

**JÚLIA BENINI KOHLER**

**Avaliação dos efeitos do tabagismo na constituição do tecido ósseo**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi  
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo  
2023**

**JÚLIA BENINI KOHLER**

**Avaliação dos efeitos do tabagismo na constituição do tecido ósseo**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi  
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

**São Paulo  
2023**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kohler, Júlia Benini Avaliação dos efeitos do  
tabagismo na constituição do tecido ósseo / Júlia  
Benini Kohler. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.  
Orientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos  
Santos Lopes.

Descritores: 1. Tecido ósseo 2. Tabagistas  
3. Remodelação óssea 4. Matriz óssea 5. Osteoartrose  
6. Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-468/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha família, que sempre apoiou e me mostrou que a educação é o único caminho.

Dedico ao meu grande amor e meu marido Marcelo, por acreditar no meu potencial e nunca me desamparar.

Por fim, dedico a minha filha Maria Clara, aguardamos ansiosamente a sua chegada.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à pessoa que me acompanhou, abriu as portas e incentivou para que este momento pudesse acontecer, à minha professora e orientadora Dra. Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes. Seu cuidado e carinho tornaram o processo de amadurecimento e aprendizagem mais leve. Este dia não chegaria sem você. Sou eternamente grata pela oportunidade e amizade construída ao longo dos últimos anos.

Agradeço aos colegas de turma que me acompanharam durante este projeto: Alex Ferreira da Silva e Walleson Alves Farias. Agradeço por serem o meu braço direito, por acompanharem e compartilharem do seu tempo. Vocês tornaram isso possível e não há palavras suficientes para agradecer.

À uma pessoa extremamente importante nesta caminhada, Prof. Walcy Rosalia Teodoro que abriu seu laboratório, compartilhou seus conhecimentos, ensinou diversas técnicas. Agradeço por ser sempre extremamente solícita em todas as situações. Agradeço também a sua equipe de laboratório Prof. Ana Paula Pereira Velosa pelo carinho e as alunas Lizandre e Zelita pela disposição de ajudar e esclarecer dúvidas.

Às colegas de laboratório que fizeram companhia desde o início, que compartilharam momentos bons, risadas e desabafos: Alyne Riane e Juliana Lourenço. Agradeço a amizade.

Aos colegas que fizeram as coletas do material estudado e que permitiram que este trabalho acontecesse: Dra. Barbara Fialho Carvalho Sampaio, Dr. Marco Aurélio Silveiro Neves e Dr. Leandro Gregorut Lima. Agradeço todo suporte.

Aos pacientes e familiares que aceitaram participar da pesquisa, por concederem responder questionários e por acreditarem na pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

À equipe LIM-20 professora Dra. Iolanda Tibério por apoiar este trabalho, Rosana por auxiliar em todas as questões burocráticas e pela paciência com todos os alunos e ao Davi por sempre cuidar de nós com cafés frescos e um bom dia animado.

Agradeço as alunas e colegas LIM-20 que fizeram parte da rotina, conversas e muito riso Francine Maria Almeida, Franciele Lima e Suellen Karoline.

Ao programa Fisiopatologia Experimental e ao suporte Gisele e Igor por acompanhar durante o processo burocrático que o aluno de pós-graduação possui.

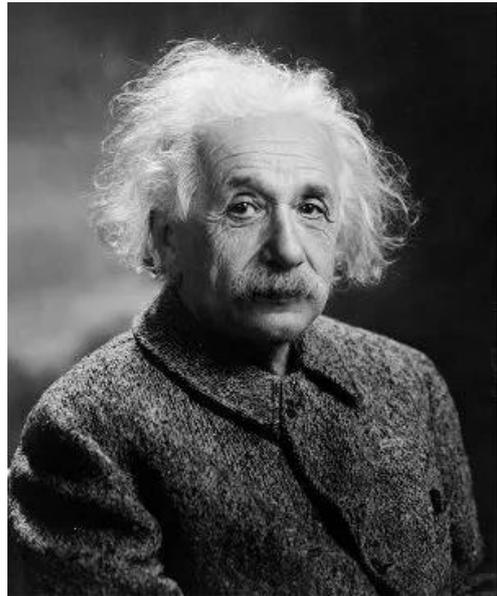
Ao incentivo financeiro CAPES que concedeu a bolsa de estudos.

Ao LIM pelo apoio a formação de pesquisadores da FMUSP.

Por último e não menos importante, agradeço a minha família por me acompanhar nessa caminhada e por nunca me deixarem esquecer aonde eu quero chegar.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho acontecer, meus sinceros agradecimentos.

## EPIGRAFE



“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,  
a eletricidade e a energia anatômica: a vontade”  
**Albert Einstein**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

- 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 Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## **SUMÁRIO**

## **Lista de abreviaturas e Siglas**

## **Lista de Símbolos**

## **Lista de Figuras**

## **Lista de Quadros e Tabelas**

## **RESUMO**

## **Abstract**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1. Efeitos do tabagismo no tecido ósseo.....	20
1.2. Arquitetura do tecido ósseo: tipos celulares .....	21
1.3. Alterações do metabolismo ósseo no processo degenerativo .....	25
1.4. Matriz Orgânica.....	26
1.5. Alterações do metabolismo ósseo por ação do tabagismo .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Objetivos gerais .....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Casuística.....	35
4.2. Coleta e processamento do tecido .....	36
4.3. Homogenato do tecido ósseo.....	37
4.4. Avaliação da Expressão de Citocinas no tecido ósseo .....	38
4.4.1. Dosagem proteica .....	38
4.4.2. ELISA (Enzyme–Linked Immunosorbent Assay).....	39
4.4.3. ELISA de captura.....	40
4.5. Expressão Gênica no tecido ósseo.....	41
4.5.1. Transcrição reversa .....	41
4.5.2. RT-qPCR .....	41
4.5.3. Avaliação da qualidade do material coletado .....	42
4.5.4. Validação dos primers .....	43
4.6. Histologia e Morfometria .....	44
4.6.1. Análise da Área Trabecular .....	44
4.6.2. Imunofluorescência para Colágeno Tipo I e V .....	44

4.6.3. Histomorfometria do Colágeno Tipo I e V por análise de imagem.....	45
4.6.4. Apoptose dos osteoblastos .....	46
4.7. Classificação Radiológica de Tönnis.....	47
4.8 Análise estatística .....	47
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1. Casuística .....	50
5.2. Área trabecular.....	51
5.3. Porcentagem de Colágeno Tipo I.....	52
5.4. Porcentagem de Colágeno Tipo V .....	53
5.5. Expressão gênica COL1A1 e COL5A1 .....	54
5.6. Quantificação proteínas método ELISA .....	55
5.7. Porcentagem células positivas Caspase-3.....	57
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA	Albumina de soro bovino
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{Ca}(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
COL1A1	Colágeno Tipo I alfa I
COL5A1	Colágeno Tipo V alfa I
CT	Ciclo de quantificação
EDTA	Ácido etilenodiamino tera-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
DP	Desvio padrão
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
Kg	Quilograma
LIM	Laboratório de investigação médica
M	Mols
Mg	Miligramas
Mm	Milímetros
N	Número
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear Kappa B
Nm	Nanômetros
OA	Osteoartrose
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina

OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato-salino
PBST	Tampão fosfato-salino com Tween 20
pH	Potencial Hidrogeniônico
RANK	Receptor Ativador do Fator NF-kB
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear-kB
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TMB	Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator-6 associado ao receptor de TNF
Mg	Microgramas
Mm	Micrômetro
X	Veze

## Lista de Símbolos

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\Delta$	Delta
%	Percentual
°C	Grau Centigrado
<	Menor
$\pm$	Mais ou menos
I	Número romano I
V	Número romano 5

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Dinâmica entre os diferentes tipos celulares e remodelamento ósseo.....	23
<b>Figura 2.</b> Via de sinalização sistema RANK-RANKL-OPG.....	24
<b>Figura 3.</b> Anatomia do tecido ósseo.....	27
<b>Figura 4.</b> Representação da fibra de colágeno.....	28
<b>Figura 5.</b> Protocolo de coleta do tecido ósseo no centro cirúrgico.....	37
<b>Figura 6.</b> Pulverização do tecido ósseo.....	37
<b>Figura 7.</b> Resultados da análise da qualidade do tecido coletado.....	43
<b>Figura 8.</b> Avaliação do peso molecular dos genes desenhados.....	43
<b>Figura 9.</b> Área trabecular nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo.....	52
<b>Figura 10.</b> Colágeno Tipo I nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo.....	53
<b>Figura 11.</b> Colágeno Tipo V nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo.....	54
<b>Figura 12.</b> Expressão gênica para COL1A1 e COL5A1 nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo.....	55
<b>Figura 13.</b> Expressão proteica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo no homogenato do tecido ósseo.....	56
<b>Figura 14.</b> Expressão proteica de OPG e RANKL nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo no homogenato do tecido ósseo.....	57
<b>Figura 15.</b> Densidade de células positivas para Caspase-3 nas trabéculas dos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo.....	58

## Lista de Quadros e Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sequências <i>sense</i> e <i>antisense</i> dos <i>primers</i> utilizados no PCRq.....	42
<b>Tabela 2.</b> Especificação do anticorpo Caspase-3.....	47
<b>Tabela 3.</b> Dados dos pacientes coletados.....	50
<b>Tabela 4.</b> Tempo (em anos) que os pacientes do grupo Ex-fumo cessaram o hábito tabágico.....	51
<b>Tabela 5.</b> Classificação radiológica para diferentes graus de artrose .....	51

## RESUMO

Kohler JB. Avaliação dos efeitos do tabagismo na constituição do tecido ósseo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Estudos clínicos demonstraram o impacto do tabagismo na fragilidade do tecido ósseo e maior incidência de fraturas. No entanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos nesses eventos não são completamente compreendidos. Anteriormente, mostramos alterações importantes nos componentes do tecido ósseo em um modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro (CS). A exposição ao CS induz piora da mineralização óssea e diminuição da deposição de Colágeno Tipo I, levando à fragilidade óssea. Considerando que a maioria dos estudos clínicos descrevem alterações estruturais ósseas por meio de imagens radiográficas, neste estudo realizamos análises *in situ* usando amostras de tecidos de fumantes, ex-fumantes e não fumantes para entender melhor como o processo inflamatório induzido pela exposição ao fumo pode interferir na atividade celular levando a alterações estruturais ósseas. Observamos níveis aumentados de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no homogenato do tecido ósseo com aumento concomitante da apoptose osteoblástica em fumantes e ex-fumantes quando comparamos com não fumantes. Alterações histológicas em fumantes e ex-fumantes foram caracterizadas por uma redução no Colágeno Tipo I. Apenas em fumantes foi observado aumento do Colágeno Tipo V e diminuição da área trabecular, sugerindo aumento da reabsorção óssea. Esses resultados mostraram que a apoptose osteoblástica em associação com o aumento da reabsorção óssea acarreta alterações estruturais do tecido ósseo em fumantes, predispondo estes indivíduos a maior fragilidade óssea.

**Palavras-chave:** Tecido ósseo. Tabagistas. Remodelação óssea. Matriz óssea. Osteoartrose. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Kohler JB. The effects of smoking on bone tissue [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Clinical studies have demonstrated the impact of smoking on bone tissue fragility and a higher incidence of fractures. However, the physiological mechanisms involved in these events are not completely understood. Previously, we showed important changes in bone tissue components in an experimental model of cigarette smoke (CS) exposure. CS exposure induces a worsening of bone mineralization and a decrease in type I collagen deposition, leading to bone fragility. Considering that the majority of clinical studies described bone structural changes by radiographic images, in this study we performed in situ analyses using tissue samples from smokers, former smokers and nonsmokers to better understand how the increase in inflammatory mediators induced by smoking exposure could interfere with bone cell activity leading to bone structural changes. We observed increased levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in bone tissue homogenates with a concomitant increase in osteoblast apoptosis in smokers and former smokers compared with nonsmokers. Histological changes in both smokers and former smokers were characterized by a reduction in type I collagen. Only in smokers was a decrease in trabecular area observed, suggesting increased bone resorption. These results showed that osteoblastic apoptosis in association with increased bone resorption leads to structural changes in bone tissue in smokers, predisposing these individuals to increased bone fragility.

**Keywords:** Bone. Smokers. Bone remodeling. Bone matrix. Osteoarthritis. Oxidative stress.

## **INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1.Efeitos do tabagismo no tecido ósseo**

O tabagismo é reconhecido como importante fator de risco para diversas doenças como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer, infarto e doenças vasculares (1–4). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que no Brasil o tabagismo gera um custo de R\$ 125 bilhões para os cofres públicos para cobrir despesas diretas e indiretas com doenças decorrentes do tabaco e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2021 foram contabilizados mais de 1,3 bilhões de usuários de tabaco no mundo (5) acarretando cerca de 6 milhões de mortes todos os anos (6–8).

O cigarro é composto por diversas substâncias tóxicas como nicotina, monóxido de carbono, formaldeído, acetaldeído, além de substâncias cancerígenas, sendo as principais: arsênio, níquel, chumbo, resíduos de agrotóxicos e substâncias radioativas (9).

Na literatura, está descrito o impacto do tabagismo no tecido ósseo promovendo o aumento do risco de fraturas, retardo no processo de cicatrização, aumento do risco de complicações pós-operatórias como risco de infecções e prolongamento das internações hospitalares (10,11). Estas alterações podem estar relacionadas com o desequilíbrio do remodelamento do tecido ósseo, o tornando mais vulnerável à osteoporose e a fraturas (12).

Em estudos clínicos também está demonstrado a associação entre tabagismo e redução do volume ósseo e da densidade mineral óssea (DMO), sendo que estas alterações têm sido atribuídas principalmente ao aumento da reabsorção óssea, entretanto esses efeitos também podem depender da duração do tabagismo em anos (anos-maço) (13–15).

## 1.2.Arquitetura do tecido ósseo: tipos celulares

O tecido ósseo é constituído por uma matriz mineral e uma matriz orgânica. A combinação das duas matrizes confere ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente a compressão e as torções (16).

