. (2006). Smoking: knowledge, attitudes, habits and degree of dependence of young adults in Salvador. *Rev Esc Enferm USP*, 40 (4), 456-463.
- Amaral, E. P., Rosa, R. C., Etchebehere, R. M., Nogueira, R. D., Volpon, J. B., Rodrigues, D. B. R & De Lima Pereira, S. A. (2020). Overexpression of HIF-1 α and Morphological Alterations in the Tongue of Rats Exposed To Secondhand Smoke. *Braz Dent J*, 31 (3), 281-289.
- Andreollo, N. A., Santos, E. F., Araújo, M. R., & Lopes, L. R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship?. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 25 (1), 49-51.
- Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Sorensen, L., Lindh, C. H & Berglundh, T. (2006). Effect of systemic administration of nicotine on healing in osseous defects. An experimental study in rabbits. Part II. *Clin Oral Implants Res*, 17 (5), 488-494.
- Barnoya, J., & Glantz, S. A. (2004). Secondhand smoke: the evidence of danger keeps growing. *Am J Med*, 116 (3), 201-202.
- Batista, A. C., Rodini, C. O., & Lara V. S. (2005). Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis*, 11 (4), 249-254.

- Bertoldo, B. B., Etchebehere, R. M., Furtado, T. C. S., Faria, J. B., Silva, C. B., Araújo, M. F., Rodrigues, D. B. R & De Lima Pereira, S. A. (2019). Lingual salivary gland hypertrophy and decreased acinar density in chagasic patients without megaesophagus. *Rev Inst Med Trop*, 61, 1-6.
- Bergström, J. (2004). Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92 (1), 1-8.
- Bosco, A. F., Okamoto, t., Nagata, M. J. H & Machado, G. J. R. (2004). Efeitos da nicotina no processo de reparo de feridas cutâneas associadas à aplicação tópica de clorexedine. *Rev Odonto Cienc*, 19 (45), 207-213.
- César Neto, J. B., Rosa, E. F., Pannuti, C. M & Romito, G. A. (2012). Smoking and periodontal tissues: a review. *Braz Oral Res*, 26(1), 25-31.
- Chiu, H. T., Wu, H. D. I., & Kuo H. W. (2008). The relationship between self-reported tobacco exposure and cotinines in urine and blood for pregnant women. *Sci Total Environ*, 406, 331-336.
- Colombo, G., Clerici M., Giustarini, D., Portinaro, N.M., Aldini, G., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2014). Pathophysiology of tobacco smoke exposure: recent insights from comparative and redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 33(3), 183-218.
- Dhall, S., Alama, T. R., Castro, A., Sarker, A. H., Mao, J. H., Chan, A., Hang, B., & Martins-Green, M. (2016). Tobacco toxins deposited on surfaces (third hand smoke) impair wound healing. *Clin Sci (Lond)*, 130 (14), 1269-1284.
- Duygulu, F., Karaoglu, S., Zeybek, N. D., Kaymaz, F. F., & Günes, T. (2006). The effect of subcutaneously injected nicotine on achilles tendon healing in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 14 (8), 756-761.
- Erdemir, E. O., Sönmez, I. S., Oba, A. A., Bergstrom, J., & Caglayan, O. (2010). Periodontal health in children exposed to passive smoking. *J Clin Periodontol*, 37 (2), 160-164.
- Filippis, D., D'Amico, A., & Iuvone, T. (2008). Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: New perspective in chronic inflammation. *J Neuroendocrinol*, 20 (1), 20-25.
- Gentner, N. J., & Weber, L. P. (2012). Secondhand tobacco smoke, arterial stiffness, and altered circadian blood pressure patterns are associated with lung inflammation and oxidative stress in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302 (3), 818-825.
- Golijanin, R., Kujundžić, B., Milosavljević, Z., Milovanović, D. R., Andjelković, Z., Obrenović, M., & Nikolić R. (2015). Morphometric analysis of collagen and inflammatory cells in periodontal disease. *Vojnosanit Pregl*, 72 (3), 219-224.