A fase mineral é formada por cristais minerais de cálcio e fosfato (hidroxiapatita:  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), além de íons como sódio, potássio, magnésio e carbonato. Esta fase representa 60 a 70% da composição do tecido e tem como função principal resistência à compressão (17). A porção orgânica representa 30-40% do tecido ósseo e inclui fibras colágenas, proteoglicanos, proteínas da matriz (osteocalcina, osteonectina, osteopontina), citocinas (IL-1, IL-6, RANKL, OPG) e fatores de crescimento (BMP's, TGF- $\beta$ , FGF, IGF, PDGF) (18).

Existem três tipos celulares importantes na formação e remodelação deste tecido, como os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são células que sintetizam e secretam componentes orgânicos da matriz, os osteoclastos são células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea calcificada e ao remodelação óssea e os osteócitos são células com processos citoplasmáticos em pequenos canalículos encontradas entre as camadas da matriz óssea (16,19–21).

As células da linha osteoblástica integram quatro subpopulações principais: os pré-osteoblastos, os osteoblastos maduros, as células de revestimento ósseo e os osteócitos, sendo todas elas consideradas como diferentes estados funcionais da mesma célula (22). Os osteoblastos regulam os processos de remodelação óssea como receptores e transmissores de sinais, sua origem mesenquimal detém poder de diferenciar se e proliferar-se em células formadoras de tecido ósseo, que se diferenciam quando atingem a superfície óssea e apresentam-se então como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteóide). Este tipo celular

além de controlar a diferenciação e ativação dos osteoclastos é responsável pela formação da matriz orgânica do tecido ósseo (23).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea. Na linha osteoclástica, existem os monócitos circulantes, os monócitos presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos. Os osteoclastos são membros da linha celular dos monócitos-macrófagos, responsável pela dinâmica de remodelação óssea (22).

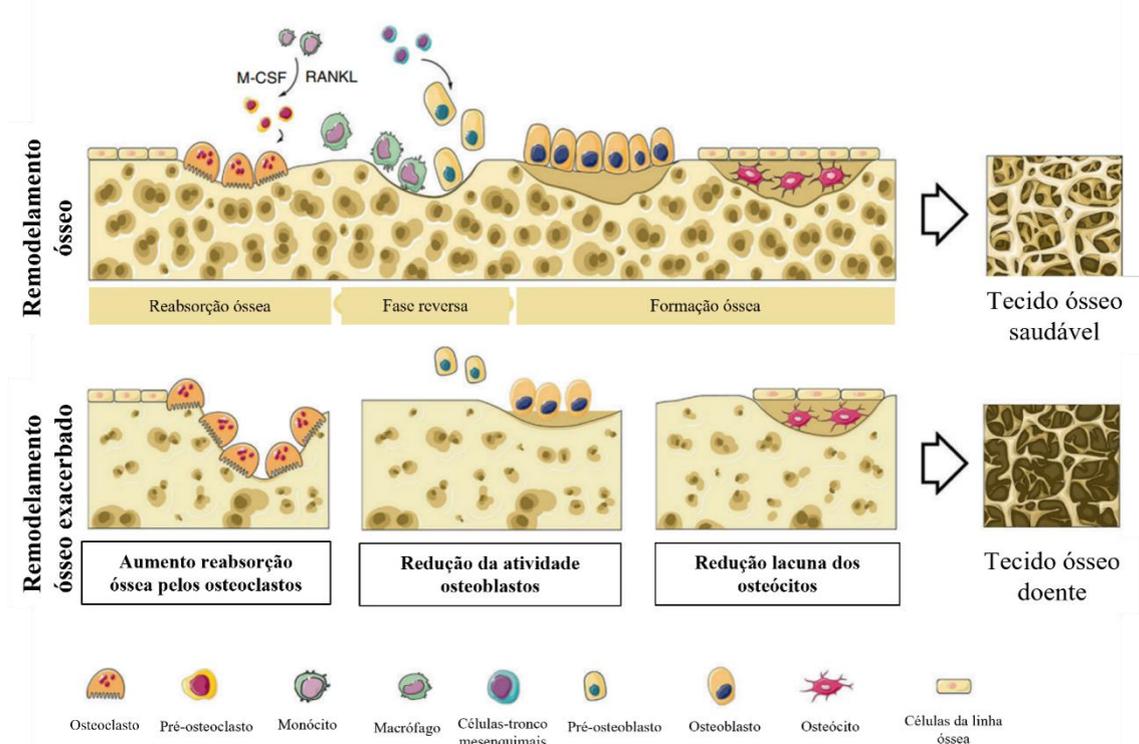
A homeostase do tecido ósseo depende de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (24). O processo contínuo de renovação óssea é denominado remodelação óssea e depende da atividade coordenada das diferentes células promovendo formação e reabsorção (Figura 1) (25). A remodelação permite que o osso tenha capacidade plástica de adaptação frente ao estresse externo como tração e compressão, ao qual é submetido ao longo dos anos (26).

Alterações no padrão de remodelamento ósseo caracterizado pelo aumento da atividade dos osteoclastos e concomitante redução da atividade dos osteoblastos acarretam aumento da porosidade e redução do número de trabéculas (27).

Dentre as citocinas que regulam o metabolismo e remodelamento ósseo, destaca-se o Receptor Ativador de Fator Nuclear Kappa-B (RANKL), uma citocina da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF) essencial para ativação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção da matriz (28).

As atividades do RANKL são mediadas por sua ligação ao RANK onde esta ligação de RANKL e RANK é considerada a etapa chave preliminar para ativação da via da osteoclastogênese, responsável pela ativação da ação de reabsorção dos osteoclastos. O RANKL estimula a proliferação e diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos. Sua

expressão é influenciada por vários hormônios, fatores de crescimento, peptídeos e citocinas (28).

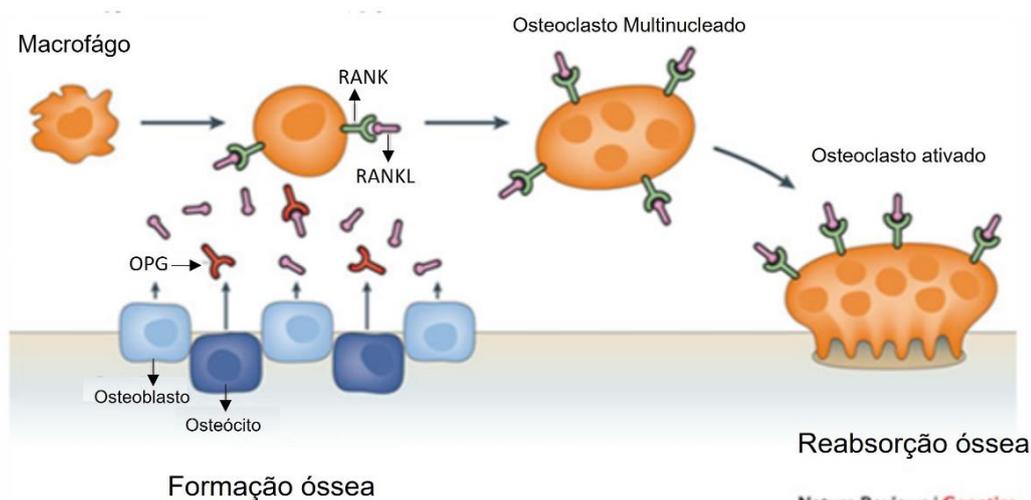


**Figura 1.** Dinâmica entre os diferentes tipos celulares do metabolismo e remodelamento ósseo. Com o aumento da atividade dos osteoclastos e redução da atividade dos osteoblastos gera a diminuição da espessura trabecular e consequentemente maior porosidade do tecido ósseo. Fonte: Adaptado de Xie Y, 2019 (27).

Outra proteína importante para a homeostase do tecido ósseo e que desempenha um papel importante neste processo é a osteoprotegerina (OPG). A OPG é uma citocina produzida e liberada pelos osteoblastos ativados, membro da família dos receptores do TNF conhecida pelo seu papel inibidor dos osteoclastos e importante regulador do metabolismo ósseo (29).

A OPG se liga ao receptor RANKL e evita a ligação do RANK-RANKL (Figura 2). A inibição da ligação de RANKL com RANK via OPG pode suprimir a reabsorção óssea através da inibição do RANKL e, portanto, favorecer a formação óssea (28). O equilíbrio das atividades das citocinas OPG/RANKL são responsáveis por manter a homeostase do tecido, evitando assim a osteoclastogênese e a reabsorção óssea

inadequada (30–33). Portanto o desequilíbrio entre suas atividades é crucial em doenças ósseas como a osteoporose, artrite reumatoide além de estar relacionada com aumento dos riscos de fratura e fragilidade óssea (34).



**Figura 2.** Via de sinalização sistema RANK-RANKL-OPG. Biomarcadores na regulação da formação e reabsorção óssea. Fonte: Adaptado de Richards JB, 2012. (35)

As citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) também apresentam papel importante na cascata de regulação e ativação celular dos osteoclastos e osteoblastos pois também são responsáveis pela indução da ativação das proteínas RANKL (36). Outros estudos também apontam que estas citocinas pró-inflamatórias sozinhas também podem estimular a osteoclastogênese sem estar relacionada com a ativação RANKL/RANK (37).

As células precursoras dos osteoclastos como os monócitos, expressam marcadores específicos e RANK. Quando RANKL se liga ao receptor RANK, inicia-se uma cascata de reações mediada por Fator-6 associado ao receptor TNF (TRAF6) e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) para dar início à diferenciação dos pré-osteoclastos (38–40) que irão se fundir formando células multinucleadas (41). O TNF- $\alpha$  estimula a ativação de transcrição de NF- $\kappa$ B e por este motivo também está envolvido também na diferenciação e sobrevivência de osteoclastos (33,42–45), já a interleucina IL-6 tem papel fundamental

na produção de RANKL pelos osteoblastos e a IL-1 está envolvida com a ativação dos osteoclastos para reabsorção óssea (46).

Foi descrito na literatura em doenças como artrite reumatoide e infecção periodontal, a perda de massa óssea por ação de osteoclastos e aumento de IL-1 e IL-6 e TNF- $\alpha$ , ressaltando a importância destas quimiocinas na ativação desses tipos celulares (47,48).

A Caspase-3 é uma enzima importante para a apoptose e sobrevivência celular no processo de remodelamento e manutenção do tecido ósseo (49). Estudos prévios demonstraram que o aumento da apoptose levou ao remodelamento ósseo inadequado e este processo foi responsável por interferir nas atividades das células como osteoblastos e osteócitos (50). Miura e colaboradores (2004) (49), quando estudaram a atividade da Caspase-3, observaram redução da formação óssea, ossificação atrasada e diminuição da densidade mineral óssea em camundongos deficientes de Caspase-3. Este resultado demonstra a importância da atividade da apoptose dos osteoblastos no processo de remodelamento ósseo.

### **1.3. Alterações do metabolismo ósseo no processo degenerativo**

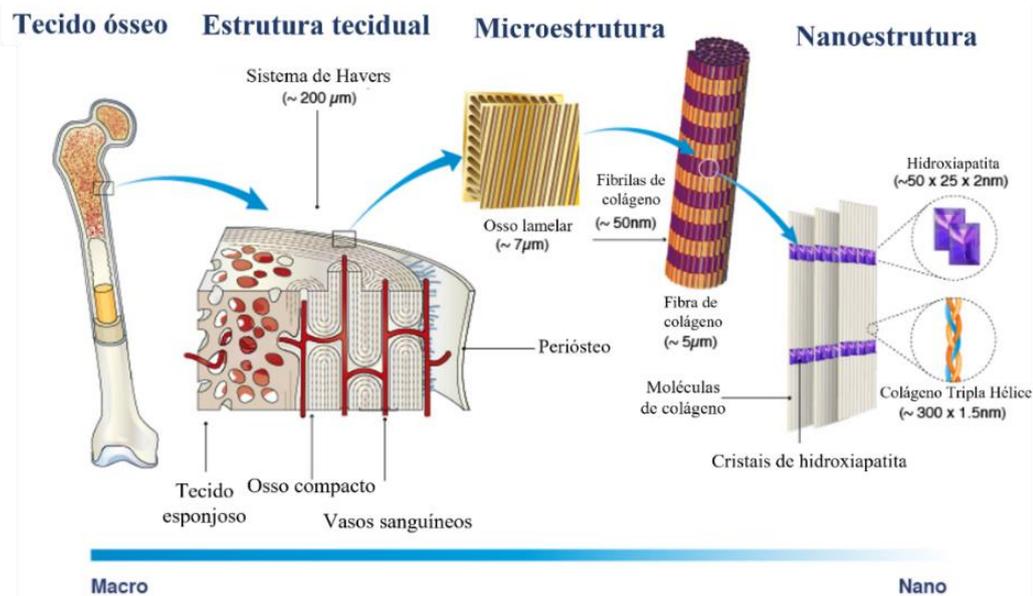
Para compreender as doenças degenerativas ósseas é importante entender o papel dos diferentes tipos celulares ósseos e suas relações. O desequilíbrio entre as atividades dos osteoblastos e osteoclastos podem levar ao aumento do processo degenerativo (27,51). A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa definida como um distúrbio musculoesquelético sendo caracterizada clinicamente por dor e limitações funcionais, histologicamente por alterações da cartilagem e do osso subcondral, e radiologicamente pela presença de osteófitos e estreitamento dos espaços articulares (52). Acomete principalmente idosos e a principal causa de incapacidade em idosos, causa dor, perda de função e diminuição da qualidade de vida (53). Embora a OA tenha sido

considerada uma doença da cartilagem articular, também acomete o tecido ósseo e causa fragilidade conforme o seu desgaste (54). Considerada uma doença endêmica no mundo, estima-se que 30,8 milhões adultos nos Estados Unidos apresentam este diagnóstico e 300 milhões de indivíduos no mundo (55). Pacientes com OA apresentam um aumento da remodelação óssea, associado a uma perda transitória do tecido ósseo, aumento da porosidade na região subcondral e densidade reduzida do tecido (56).

Na OA a relação OPG/RANKL estão intimamente envolvidas na degradação da cartilagem e do osso subcondral (57). Está descrito na literatura uma relação entre a atividade dos osteoblastos e os níveis anormais de OPG e RANKL, e que reconstituir o equilíbrio destas proteínas pode ser uma nova estratégia para o tratamento desta doença (57).

#### **1.4. Matriz Orgânica**

No tecido ósseo, substâncias orgânicas como as fibras de colágeno, fornecem resistência enquanto as substâncias inorgânicas como hidroxiapatita, fornecem rigidez. A combinação de substâncias orgânicas e inorgânicas permitem a resistência do tecido ósseo (Figura 3) (58).

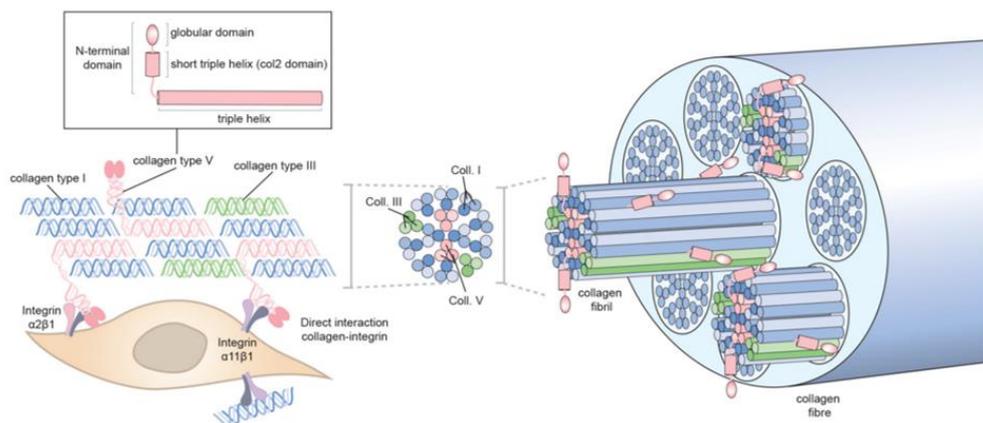


**Figura 3.** Anatomia do tecido ósseo. Estrutura, microestrutura e nanoestrutura do tecido ósseo. Fonte: Adaptado de Black J (2020). (58)

A porção orgânica do tecido ósseo é composta em sua maior parte por Colágeno do Tipo I (90 a 95%) sendo este constituinte o mais importante da matriz orgânica do osso (27,59). Ele faz parte da organização e estabilidade da matriz extracelular e responsável pela sua resistência à tensão, além de participar de processos importantes no corpo humano como o desenvolvimento dos órgãos e tecidos, cicatrização e remodelamento tecidual (17,60). A resistência do osso depende principalmente da distribuição e densidade da mineralização da matriz inorgânica (24).

Outro colágeno importante para o tecido ósseo é o Colágeno Tipo V, presente em tecidos que expressam Colágeno Tipo I, uma vez que age como agente regulatório de sua fibrilogênese (Figura 4) (61,62). Sua molécula é composta por uma tripla hélice contendo três cadeias polipeptídicas, cada uma formada por aproximadamente 1000 aminoácidos.

Altos níveis de Colágeno Tipo V são expressos em tecidos doentes, como os neoplásicos, ateroscleróticos, fibróticos e granulomatosos (61). De modo geral, este tipo de colágeno representa apenas 2% do tecido ósseo, porém em tecidos doentes ou de pacientes tabagistas ele pode apresentar em grandes quantidades (62).



**Figura 4:** Representação da fibra de colágeno. Fonte: Adaptado de Musiime M, 2021 (63).

### 1.5. Alterações do metabolismo ósseo por ação do tabagismo

Os modelos experimentais e estudos *in vitro* têm sido importantes ferramentas para melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos que explicam os efeitos deletérios promovidos pelo tabagismo aos ossos. Em um estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, demonstramos que camundongos expostos à fumaça de cigarro por 45 dias, já apresentaram comprometimento da mineralização óssea com redução da espessura trabecular e da taxa de formação óssea, bem como da superfície de mineralização. Concomitante foi observado aumento da ação da osteoclastogênese (64).

Em um outro estudo quando avaliado a análise temporal das alterações estruturais em camundongos expostos a fumaça de cigarro por 6 meses, observamos redução da área trabecular, assim como diminuição do número de trabéculas e espessura destas estruturas desde o primeiro mês de exposição, e que ocorreu de forma progressiva ao longo do tempo. O mesmo padrão foi observado para as análises de porcentagem de Colágeno Tipo I (65).

Diversos estudos demonstram os efeitos deletérios do tabaco no tecido ósseo de pacientes como redução da densidade mineral óssea e aumento da incidência de osteoporose (15), aumento da incidência de fraturas (66), aumento do estresse oxidativo

(67). Assim compreender os mecanismos envolvidos na reabsorção e mineralização óssea faz-se necessário para otimizar os tratamentos clínicos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com doenças ósseas.

**JUSTIFICATIVA**

## **2. JUSTIFICATIVA**

Uma vez que o aumento osteoclastogênese e inibição da osteoblastogênese acarreta maior fragilidade óssea e está presente em processos inflamatórios envolvidos no desenvolvimento de doenças que acometem o sistema esquelético, e que o diversos estudos já demonstraram o efeito deletério do tabagismo sobre o tecido ósseo resultando em maior fragilidade deste tecido, pretendemos neste estudo, avaliar quais são as diferenças entre os indivíduos tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas, considerando os tipos celulares e quimiocinas envolvidas na manutenção da constituição do tecido ósseo.

**OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivos gerais**

Comparar os pacientes com artrose de quadril o impacto do tabagismo no processo inflamatório local, metabolismo ósseo e histoarquitetura óssea de pacientes submetidos a artroplastia total de quadril nos diferentes grupos Fumantes, Ex-fumantes e Controle.

#### **3.2.Objetivos específicos**

Avaliar tecido esponjoso retirado da epífise femoral proximal de pacientes fumantes, ex-fumantes e não fumantes submetidos à cirurgias de artroplastia total de quadril para avaliação de tipos celulares, quimiocinas específicas ao metabolismo ósseo, bem como dos principais componentes da matriz extracelular constituinte do tecido.

## **MÉTODOS**

## **4. MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP-FMUSP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelo parecer 3.120.116 juntamente com a Plataforma Brasil. Todos os indivíduos incluídos neste estudo após aceitarem participar da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

### **4.1. Casuística**

Para este estudo foram incluídos 104 indivíduos submetidos a artroplastia total de quadril no período de fevereiro de 2019 a 15 de janeiro de 2022 provenientes do Hospital Municipal de São José dos Campos. Foi utilizado tecido ósseo esponjoso retirado da epífise femoral proximal cabeça do fêmur de pacientes que foram previamente avaliados e indicados à cirurgias de artroplastia total de quadril com diagnóstico de artrose. Os riscos desta pesquisa estão relacionados à contaminação no sítio cirúrgico que serão minimizados pelos instrumentos cirúrgicos estéreis e de proteção individual como capote cirúrgico, gorro, máscara e luvas estéreis. Os tecidos coletados a fins desta pesquisa, seriam descartados após a remoção cirúrgica e que neste caso não se identifica nenhum risco adicional, visto que o doador já iria ser submetido ao procedimento por indicação médica prévia.

Os pacientes que foram convidados a participar da pesquisa, responderam ao questionário elaborado (Questionário da Pesquisa em anexo). Neste questionário foram coletados dados demográficos, história médica, carga tabágica (anos maço), classificação radiológica de Tönnis, uso de corticóide, menopausa e etilismo. Todos os pacientes participantes inclusos nesta pesquisa assinaram o TCLE.

Foram coletadas 104 amostras de pacientes que foram divididos em grupos, conforme hábito tabágico:

Grupo Fumo: indivíduos tabagistas (n=33).

Grupo Ex-fumo: nesta pesquisa foi considerado indivíduos ex-tabagistas aqueles que cessaram fumo  $\geq 6$  semanas (n=31).

Grupo Controle: indivíduos não tabagistas e sem histórico de tabagismo (n=40).

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, acima de 40 anos com diagnóstico de osteoartrose que possuíam indicação cirúrgica para artroplastia total de quadril, submetidos as cirurgias no Hospital Municipal de São José dos Campos no período de fevereiro de 2019 a 15 de janeiro de 2022. Foram excluídos os indivíduos que apresentaram doenças autoimunes e/ou oncológicas.

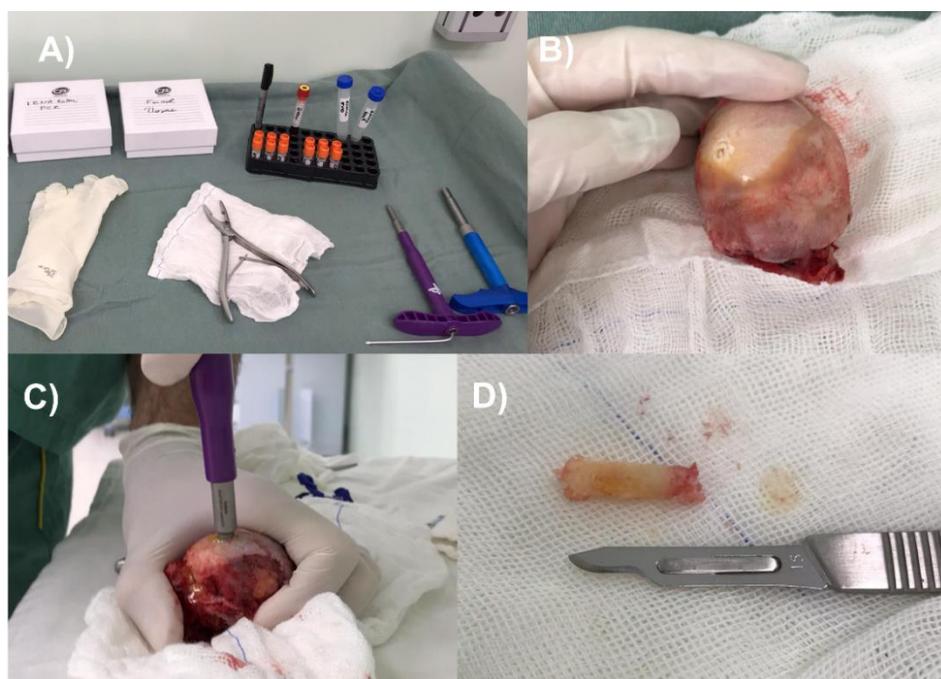
Estudos demonstram alterações na constituição do metabolismo ósseo em pacientes fumantes. Pretendemos neste estudo avaliar em uma amostra de 20 pacientes estimado com poder de 80% pelo aumento de 27,8pg/ml da citocina OPG avaliada em fluído peri-implantar de pacientes fumantes comparado a pacientes não fumantes com desvio padrão (DP) de 27,75 considerando uma perda de 20% ao longo do estudo (68). O material coletado utilizado nesta pesquisa, será mantido e armazenado pelo prazo de até 60 meses, tempo necessário para conclusão do protocolo e publicação dos resultados.

#### **4.2.Coleta e processamento do tecido**

As coletas foram realizadas no centro cirúrgico e coletado amostra de tecido ósseo da cabeça do fêmur (Figura 5). Para coleta do tecido ósseo foi utilizada trefina 5,5mm e foi armazenado em tubos de criogenia estéreis 2ml, em seguida o tecido foi direcionado para as diferentes técnicas: histologia, ELISA e RT-qPCR.

As amostras direcionadas para técnica de histologia foram retiradas a partir da trefina, mantidas em ácido nítrico em ar ambiente por 48 horas após a coleta. Posteriormente foram processadas e emblocadas em parafina para análise histológica.

As amostras direcionadas para as técnicas de ELISA ou RT-qPCR foram mantidas em freezer a menos 70°C e armazenadas até o momento do processamento.



**Figura 5.** Protocolo de coleta do tecido ósseo no centro cirúrgico. (A) Kit utilizado para coleta das amostras (B) Tecido ósseo da cabeça do fêmur retirada no centro cirúrgico após cirurgia (C) Coleta tecido ósseo com trefina (D) Tecido ósseo coletado.

### 4.3.Homogenato do tecido ósseo

O tecido ósseo foi pulverizado a partir de um equipamento produzido sob medida (Figura 6). O material direcionado para análise RT-qPCR recebeu 1ml de Trizol para avaliação da expressão gênica e o material direcionado para técnica de ELISA recebeu 1ml PBS pH 7.0 para avaliação das proteínas.



**Figura 6.** Pulverização do tecido ósseo. Equipamento produzido sob medida utilizado para extração do tecido em baixas temperaturas (-80°C). A pistola realiza uma pressão sob o tecido em nitrogênio líquido e

fragmenta a amostra em estruturas. No material contém em sua base espaço para colocação de gelo seco e em cima é colocado o tecido ósseo e nitrogênio líquido.

#### **4.4. Avaliação da Expressão de Citocinas no tecido ósseo**

Para os ensaios, foram utilizadas microplacas (Costar, EUA) e sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após bloqueio, lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para revelação da ligação, adicionamos uma solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno. A leitura da reação foi a 450nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecules Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes, e corrigidas pelos valores de proteína total correspondentes.

Foram utilizados os kits específicos para humanos da marca R&D Systems (Boston, EUA) para detecção de TNF- $\alpha$  (Abcam, Cambridge, UK; Human TNF- $\alpha$  kit AB181421; limite de detecção de 15.63 pg/ml - 1000 pg/ml), IL-6 (Abcam, Cambridge, UK; Human Kit AB46027; limite de detecção de 6.25 pg/ml - 200 pg/ml), IL-1 $\beta$  (Abcam, Cambridge, UK; Human IL-1 $\beta$  Kit AB214025; limite de detecção de 14.06 pg/ml - 900 pg/ml), RANKL (R&D Systems, CA, USA, DY626 Human DuoSet; limite de detecção 78,1-5000 pg/ml), OPG (R&D Systems, CA, USA, DY805 Human DuoSet; limite de detecção 62,5-4000 pg/ml).