- Hafez, S. M. N. A. (2019). Age related changes in the dermal mast cells and the associated changes in the dermal collagen and cells: A histological and electron microscopy study. *Acta Histochem*, 121 (5), 619-627.
- Hay, E. D. (1999). Biogenesis and organization of extracellular matrix. *FASEB J*, 13 (2), 281-283.
- Ijomone, O. M., Olaibi, O. K., & Nwoha, P. U. (2014). Effects of chronic nicotine administration on body weight, food intake and nitric oxide concentration in female and male rats. *Pathophysiology*, 21 (3), 185-190.
- Johnson, G. K., & Guthmiller, J. M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol*, 44, 178-194.
- Leite, F. R. M., Nascimento, G. G., Scheutz, F., & López R. (2018). Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *Am J Prev Med*, 54 (6), 831-841.
- Martinez, A. E. T., Silvério, K. G., & Rossa Júnior C. (2002). Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos - estudo in vitro. *Pesq Odontol Bras*, 16 (3), 234-238.
- Influence of aging on the skin quality of white-skinned women: the role of collagen, elastic material density, and vascularization. *Rev Bras Cir Plást*, 28 (1), 41-48.
- Oshi S. N., Oshi, D. C., Weaver, S., Agu, C. F., Smith, P. W., Ricketts Roomes, T., Meka, I. A., Rae, T., & Abel, W. D. (2018). A School-Based Study of the Influence of Students' Relationship with Teachers on Their Cigarette Smoking Behaviour in Jamaican. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19 (1), 7-12.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. UFSM. https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.
- Ribeiro, F. A. Q., Carvalho, M. F. P., Pereira, C. S. B., & Tateno, D. A. (2015). Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*, 60, 22-26.
- Rosa, R. C., Pereira, S. C., Cardoso, F. A. G., Caetano, A. G., Santiago, H. A. R., & Volpon, J. B. (2017). Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. *Clinics (São Paulo)*, 72 (12), 785-789.
- Sampaio, N. D. de S., Santos, M. F. A. dos & Paz, F. A. do N. (2020). Complications caused by nicotine during the pregnancy period. *Research, Society and Development*, v.9 (7), e64897450. DOI: 10.33448/rsd-v9i7.4506.
- Salum, A. W., Neto, J. B. C., & Sallum, E. J. (2007). Tabagismo e a doença periodontal. *Revista Periodontia*, 17 (2), 45-53.
- Santiago, H. A., Zamarioli, A., Sousa Neto, M. D., & Volpon, J. B. (2017). Exposure to Secondhand Smoke Impairs Fracture Healing in Rats. *Clin Orthop Relat Res*, 475 (3), 894-902.
- Skinovsky, J., Malafaia, O., Chibata, M., Tsumanuma, F., Panegalli Filho, F., & Martins, M.V . D. C. (2016). The influence of nicotine in healing of small bowel anastomoses in rats: angiogenesis and miofibroblasts. *Rev Col Bras Cir*, 43 (2), 087-092.

- Souza, A. P & Line, S. R. P. (2002). The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru*, 10 (1), 1-6.
- Souza, R. S., & Pinhal, M. A. S. (2011). Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, 36 (1), 48-54.
- Sutton, J. D., Salas Martinez, M. L., & Gerkovich, M. M. (2017). Environmental Tobacco Smoke and Periodontitis in United States Non-Smokers, 2009 to 2012. *J Periodontol*, 88 (6), 565-574.
- Vardavas, C. I & Nikitara, K. (2020). COVID-19 and smoking: A systematic review of the evidence. *Tob Induc Dis, Essen*. 18: 20.
- Wang, X. D., Liu, C., Bronson, R. T., Smith, D. E., Krinsky, N. I., & Russel, M. (1999). Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst*, 91 (1), 60-66.
- Who - World Health Organization. (2015). Tobacco: relatório n° 339 de julho de 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>
- Zia, S., Ndoye, A., Lee, T. X., Webber, R. J., & Grando, S. A. (2000). Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther*, 293 (3), 973-981.