##### **4.4.1. Dosagem proteica**

Para quantificação das proteínas totais o tecido ósseo foi pulverizado e mantido em 1.000 $\mu$ l PBS pH 7.0. As dosagens proteicas dos diferentes preparados antigênicos foram feitas utilizando o método de Bradford (Protein Assay, Bio-rad, California, USA) na diluição de 1:5 e uma curva de proteína conhecida albumina de soro bovino (BSA, SigmaAldrich, St.Louis, MO), nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 (mg/ml). As

amostras foram diluídas na titulação de 1:10, sendo 6 µl da amostra diluída e adicionados 300 µl de reagente de Bradford em uma placa de 96 poços. Após a distribuição das amostras, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos, e a leitura realizada em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecular Devices) sob absorvância de 570 nm. Os valores obtidos em absorvância foram corrigidos pelo seu valor de branco (Bradford) foram convertidos e expressos em µg/ml.

#### **4.4.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

As placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 100 µl/poço com proteínas de *T. gondii* (extrato antigênico solúvel), suspensas em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9.5, na concentração de 10 µg/ml de antígeno. Após sensibilização por 20 horas à 4°C, em câmara úmida e foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2, contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de solução de leite desnatado (Molico) em PBST durante 1 hora em estufa a 37°C.

Após o bloqueio, as placas foram lavadas três vezes e as amostras foram diluídas 100 µl/poço foram depositadas nas placas e incubadas a 37°C por 1 hora. Após três novas lavagens, foram aplicados 100 µl por cavidade de conjugado imunoenzimático marcado com peroxidase e a placa novamente incubada por 1 hora a 37°C.

Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5.8, contendo OPD 0,4mg/ml e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático de microplacas a 492 nm (Labsystems Multiskan MS).

#### 4.4.3. ELISA de captura

A técnica foi desenvolvida com a metodologia descrita por Carvalho et al., 2008, com modificações realizadas para o aprimoramento e padronização da nossa técnica de captura. Placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar®) foram sensibilizadas com 100 µl/ poço com proteína A, suspensas em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9.5, na concentração de 10µg/ml de Proteína A. Após sensibilização por 20 horas à 4°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2, contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de solução de leite desnatado (Molico®) em PBST durante 1 hora em estufa a 37°C.

Após bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes e as amostras de soros e saliva (100µl/poço), diluídas em PBST contendo 5% de leite desnatado, foram depositadas nas placas e incubadas a 37°C por 1 hora. Após 3 novas lavagens, foram aplicados 100µl por cavidade do antígeno de *T. gondii* Biotinilado e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C.

Após lavagem, foram aplicados 100µl por cavidade do complexo avidina-peroxidase e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C.

Após lavagem, as reações foram reveladas com diferentes cromógenos como, OPD e TMB, sendo utilizada para cada revelador uma solução de bloqueio específica. A reação revelada por OPD recebeu à adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5.8 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e foi interrompida, após 30 minutos, pela adição de HCl 4N. Para o TMB foi utilizado ácido sulfúrico (1M) para bloqueio da reação e as leituras da reação foram realizadas a 450 nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Moleculas Devices).

#### **4.5. Expressão Gênica no tecido ósseo**

A expressão gênica COL1A1 e COL5A1 foram avaliadas pela RT-qPCR. Os tecidos foram previamente pulverizados para extração do RNA total de acordo com o protocolo padrão de isolamento de RNA Trizol® (Invitrogen). Amostras do RNA total foram quantificadas através da aferição da densidade óptica (Nano Vue Plus® Spectrophotometer; GE) e a expressão gênica foi determinada através de uma reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa em tempo real utilizando GAPDH como um gene de manutenção (“housekeeping gene”).

##### **4.5.1. Transcrição reversa**

Todas as misturas para a reação de transcriptase reversa foram preparadas utilizando o kit Superscript Platinum III One-Step (Invitrogen) e realizadas no termociclador Step One® (Applied Biosystems). A síntese de cDNA foi realizada a temperatura de 50°C por 10 minutos. Após isto, a RT-qPCR foi realizada com utilização dos *primers*.

##### **4.5.2. RT-qPCR**

A expressão gênica foi avaliada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real em termociclador *Rotor Gene* (Qiagen) e kit *Syber Green* como marcador fluorescente (Qiagen). As reações aconteceram nas seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos (desnaturação) e 60°C por 10 segundos (anelamento e extensão). Os produtos do RT-qPCR foram submetidos à corrida em gel de agarose para confirmação dos tamanhos dos fragmentos e especificidade da reação. Os *primers* foram desenhados e utilizados para quantificar os RNA mensageiros (RNAm) codificados pelos genes listados na Tabela 1. A análise dos resultados foi realizada através do *software* disponibilizado pelo fabricante. O número arbitrário de cópias dos genes de

interesse e constitutivos foram calculados pela fórmula  $(1000000/2^{CT})$  para cada amostra, onde CT é o número de ciclos de amplificação necessários para atingir o limiar determinado na fase exponencial da curva. Os valores foram apresentados como número de cópias relativas ao controle após correção com o constitutivo GAPDH. A sequência de *Primers* utilizados estão descritos na tabela a seguir: (Tabela 1).

<i>Gene</i>	<i>5' Primer (5'-3')</i>	<i>3' Primer (5'-3')</i>
<i>COL1A1</i>	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT	CTCCTCGCTTTCCTTCTCT
<i>COL5A1</i>	GTGGCACAGAATTGCTCTCA	TCACCCCTCAAACACCTCCTC
<i>GAPDH</i>	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	CTTGGGCTACACTGAGGACC

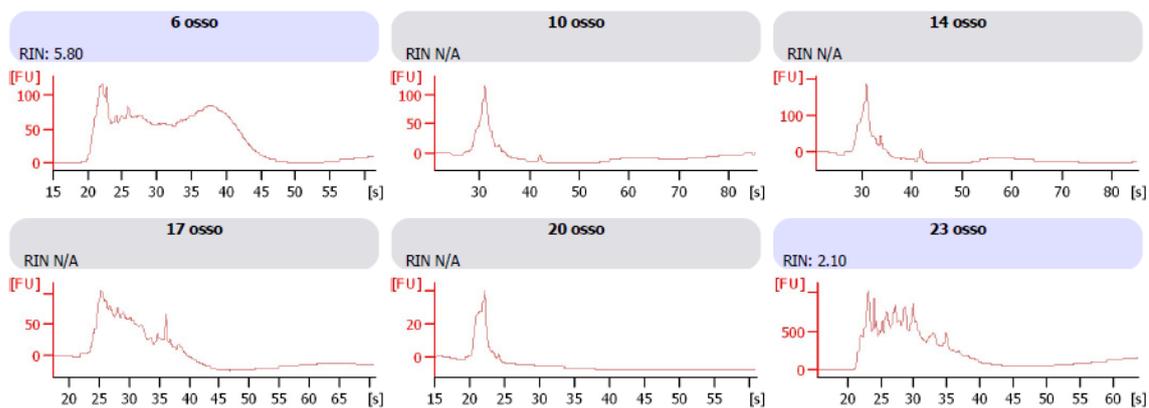
**Tabela 1:** Sequências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados no RT-qPCR.

As sequencias de genes foram adquiridas através do endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. O programa que foi utilizado para a montagem do mapa de genes da sequência escolhida pode ser encontrado no endereço eletrônico: <http://www.genome.ucsc.edu>.

As condições utilizadas para a RT-qPCR foram: temperatura de 95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto por 35 ciclos. As amostras do grupo controle foram utilizadas como calibradores e a expressão relativa foi calculada através do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 4.5.3. Avaliação da qualidade do material coletado

Para validar a forma que foi realizado o transporte e coleta dos tecidos, avaliamos a qualidade e detecção de degradação das amostras através do equipamento Bioanalyzer 2100, utilizado para o controle de qualidade de biomoléculas. O sistema integra um instrumento de software de processamento de dados, reagentes e um chip microfluídico específico para análise de DNA, RNA ou proteína (Figura 7). Resultados obtidos foram validados e aprovados para seguir com o protocolo de análise.

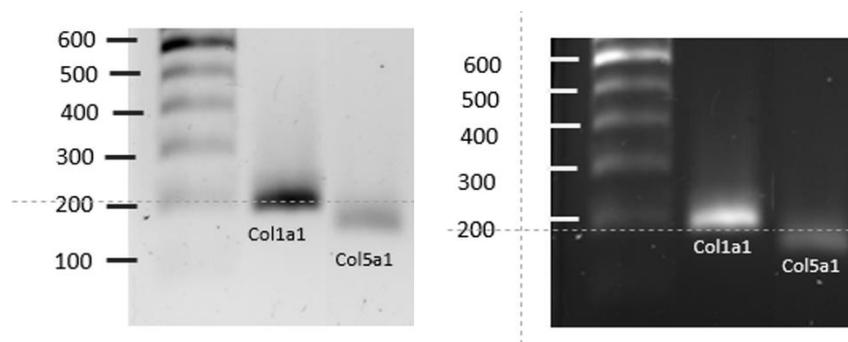


**Figura 7.** Resultados da análise da qualidade do tecido coletado.

Os resultados obtidos nas análises demonstraram qualidade adequada para utilização do tecido ósseo coletado no centro cirúrgico e transportados as dependências da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 4.5.4. Validação dos primers

Para avaliar a qualidade dos primers desenvolvidos e verificar o peso molecular dos genes COL1A1 e COL5A1 foi avaliado através do Western Blotting, dos genes COL1A1 e COL5A1, 227 e 168 respectivamente (Figura 8). O teste da qualidade dos primers desenvolvidos foi validado e aprovado para seguir com o protocolo de análise.



**Figura 8.** Avaliação do peso molecular dos genes desenhados.

#### **4.6.Histologia e Morfometria**

O tecido ósseo foi coletado e descalcificado com solução de ácido nítrico 7% por 48 horas, lavado em água corrente por 10 minutos, um banho de água corrente e imerso em álcool 70%. As amostras foram processadas através do Processador de Tecidos HistoCore PEARL e posteriormente o tecido foi incluído em parafina. Foram realizados cortes com 4µm de espessura com um espaço de 50 µm entre eles para utilização nas técnicas de coloração histológica.

##### **4.6.1. Análise da Área Trabecular**

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e foi utilizado microscópio Olympus BX-51 (Olympus Co, Tóquio, Japão) para análise de imagem. O sistema utilizado consistia em uma câmera Sony CCD acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens eram visualizadas no monitor. Por meio de um sistema digital inserido em um computador (Pentium 4), as imagens foram processadas pelo software Image Pro Plus 6.0. As lâminas foram analisadas às cegas, com 5-10 campos selecionados aleatoriamente na região trabecular em um aumento de 40x e a área total de tecido analisada em cada campo foi medida pelo software Image Pro Plus 6.0. A área trabecular foi dividida pela área total do tecido analisado. Resultado foi expresso em porcentagem.

##### **4.6.2. Imunofluorescência para Colágeno Tipo I e V**

Para a imunofluorescência do Colágeno Tipo I e V os cortes de 4µm de espessura do tecido ósseo foram aderidos em lâmina tratadas com um adesivo de Poly-L-Lisina, superfície hidrofóbica e colorida com tinta epóxi de alta resistência para facilitar o processo de marcação e fixação do tecido ósseo. Foi realizada desparafinização dos cortes

através da imersão das lâminas em xilol aquecido, a 60°C, por 30 minutos, e dois banhos de 10 minutos em xilol em temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-70%), seguido de lavagem em água corrente, por 10 minutos, um banho em água destilada e 15 minutos em PBS, pH 7.5. Para a exposição e 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/500µl em ácido acético 0,5 N, por 30 minutos, a 37°C. Ao término desta 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, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos policlonais de coelho anti-colágeno tipo I (1:100; Rockland) diluídos em solução de PBS. Após este período, os cortes foram lavados em PBS, com Tween20 0,05% e incubados por 1 hora com os anticorpos de cabra anti-IgG de coelho ALEXA 488 (Invitrogen, Life Technologies) diluídos 1:200 em Azul de Evans. 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).

#### **4.6.3. Histomorfometria do Colágeno Tipo I e V por análise de imagem**

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan) e quantificadas por um sistema de análise de imagem. O sistema que foi utilizado consiste em uma câmera CCD Sony, acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium 4), as imagens foram processadas por um software Image-Pro Plus 6.0. As amostras foram analisadas às cegas, sendo

selecionados aleatoriamente 5-10 campos em região de trabéculas em um aumento de 400x. A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo software Image-Pro Plus 6.0. O colágeno presente nos campos adquiridos foram avaliados através da seleção da tonalidade verde fluorescente, correspondente a cada colágeno marcado. A área imunomarcada foi dividida pela área total do tecido analisado e o resultado foi expresso em porcentagem.

#### **4.6.4. Apoptose dos osteoblastos**

Para realizar análises de apoptose dos osteoblastos, as lâminas foram desparafinizadas em xilol quente a 60-65 °C e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, água corrente e água destilada. Os epítomos foram recuperados por alta temperatura em solução de citrato 10 mM (pH=6,0) e os sítios reativos de oxidação não específicos foram bloqueados com peroxidase endógena em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas overnight a 4 °C com anticorpo primário Caspase-3 anticorpo policlonal IgG anti-coelho (H-277: sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, Ca, EUA) diluído (1:100) em PBS e incubado em temperatura ambiente por 60 min. Após esse período, os cortes foram lavados com tampão fosfato (PBS, pH=7,4) e incubados com anticorpo secundário de acordo com a origem do primer do anticorpo a 37 °C. Finalmente, para o desenvolvimento, solução de cromogênio (DAB) e hematoxilina de Harris foram usadas para contra coloração. A diluição foi padronizada e está descrita na tabela 2. Para o desenvolvimento, usamos o Vectastin Abc Kit, Vector Laboratories (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou Envision + Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, CA, EUA). As amostras foram analisadas às cegas, com 5-10 campos selecionados na região da superfície trabecular em uma ampliação de 400x. A densidade de células positivas foi analisada e contada com o software Image Pro Plus 6.0. O

resultado foi expresso em células/ $\mu\text{m}^2$ . Finalmente, para a revelação foi utilizada solução de cromógeno (DAB) e Hematoxilina de Harris para contracorar.

<b>Marcador</b>	<b>Anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Especificação</b>
Caspase-3	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit IgG (Vector)	1:100	H-277: sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, Ca, EUA

**Tabela 2.** Especificação do anticorpo Caspase-3

#### **4.7. Classificação Radiológica de Tönnis**

A classificação de Tönnis foi descrita por Busse (69), consiste em três graus progressivos de alterações degenerativas do quadril conforme a sua gravidade. O Grau 0 é isento de artrose, grau I indica leve estreitamento do espaço articular, leve rebordo na margem articular e leve esclerose da cabeça femoral ou acetábulo, grau II indica a presença de pequenos cistos ósseos, maior estreitamento do espaço articular e perda moderada da esfericidade da cabeça femoral e o grau III é o mais grave e indica cistos grandes, estreitamento grave do espaço articular, deformidade grave da cabeça do fêmur e necrose avascular (70). A classificação de Tönnis é amplamente utilizada por cirurgiões de artroplastia, cirurgiões artroscópicos, reumatologistas, radiologistas e fisioterapeutas (71) e sua classificação foi avaliada para entender melhor a casuística dos pacientes coletados no centro cirúrgico.

#### **4.8. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStat (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós teste

de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns foi usada para as comparações entre três grupos. Os dados foram descritos como média  $\pm$  DP e foi considerado o valor  $*p < 0,05$  estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Casuística

Em nosso estudo, predominam os pacientes que não fazem uso de álcool, não praticam atividade física e não apresentam doenças prévias. A média do nosso IMC em sua grande parte são pacientes com sobrepeso entre 60 a 75 anos de idade entre ambos os sexos, feminino e masculino. Neste estudo a carga tabágica do Fumo foi estatisticamente superior ao grupo Ex-fumo (\*p=0,002). Isto se deve ao fato de os pacientes fumantes permanecerem por um período maior expostos ao tabaco.

Foram coletados 104 casos de pacientes. As características como idade, índice de massa corporal (IMC), sexo, anos maço, uso de corticoide, número de cigarros fumados diariamente, anos de tabagismo, etilismo, prática de atividade física e presença de doenças prévias estão apresentados na tabela 3 e foram coletadas a partir do questionário elaborado.

	<b>Controle (n=40)</b>	<b>Ex-fumo (n=31)</b>	<b>Fumo (n=33)</b>	<b>P *</b>
Idade (anos)	57,41±15	61,323±12	60,545±11	-
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,77±5	26,21±4	27,50±5	-
Sexo: Masculino/Feminino (n)	20/20	15/16	22 /11	-
Carga tabágica (Anos maços)	-	6,956±7,946	19,230±21,445*	P*=0,002
Uso de corticoide (Sim)/(Não)	3/40	1/31	0/33	-
Uso de álcool (Sim)/(Não)	3/40	3/31	3/33	-
Prática atividade física (Sim)/(Não)	8/40	7/31	4/33	-
Presença de doenças prévias (Sim)/(Não)	10/40	8/31	5/33	-
Mulheres menopausa	15/20	15/16	10/11	-

**Tabela 3.** Dados dos pacientes coletados. Resultados apresentados como média ± DP. \*p=0,002 comparado ao grupo Ex-Fumo.

A carga tabágica (anos-maço) de cada indivíduo foi calculada pela seguinte fórmula: número de cigarros consumidos por dia, dividido por 20 e multiplicado pelo número de anos de exposição ao tabaco.

Foi coletado os dados em que os pacientes do grupo Ex-fumo cessaram o tabagismo (Tabela 4).

<b>Tempo em anos que os pacientes do grupo Ex-fumo cessaram o hábito tabágico (n=31)</b>	<b>%</b>
1-2 anos	12,5%
2-5 anos	6,25%
5-10 anos	12,5%
Acima de 10 anos	68,75%

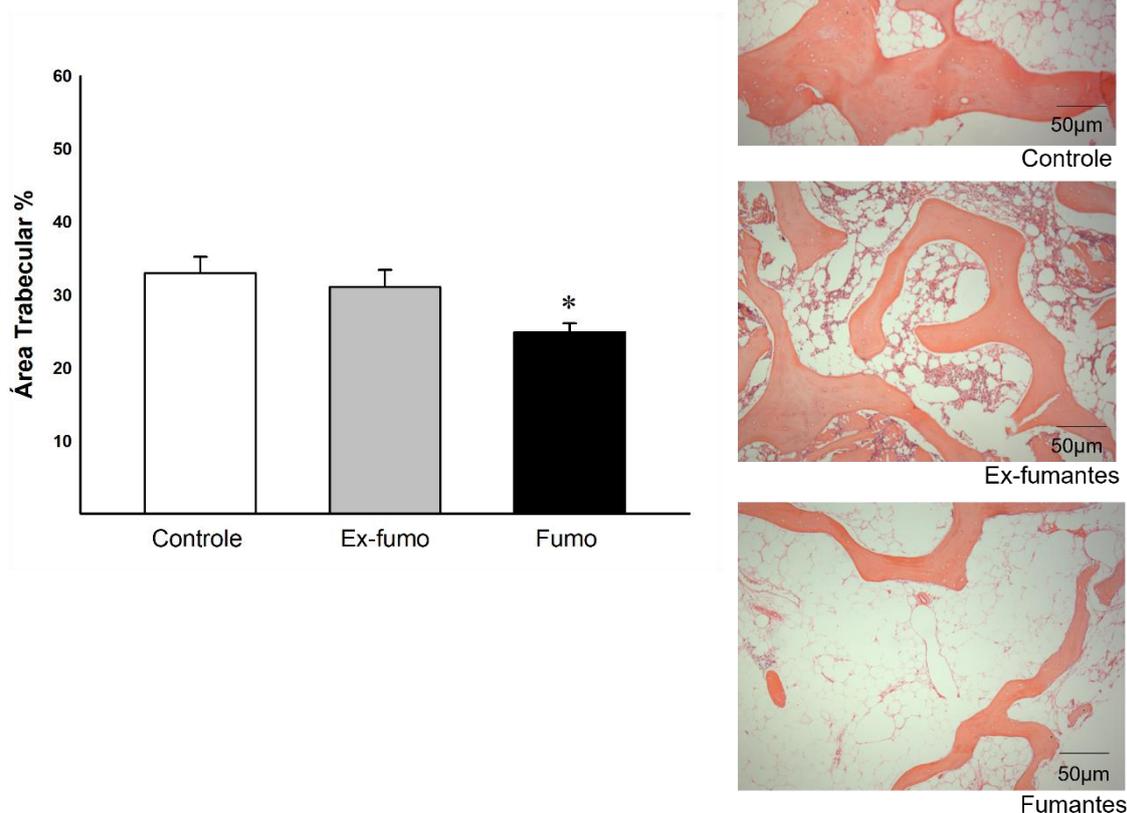
**Tabela 4.** Tempo em anos que os pacientes do grupo Ex-fumantes cessaram o fumo.

<b>Classificação radiológica Tönnis</b>	<b>Controle (n=40)</b>	<b>Ex-fumo (n=31)</b>	<b>Fumo (n=33)</b>
Classificação Grau 0	0/40	0/31	0/33
Classificação Grau I	1/40	1/31	0/33
Classificação Grau II	25/40	16/31	19/33
Classificação Grau III	14/40	14/31	14/33

**Tabela 5.** Classificação radiológica para diferentes graus de artrose.

## 5.2. Área trabecular

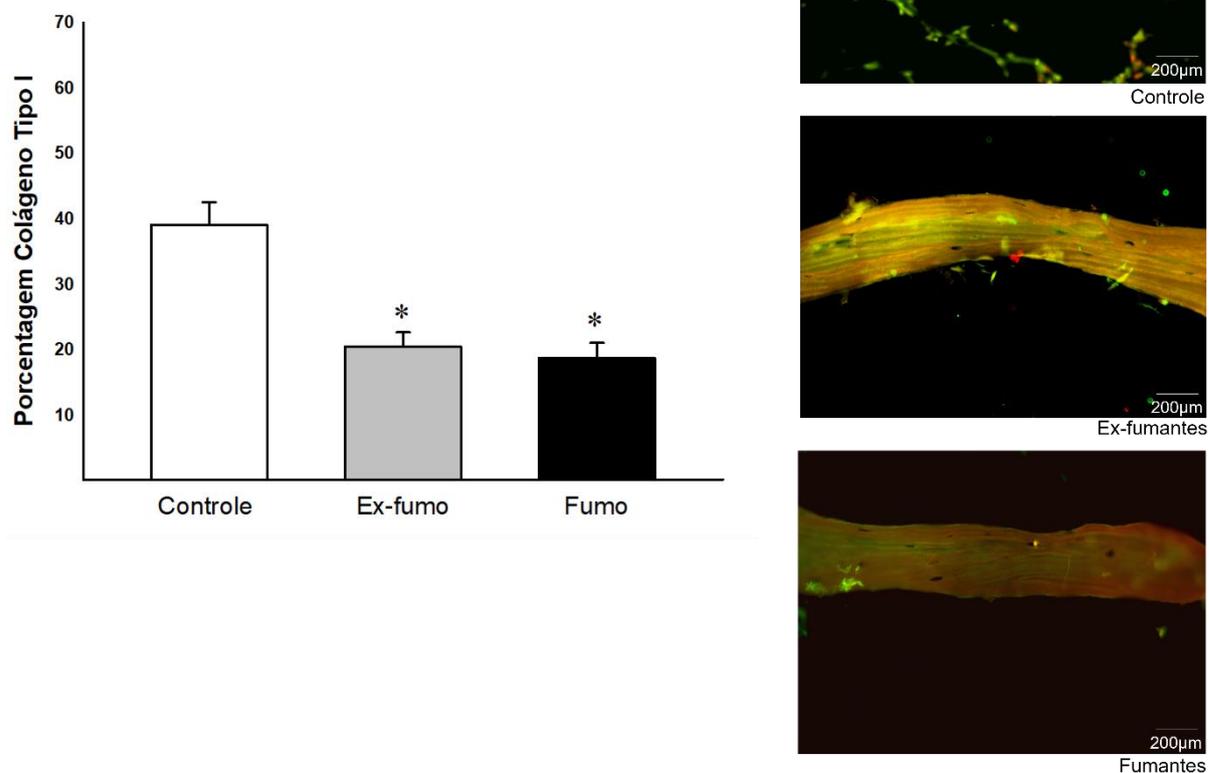
Observamos uma redução significativa da área trabecular nos indivíduos do grupo Fumo comparado ao grupo Controle (\*p=0,023) (Figura 9).



**Figura 9.** Área trabecular nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo. Houve uma redução significativa para o área trabecular no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (\* $p=0,023$ ). (Controle  $n=19$ , Ex-fumo  $n=22$ , Fumo  $n=22$ ). Fotomicrografia das trabéculas do tecido ósseo. Aumento de 40x e barra de escala de 500µm. Dados expressos como média  $\pm$  DP

### 5.3. Porcentagem de Colágeno Tipo I

Observamos uma redução significativa da porcentagem de Colágeno Tipo I nas trabéculas nos indivíduos do grupo Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle (\* $p<0,001$ ) (Figura 10).

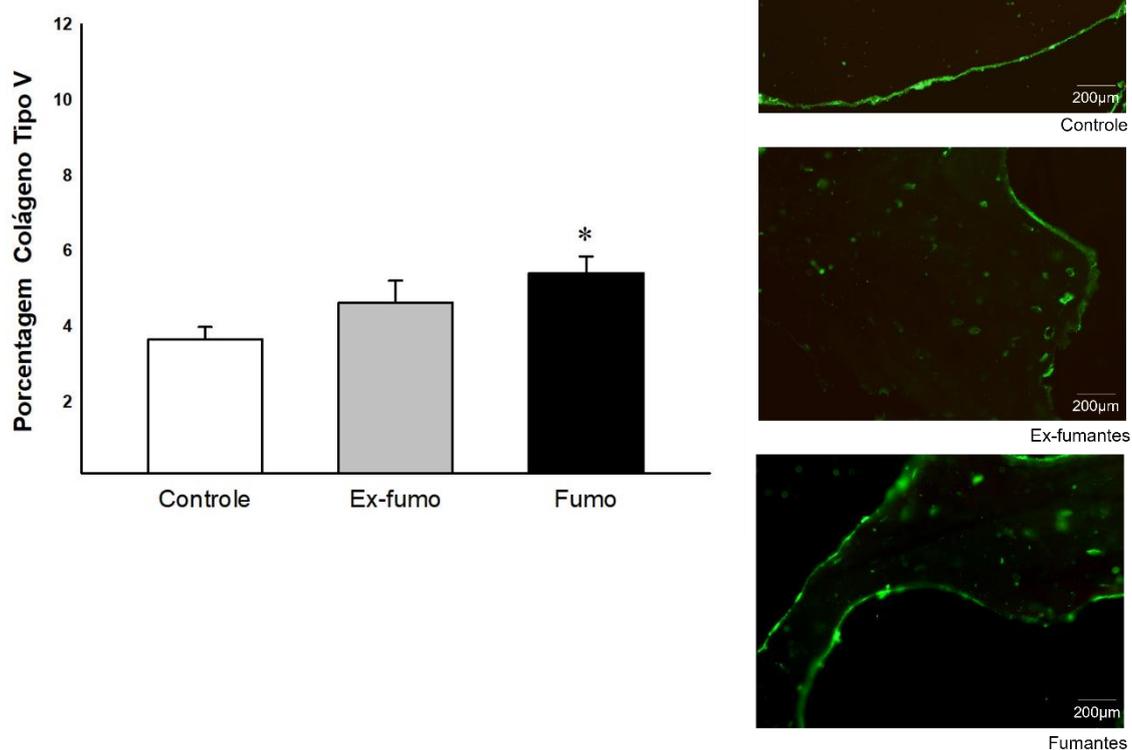


**Figura 10.** Colágeno Tipo I nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo. Houve uma redução significativa para Colágeno Tipo I no grupo Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle (\* $p < 0,001$ ). (Controle  $n=20$ , Ex-fumo  $n=20$ , Fumo  $n=19$ ). Fotomicrografia das lâminas histológicas com marcação específica para as fibras de Colágeno tipo I. ■ Positividade para Colágeno Tipo I. Aumento de 40x. Dados expressos como média  $\pm$  DP.

#### 5.4. Porcentagem de Colágeno Tipo V

Observamos uma redução significativa da porcentagem de Colágeno Tipo V nas trabéculas nos indivíduos do grupo Fumo comparado ao grupo Controle (\* $p < 0,001$ ).

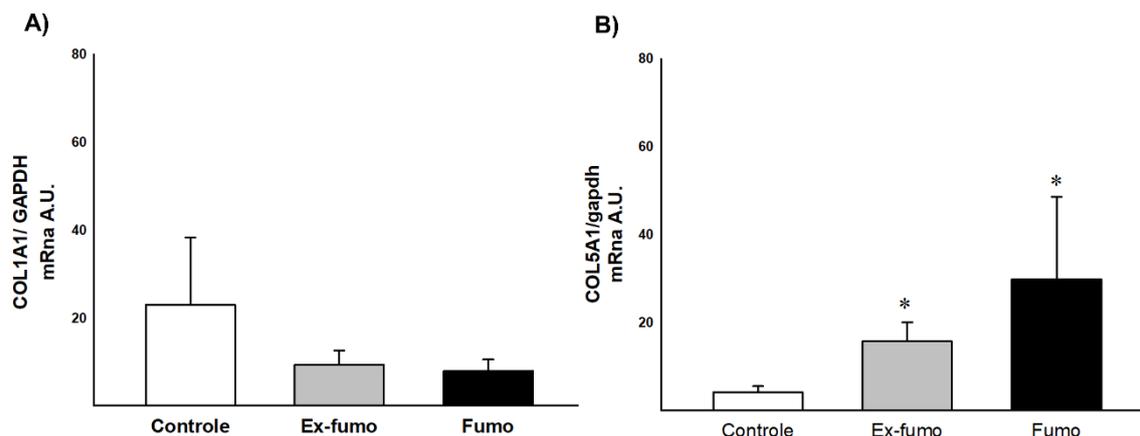
(Figura 11).



**Figura 11.** Colágeno Tipo V nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo. Houve um aumento significativo para Colágeno Tipo V no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (\* $p < 0,001$ ). (Controle  $n=12$ , Ex-fumo  $n=16$ , Fumo  $n=16$ ). Fotomicrografia das lâminas histológicas com marcação específica para as fibras de Colágeno Tipo V. ■ Positividade para Colágeno Tipo V. Aumento de 400x. Dados expressos como média  $\pm$  DP.

### 5.5. Expressão gênica COL1A1 e COL5A1

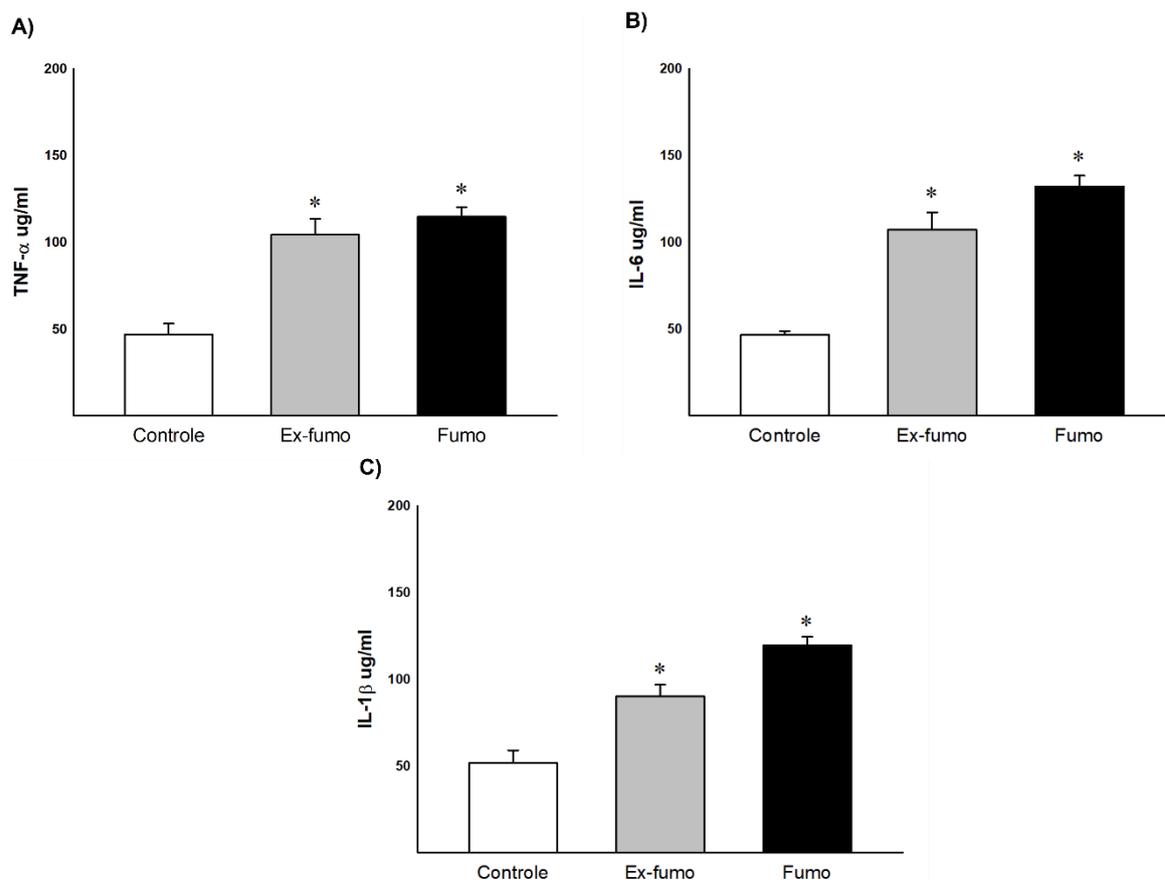
Para expressão gênica do COL1A1, observamos uma tendência a redução nos indivíduos do grupo Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle e para expressão gênica do COL5A1, observamos um aumento significativo nos indivíduos do grupo Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle (\* $p < 0,001$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Expressão gênica para COL1A1 e COL5A1 nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo. (A) Houve uma tendência a redução da expressão de COL1A1 nos grupos Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle. (B) Houve um aumento significativo para a expressão gênica dos grupos Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle (\* $p < 0,001$ ). (A) Controle  $n=30$ , Ex-fumo  $n=16$  Fumo  $n=22$ ; (B) Controle  $n=25$ , Ex-fumo  $n=13$ , Fumo  $n=21$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP.

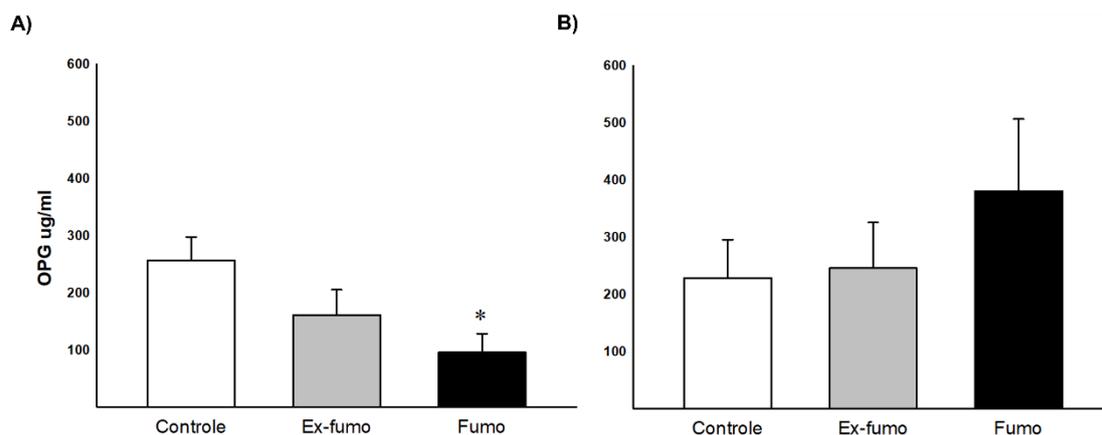
## 5.6. Quantificação proteínas método ELISA

Observamos um aumento significativo da expressão das proteínas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  nos grupos Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle no homogenato do tecido ósseo (A \* $p=0,001$ ), (B \* $p=0,001$ ) e (C \* $p=0,001$ ) respectivamente (Figura 13).



**Figura 13.** Expressão proteica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo no homogenato do tecido ósseo. Observamos um aumento significativo para expressão das proteínas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  nos grupos Ex-fumo e Fumo comparado ao grupo Controle respectivamente (A \* $p=0,001$ ), (B \* $p=0,001$ ) e (C \* $p=0,001$ ). (A) Controle  $n=16$ , Ex-fumo  $n=22$ , Fumo  $n=25$ ; (B) Controle  $n=16$ , Ex-fumo  $n=18$ , Fumo  $n=25$ ; (C) Controle  $n=13$ , Ex-fumo  $n=16$ , Fumo  $n=25$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP.

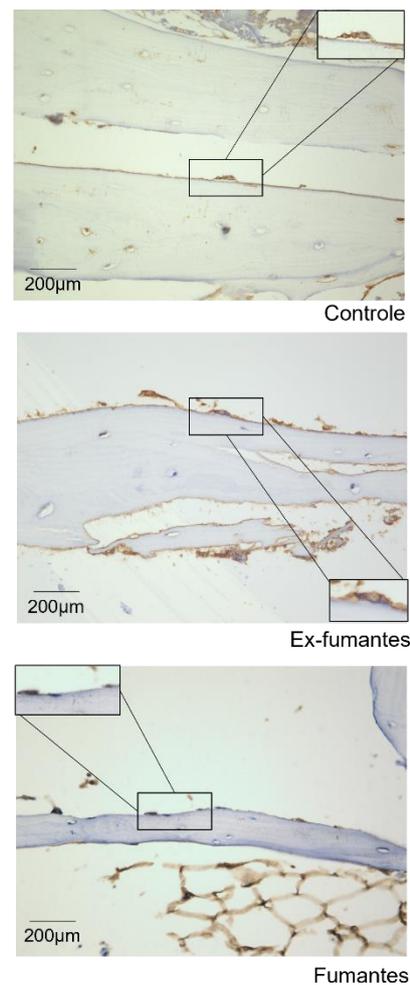
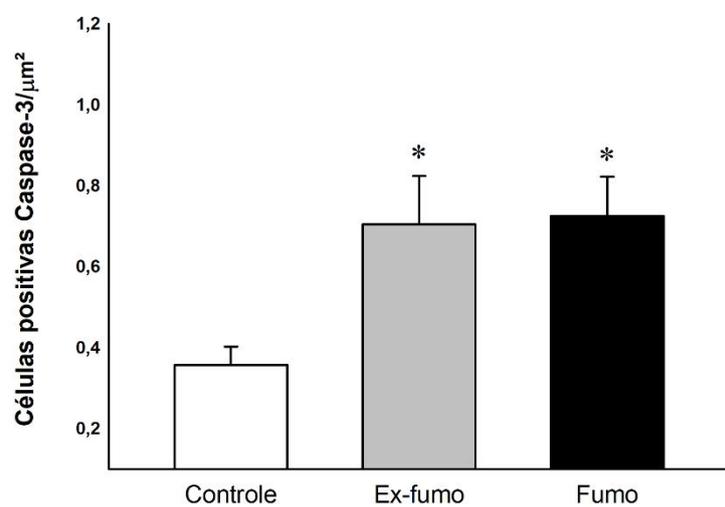
Para expressão proteica de OPG observamos uma redução significativa no grupo Fumo comparado ao grupo Controle no homogenato do tecido ósseo (A \* $p=0,014$ ). Para avaliação proteica de RANKL observamos uma tendência a aumento no grupo Fumo comparado ao grupo Controle no homogenato do tecido ósseo, entretanto não foi observado diferenças estatísticas (Figura 14).



**Figura 14.** Expressão proteica de OPG e RANKL nos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo no homogenato do tecido ósseo. (A) Observamos uma redução significativa para expressão das proteínas de OPG no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (A \* $p=0,014$ ). (B) Observamos uma tendência a aumento da expressão das proteínas de RANKL no grupo Fumo comparado ao grupo Controle. (A) Controle  $n=24$ , Ex-fumo  $n=24$ , Fumo  $n=21$ ; (B) Controle  $n=8$ , Ex-fumo  $n=13$ , Fumo  $n=16$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP.

### 5.7. Porcentagem células positivas Caspase-3

Quando avaliamos a porcentagem dos osteoblastos positivos para Caspase-3, observamos um aumento significativo no grupo Ex-fumo e Fumo comparado ao grupo Controle (\* $p=0,05$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Densidade de células positivas para Caspase-3 nas trabéculas dos grupos Controle, Ex-fumo e Fumo. Observamos um aumento significativo da densidade de células imunopositivas para Caspase-3 nos grupos Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle (\* $p=0,05$ ). (Controle  $n=12$ , Ex-fumo  $n=12$ , Fumo  $n=10$ ). Dados expressos como média  $\pm$  DP.



## 6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o tabagismo promoveu uma piora dos parâmetros morfológicos do tecido ósseo, bem como o aumento de quimiocinas pró-inflamatórias e da apoptose de osteoblastos. Além disso, também demonstramos os efeitos persistentes no processo inflamatório mesmo após os pacientes cessarem o fumo.

Nos indivíduos tabagistas demonstramos alterações no tecido caracterizadas pela redução da área trabecular, do depósito de Colágeno Tipo I e aumento do Colágeno Tipo V. Embora os ex-tabagistas não tenham apresentado diminuição da área trabecular ou aumento do Colágeno Tipo V, observamos diminuição do Colágeno Tipo I e alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias semelhantes aos pacientes tabagistas.

A diminuição da área trabecular está associada ao aumento da reabsorção do tecido ósseo, acarretando maior fragilidade do tecido ósseo, aumento da susceptibilidade a fraturas e piora do processo de consolidação após trauma (72,73).

Neste estudo, a maioria dos casos coletados do grupo Ex-fumo, apresentaram um longo período de cessação do hábito tabágico, cerca de 70% dos casos coletados que pertencem ao grupo Ex-fumo, cessaram o tabagismo há 10 anos ou mais. No entanto, pudemos observar que mesmo após longos anos sem exposição, ainda existem efeitos deletérios. Atualmente para indicação de cirurgias eletivas ortopédicas, é comum a recomendação de cessar o fumo por pelo menos 6 semanas antes das cirurgias, no entanto, com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que este período é curto, uma vez que observamos efeitos deletérios do tabaco mesmo a longo prazo.

As complicações da cicatrização óssea após a cirurgia em tabagistas e ex-tabagistas têm sido atribuídas principalmente ao comprometimento da atividade celular, levando a alterações no metabolismo do colágeno. A piora da atividade das células ósseas ocorre devido ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela

exposição ao fumo (74). Em nosso trabalho, foi possível observar altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  no homogenato de tecido ósseo de pacientes tanto do grupo Fumo quanto do grupo Ex-fumo. TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  são citocinas responsáveis pela diferenciação dos osteoclastos e a ativação da osteoclastogênese. Esses efeitos levam ao aumento da estimulação, formação e ativação de osteoclastos e o conseqüente aumento da reabsorção óssea (75–77).

Além disto, a citocina TNF- $\alpha$  é reconhecida pela indução da apoptose dos osteoblastos (78). Alikhani e colaboradores (2007) (79) quando avaliaram a apoptose de osteoblastos, observaram que existe uma relação entre o aumento da apoptose dos osteoblastos e o aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  em células osteoblásticas primárias humanas. (74) Além disso, o TNF- $\alpha$  também está diretamente envolvido na formação e na regulação da osteoclastogênese, regulando positivamente a produção por células estromais de RANKL e amplificando sinergicamente a expressão de RANK (80).

Os efeitos da reabsorção óssea também estão ligados com o aumento da IL-1 $\beta$  que atua aumentando a expressão de RANKL pelas células estromais da medula óssea e atinge diretamente os precursores dos osteoclastos, promovendo a diferenciação destas células na presença de níveis permissivos de RANKL (81).

A relação OPG/RANKL têm sido alvo de vários estudos uma vez que esta comunicação entre osteoblastos e osteoclastos via liberação de OPG evita o aumento desordenado da osteoclastogênese e conseqüentemente da reabsorção óssea (33,82)

O aumento de RANKL está associado à ocorrência de doenças como a osteoartrite e osteoporose. Neste trabalho, quando avaliamos as expressões proteicas de OPG e RANKL nos diferentes grupos estudados, observamos uma redução significativa para OPG no grupo Fumo comparado ao grupo Controle. Também observamos uma tendência a aumento de expressão proteica no grupo Fumo comparado ao grupo Controle para

RANKL. Estes dados corroboram com Lappin e colaboradores (2007) (83) que encontraram uma redução de OPG no plasma de pacientes tabagistas comparados aos pacientes não tabagistas.

A apoptose é um mecanismo que regula a morte celular, e quando ocorre de forma ordenada, contribui para a renovação de todos os tecidos. Sua função é manter a homeostase tecidual (84). O tabagismo é reconhecido pela indução do aumento da apoptose celular em diferentes tecidos do corpo, o que na maioria das vezes prejudica o processo de remodelação tecidual (85–87). A Caspase-3 é uma cisteína protease que desempenha um papel fundamental na ocorrência da apoptose (49). O aumento de Caspase-3 está associado ao aumento da apoptose de células estromais da medula óssea e dos osteoblastos (88,89). Em nossos resultados observamos o aumento significativo da apoptose dos osteoblastos nos grupos Ex-fumo e Fumo comparado ao grupo Controle. Podemos dizer que apoptose das células osteoblásticas neste trabalho pode estar associada com a redução da área trabecular do grupo Fumo.

Considerando que o equilíbrio entre a proliferação e apoptose dos osteoclastos e osteoblastos determina a renovação do tecido ósseo (78), a diminuição do Colágeno Tipo I observada em nosso estudo pode estar associada ao aumento significativo da Caspase-3 em osteoblastos nos grupos Fumo e Ex-fumo.

É importante notar que embora tanto os pacientes do grupo Fumo quanto do grupo Ex-fumo tenham apresentado aumento da apoptose dos osteoblastos concomitantemente à diminuição da deposição de Colágeno Tipo I, apenas fumantes apresentaram redução da área trabecular associado ao aumento do Colágeno Tipo V. Além disso, apenas os fumantes apresentaram redução nos níveis de OPG no tecido ósseo, sugerindo maior ativação dos osteoclastos e aumento da reabsorção óssea.

O Colágeno Tipo I confere a propriedade física de resistência às diferentes pressões sofridas por este tecido e em condições fisiológicas normais é o subtipo produzido em maior quantidade (90). Em nossa população observamos uma tendência a redução da expressão gênica para COL1A1 nos grupos Ex-fumo e Fumo corroborando com os dados que demonstraram diminuição da porcentagem de Colágeno Tipo I em ambos os grupos. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores que apresentaram associação da piora da qualidade do tecido ósseo e aumento da fragilidade óssea à diminuição da deposição de Colágeno Tipo I (65,91).

Quando avaliamos a expressão gênica COL5A1 observamos um aumento significativo da expressão nos grupos Ex-fumo e Fumo comparados ao grupo Controle. No entanto, o aumento da porcentagem de Colágeno Tipo V através da técnica de imunofluorescência só foi observada no grupo Fumo. É importante considerar que as fibras de Colágeno Tipo V regulam o diâmetro das fibrilas heterotípicas e que o aumento desse tipo de colágeno predispõe à deposição de fibras com diâmetros menores (92–95).

Nossos resultados são importantes para entender melhor o impacto do tabagismo no tecido ósseo de pacientes fumantes e que o fumo levou ao aumento da fragilidade tecidual e aumento da remodelação óssea do que quando comparados aos pacientes do grupo controle. Além disso, o prejuízo avaliado nos parâmetros morfológicos como a redução da composição das fibras de Colágeno Tipo I, aumento da apoptose dos osteoblastos e o aumento do processo inflamatório pode ser a principal explicação para o aumento da reabsorção óssea.

**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram aumento das quimiocinas pró-inflamatórias, diminuição da área de trabéculas, diminuição das citocinas que regulam a atividade de reabsorção óssea OPG/RANKL e observamos alterações na matriz orgânica com aumento do Colágeno Tipo I e redução do Colágeno Tipo V dos pacientes fumantes. Também demonstramos que a apoptose osteoblástica em associação com o aumento da reabsorção óssea acarreta alterações estruturais do tecido ósseo em fumantes, predispondo estes indivíduos a maior fragilidade óssea. Nos pacientes que cessaram o fumo pudemos avaliar os efeitos deletérios a longo prazo mesmo após longos anos sem exposição ao tabaco.



## 8. ANEXO

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

**Pesquisador:** Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 03581418.9.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.120.116

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado do Departamento de Fisiopaologia Experimental com desenho de estudo prospectivo para realização em 48 meses.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar o efeito do tabagismo sobre os mecanismos envolvidos no processo de reparção e remodelamento do tecido ósseo

**Objetivo Secundário:**

Desta forma, este trabalho terá como objetivo avaliar amostras de tecido ósseo de pacientes fumantes e não fumantes submetidos à cirurgias ortopédicas para avaliação das citocinas e fatores de crescimento específicos ao metabolismo ósseo e do disco intervertebral, bem como da análise bioquímica e da expressão gênica para a produção dos subtipos de colágenos I e V constituintes do osso e II e VI constituintes dos discos intervertebrais.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:**

Para as coletas do tecido ósseo pelas técnicas em questão, não se identificam riscos adicionais ao

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.120.116

procedimento da rotina envolvida. Os riscos para a equipe da pesquisa estão relacionados à contaminação com material biológico, sendo tomados os devidos cuidados.

**Benefícios:**

Não está previsto benefício imediato ao participante da pesquisa. Entretanto, o projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos, dos efeitos do tabagismo no aumento da fragilidade do tecido ósseo, o que favorece a proposta de novas alternativas de tratamento para seres humanos que apresentem prejuízo no reparo do tecido ósseo em consequência do hábito de fumar.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Para este estudo serão avaliados pacientes fumantes e não fumantes submetidos a cirurgias da coluna vertebral, com coleta intraoperatória de amostra de osso do corpo vertebral e do disco intervertebral, e a cirurgias eletivas de artroplastia total de quadril e joelho.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados e adequados o TCLE e as cartas de anuências das Instituições envolvidas nos procedimentos cirúrgicos para a coleta do material biológico, com responsabilidade dos pesquisadores para o transporte e análise.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto adequado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1200581.pdf	21/12/2018 17:43:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PB.docx	21/12/2018 17:43:22	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	21/12/2018 17:39:48	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Formulario_Comite_CEP.pdf	21/12/2018 17:39:12	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.120.116

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_saojose.pdf	21/12/2018 17:35:18	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_IAMSPE.pdf	21/12/2018 16:51:44	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Anexo_2.pdf	27/11/2018 13:49:59	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_PlataformaBrasil.pdf	14/11/2018 11:14:27	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 24 de Janeiro de 2019

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador(a))

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

Título do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

(TCLE / 20.12.2018)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº .....

APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD(.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº .....

APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

Rubrica do participante  
Da pesquisa

1/5

Rubrica do pesquisador

20/12/2018

Título do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

(TCLE / 20.12.2018)

### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do protocolo de pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

PESQUISADOR : Prof. Dra. Fernanda Degobbi T Q S Lopes

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico nível VI- Instituto dos LIMs-FMUSP

INSCRIÇÃO DO CONSELHO REGIONAL: 023952/01-D

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

Este projeto de pesquisa não identifica nenhum risco adicional ao paciente, uma vez que o doador já iria ser submetido a procedimentos cirúrgicos ortopédicos.

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

4 – APRESENTAÇÃO:

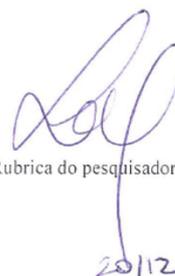
Convidamos o(a) senhor(a) a participar de uma pesquisa científica. Pesquisa é um conjunto de procedimentos que procura criar ou aumentar o conhecimento sobre um assunto. Estas descobertas embora frequentemente não tragam benefícios diretos ao participante da pesquisa, podem no futuro ser úteis para muitas pessoas.

Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) precisa entender o suficiente sobre os riscos e benefícios, para que possa fazer um julgamento consciente. Inicialmente explicaremos as razões da pesquisa. A seguir, forneceremos um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), documento que contém informações sobre a pesquisa, para que leia e discuta com familiares e ou outras pessoas de sua confiança. Uma vez compreendido o objetivo da pesquisa e havendo seu interesse em participar, será solicitada a sua rubrica em todas as páginas do TCLE e sua assinatura na última página. Uma via assinada deste termo deverá ser retida pelo senhor(a) ou por seu representante legal e uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável.

Rubrica do participante  
Da pesquisa

2/5

Rubrica do pesquisador



20/12/2018

Título do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

(TCLE / 20.12.2018)

#### 5A) JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS:

O hábito de fumar tem o potencial de alterar o metabolismo celular prejudicando o processo do reparo ósseo, além de induzir a perda óssea promovendo maior fragilidade deste tecido. Neste trabalho, temos como objetivo comparar as amostras de tecido ósseo e de pacientes que serão submetidos à cirurgia para artrodese de coluna e artroplastia total de quadril e/ou de joelho. Participarão do estudo, Pacientes Fumantes; Pacientes Fumantes Eletivos; Pacientes Não Fumantes.

Nas cirurgias de artroplastia total de quadril e/ou de joelho será utilizado material ressecado durante os tempos rotineiros da técnica, nas quais a epífise do fêmur proximal nas cirurgias de quadril e epífise do fêmur distal e epífise proximal da tíbia nas cirurgias de joelho, são retirados para substituição com implante protético articular (prótese). A coleta do material será realizada por cirurgião ortopedista experiente, treinado e habituado com esta técnica. Os doadores serão consultados, previamente à cirurgia, quanto ao interesse de doação do material, tendo completa autonomia para recusar-se a participar do estudo. Tal material ósseo é rotineiramente descartado e o seu uso para pesquisa não implica em nenhum risco adicional ao paciente.

Nas cirurgias de artrodese de coluna, o material ósseo ou cartilaginoso será obtido por uma punção padronizada de osso esponjoso do corpo vertebral durante procedimento cirúrgico da coluna vertebral, realizada por uma equipe de ortopedistas especialistas em cirurgia da coluna vertebral. Os pacientes, cuja indicação para cirurgia independem do estudo, devem ser esclarecidos e concordarem em participar e doar material, devendo ter lido e assinado o termo de consentimento livre esclarecido. Durante o ato cirúrgico, após incisão e dissecação habitual da coluna vertebral, uma punção transpedicular sob visualização direta será realizada, com coleta do material obtido. Tal punção transpedicular vertebral é realizada rotineiramente para a instrumentação vertebral com parafusos pediculares e somente será acrescentado a coleta de material ósseo, sem riscos adicionais ao paciente além dos inerentes ao procedimento cirúrgico original.

#### 5B) Desconfortos, riscos e benefícios

Para as coletas do tecido ósseo pelas técnicas em questão, não se identifica nenhum risco adicional, visto que o doador já iria ser submetido a este procedimento. Os riscos para a equipe da pesquisa estão relacionados à contaminação com material biológico, inerentes aos cuidados com saúde, que são minimizados uma vez que o profissional responsável pela coleta dos

Rubrica do participante  
Da pesquisa

3/5

Rubrica do pesquisador

20/12/2018

Título do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

(TCLE / 20.12.2018)

materiais biológicos deverá estar protegido pelos equipamentos de proteção individual como os mesmos dispositivos de segurança usados pelos demais membros da equipe de saúde, como capote cirúrgico, gorro, máscara e luvas estéreis.

Não está previsto qualquer benefício imediato ao participante da pesquisa. Entretanto, o projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos, dos efeitos do tabagismo no aumento da fragilidade do tecido ósseo, o que favorece a proposta de novas alternativas de tratamento para seres humanos que apresentem prejuízo no reparo do tecido ósseo em consequência do hábito de fumar.

#### 5C) Forma de acompanhamento e assistência

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador Dra. Fernanda Degobbi T. Q. S. Lopes (Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455, primeiro andar, sala 1220, tel: 3061-7180, e-mail: fernandadtqsl@gmail.com); Dr. Raphael Pratali, responsável pelas cirurgias de coluna (Endereço: Rua Pedro de Toledo, 1800, Vila Clementino, e-mail: pratalir@gmail.com); Dr. Marco Aurélio Silvério Neves, responsável pelas cirurgias de artroplastia de joelho e/ou quadril (Endereço: Rua Goiânia, 345-Parque Industrial, SJC- SP, e-mail: marcoaurelio@movite.com.br).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11) 3893-4401/4407 E-mail: [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br)

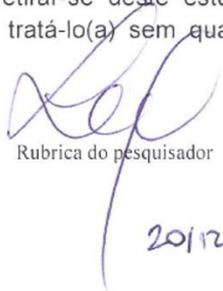
#### 5D) Liberdade de recusar-se e retirar-se do estudo

Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

A escolha de entrar ou não nesse estudo é inteiramente sua. Caso o(a) senhor(a) se recuse a participar deste estudo, o(a) senhor(a) receberá o tratamento habitual, sem qualquer tipo de prejuízo ou represália. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar-se deste estudo a qualquer momento e, se isso acontecer, seu médico continuará a tratá-lo(a) sem qualquer prejuízo ao tratamento ou represália.

Rubrica do participante  
Da pesquisa

4/5

  
Rubrica do pesquisador

20/12/2018

Título do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

(TCLE / 20.12.2018)

5E) Manutenção do sigilo e privacidade

Os seus dados serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente sob qualquer circunstância.

Solicitamos sua autorização para que os dados obtidos nesta pesquisa sejam utilizados em uma publicação científica, meio como os resultados de uma pesquisa são divulgados e compartilhados com a comunidade científica.

5F) O (A) senhor(a) receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5G) Garantia de Ressarcimento

O(A) senhor(a) não terá qualquer custo, pois o custo desta pesquisa será de responsabilidade do orçamento da pesquisa. O (A) senhor(a) tem direito a ressarcimento em caso de despesas decorrentes da sua participação na pesquisa.

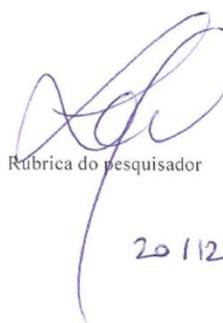
5H) Garantia de indenização

O (A) senhor(a) tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Rubrica do participante  
Da pesquisa

5/5

Rubrica do pesquisador



20/12/2018

## APÊNDICE

Questionário da pesquisa “**Avaliação dos efeitos do tabagismo na constituição do tecido ósseo**”

Nome paciente: \_\_\_\_\_

Sexo F ( ) M ( ) Idade: \_\_\_\_\_

Causa da cirurgia:

---

Classificação Radiológica Tönnis:

Grau 0 ( ) Sem sinais de osteoartrose

Grau I ( ) Esclerose aumentada, ligeira diminuição do espaço articular, sem perda/perda ligeira da esfericidade da cabeça do fémur

Grau II ( ) Pequenos quistos, diminuição moderada do espaço articular, perda moderada da esfericidade da cabeça

Grau III ( ) Quistos de grandes dimensões, diminuição acentuada do espaço articular, deformidade acentuada da cabeça

Qual tipo de ocupação de trabalho? Trabalha em pé ou sentado?

---

Peso \_\_\_\_\_ Altura \_\_\_\_\_

É fumante? Sim( ) Não( ) Anos maço (Cigarros dia/20 x tempo fumo):

---

Parou de fumar? Há quanto tempo?

---

Faz utilização de medicação de uso contínuo?

---

Faz uso de álcool? (Ingesta tem que ser menor ou igual a 3 doses por dia)

---

Menopausa

Sim ( ) Não ( ) – Faz tratamento ? \_\_\_\_\_

Prática atividade física? Qual? Qual frequência?

---

Faz uso/ou utilizou corticoide por um período contínuo?

---

Possui alguma doença prévia? Ex: Diabetes, osteoporose, artrose ou artrite reumatoide, DPOC, doença auto-imune, oncológica entre outras.

---

São Paulo, 01 de novembro de 2018.

### DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Declaro estar ciente e de acordo com as atividades de coleta de amostras de tecido ósseo e articular de pacientes tabagistas e não tabagistas resultante do ato cirúrgico ortopédico – Artroplastia Total do Quadril, sob responsabilidade do Dr. Marco Aurélio Silvério Neves referentes à nossa participação no projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NA CONSTITUIÇÃO DO TECIDO ÓSSEO”.

Declaro ainda que nossa participação não acarretará ônus para a instituição por se tratar de atividades inerentes ao Procedimento de Artroplastia, já realizado por nosso Serviço. Ademais, a pesquisadora responsável pelo projeto, Prof. Dra. Fernanda Degobbi T. Q. S. Lopes será responsável pelo transporte e análise das amostras coletadas.

Atenciosamente,



---

Dr. Orlando Elidio  
Diretor Médico Hospital Regional São José dos Campos

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Erhardt L. Cigarette smoking: An undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009 Jul;205(1):23–32.
2. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*. 2011 Sep;378(9795):1015–26.
3. Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):377–84.
4. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2019 report. 2019.
5. Instituto Nacional de Câncer - INCA. INCA: Brasil gasta cerca de R\$ 125 bilhões por ano com tratamentos de doenças decorrentes do tabaco. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-ressalta-que-brasil-gasta-cerca-de-r-125-bilhoes-por-ano-com-tratamentos-de-doencas-decorrentes-do-tabagismo>. 2022.
6. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov 28;3(11):e442.
7. Collin J. Global health, equity and the WHO Framework Convention on Tobacco Control. *Glob Health Promot*. 2010 Jun 1;17(1\_suppl):73–5.
8. WHO: Geneva S. WHO Global Report on Trends in Prevalence of Tobacco Smoking. 2015.
9. Ministério da saúde: Biblioteca Virtual em Saúde; Instituto Nacional do Câncer. Tabagismo. <https://bvsms.saude.gov.br/tabagismo-13>. 2020.
10. Abate M. Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscle, Ligaments and Tendons Journal*. 2013;
11. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, de Laet C, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2005 Feb 3;16(2):155–62.
12. Tarantino U, Cariati I, Greggi C, Gasbarra E, Belluati A, Ciolli L, et al. Skeletal System Biology and Smoke Damage: From Basic Science to Medical Clinic. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 21;22(12):6629.
13. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporosis International*. 2012 Aug 21;23(8):2081–92.
14. Bjarnason NH, Christiansen C. The Influence of Thinness and Smoking on Bone Loss and Response to Hormone Replacement Therapy in Early Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Feb;85(2):590–6.
15. Tamaki J, Iki M, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Kadowaki E, et al. Impact of smoking on bone mineral density and bone metabolism in elderly men: the Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) study. *Osteoporosis International*. 2011 Jan 10;22(1):133–41.
16. Junqueira & Carneiro. *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 14 edição. 2016.
17. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*. 2009 May 1;3(2):189–96.
18. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*. 2016 May;31(3):233–45.

19. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-Osteoclast Interactions. 2018;59(2):99–107.
20. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2017 Jun;23(3):268–80. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2016.0454>
21. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(3):268–80.
22. Pereira VJCS. *Biologia da remodelação óssea*. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.; 2010.
23. Elmardi AS, Katchburian M v., Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int*. 1990 Apr;46(4):239–45.
24. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–17.
25. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008 Jan;5(1):49–56.
26. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th Edition. 2015.
27. Xie Y, Zhang L, Xiong Q, Gao Y, Ge W, Tang P. Bench-to bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation. *Bone Res*. 2019 Dec 15;7(1):25.
28. Anandarajah AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009 Mar;20(2):88–94.
29. Pereira I.A., Pereira RMR. Osteoporosis and focal erosive bone lesions in rheumatoid arthritis: pathogeny and treatment. *Rev Bras Reumatol*. 2004;44(5).
30. Sims NA. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Oct;79:14–23.
31. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991 Jun 15;88(12):5134–8.
32. Manolagas SC, Bellido T, Jilka RL. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: Roles of IL-6 and gp130. *Int J Immunopharmacol*. 1995 Feb;17(2):109–16.
33. Liu J, Wang S, Zhang P, Said-Al-Naief N, Michalek SM, Feng X. Molecular Mechanism of the Bifunctional Role of Lipopolysaccharide in Osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 May;284(18):12512–23.
34. Bolon B, Carter C, Daris M, Morony S, Capparelli C, Hsieh A, et al. Adenoviral Delivery of Osteoprotegerin Ameliorates Bone Resorption in a Mouse Ovariectomy Model of Osteoporosis. *Molecular Therapy*. 2001 Feb;3(2):197–205.
35. Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet*. 2012 Aug 18;13(8):576–88.

36. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb;15(1):49–60.
37. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002 May;8(3):147–59.
38. Hirotani H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling Pathway Regulates Osteoclastogenesis in RAW264.7 Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Apr;279(14):13984–92.
39. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *Journal of Experimental Medicine.* 2005 Nov 7;202(9):1261–9.
40. Takayanagi H. The Role of NFAT in Osteoclast Formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov 1;1116(1):227–37.
41. Oursler MJ, Bell L v, Clevinger B, Osdoby P. Identification of osteoclast-specific monoclonal antibodies. *Journal of Cell Biology.* 1985 May 1;100(5):1592–600.
42. Vaira S, Alhawagri M, Anwisyte I, Kitaura H, Faccio R, Novack DV. RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2008 May 8;
43. Boyce BF, Xing L, Franzoso G, Siebenlist U. Required and nonessential functions of nuclear factor-kappa B in bone cells. *Bone.* 1999 Jul;25(1):137–9.
44. Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The Role of Reactive Oxygen Intermediates in Osteoclastic Bone Resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Feb;207(1):280–7.
45. Vaira S, Johnson T, Hirbe AC, Alhawagri M, Anwisyte I, Sammut B, et al. RelB is the NF- $\kappa$ B subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008 Mar 11;105(10):3897–902.
46. Sims NA. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Oct;79:14–23.
47. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1991 Jun 15;88(12):5134–8.
48. Manolagas SC, Bellido T, Jilka RL. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: Roles of IL-6 and gp130. *Int J Immunopharmacol.* 1995 Feb;17(2):109–16.
49. Miura M, Chen XD, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo BM, et al. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *Journal of Clinical Investigation.* 2004 Dec 15;114(12):1704–13.
50. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . *Journal of Clinical Investigation.* 2000 Nov 15;106(10):1229–37.
51. Lim JC, Ko KI, Mattos M, Fang M, Zhang C, Feinberg D, et al. TNF $\alpha$  contributes to diabetes impaired angiogenesis in fracture healing. *Bone.* 2017 Jun;99:26–38.
52. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011 Nov;19(11):1270–85.

53. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jul 25;10(7):437–41.
54. Hu W, Chen Y, Dou C, Dong S. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2021 Apr;80(4):413–22.
55. Cisternas MG, Murphy L, Sacks JJ, Solomon DH, Pasta DJ, Helmick CG. Alternative Methods for Defining Osteoarthritis and the Impact on Estimating Prevalence in a US Population-Based Survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016 May;68(5):574–80.
56. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov 7;8(11):665–73.
57. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. New Perspective in Osteoarthritis: The OPG and RANKL System as a Potential Therapeutic Target? *Keio J Med*. 2009;58(1):29–40.
58. Black JDJ, Tadros BJ. Bone structure: from cortical to calcium. *Orthop Trauma*. 2020 Jun;34(3):113–9.
59. Tzaphlidou M. Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps. *J Biol Phys*. 2008 Apr 15;34(1–2):39–49.
60. Barbosa AP, Lourenço JD, Junqueira JJM, Larissa Emidio de França S, Martins JS, Oliveira Junior MC, et al. The deleterious effects of smoking in bone mineralization and fibrillar matrix composition. *Life Sci*. 2020;241(November 2019).
61. Hsu HH, Murasawa Y, Qi P, Nishimura Y, Wang PC. Type V collagen fibrils in mouse metanephroi. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 22;441(3):649–54.
62. Mak KM, Png CYM, Lee DJ. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat Rec*. 2016 May;299(5):613–29.
63. Musiime M, Chang J, Hansen U, Kadler KE, Zeltz C, Gullberg D. Collagen Assembly at the Cell Surface: Dogmas Revisited. *Cells*. 2021 Mar 16;10(3):662.
64. Barbosa AP, Lourenço JD, Junqueira JJM, Larissa Emidio de França S, Martins JS, Oliveira Junior MC, et al. The deleterious effects of smoking in bone mineralization and fibrillar matrix composition. *Life Sci*. 2020;241(November 2019).
65. Junqueira JJM, Lourenço JD, da Silva KR, Cervilha DA de B, da Silveira LKR, Correia AT, et al. Decreased Bone Type I Collagen in the Early Stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2020 Sep 2;17(5):575–86.
66. Cusano NE. Skeletal Effects of Smoking. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Oct 24;13(5):302–9.
67. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009 Feb 2;6(2):445–62.
68. Negri BM, Pimentel SP, Casati MZ, Cirano FR, Casarin RC, Ribeiro FV. Impact of a chronic smoking habit on the osteo-immunoinflammatory mediators in the peri-implant fluid of clinically healthy dental implants. *Arch Oral Biol*. 2016 Oct 1;70:55–61.
69. Busse J, Gasteiger W, Tönnis D. Eine neue Methode zur röntgenologischen Beurteilung eines Hüftgelenkes ? Der Hüftwert. *Archiv für Orthopädische und Unfall-Chirurgie*. 1972;72(1):1–9.

70. Kovalenko B, Bremjit P, Fernando N. Classifications in Brief: Tönnis Classification of Hip Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2018 Aug 17;476(8):1680–4.
71. Cibulka MT, Threlkeld J. The Early Clinical Diagnosis of Osteoarthritis of the Hip. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*. 2004 Aug;34(8):461–573.
72. Rom O, Reznick AZ, Keidar Z, Karkabi K, Aizenbud D. Smoking cessation-related weight gain-beneficial effects on muscle mass, strength and bone health. *Addiction*. 2015 Feb;110(2):326–35.
73. Junqueira JJM, Lourenço JD, da Silva KR, Jorgetti V, Vieira RP, de Araujo AA, et al. Increased bone resorption by long-term cigarette smoke exposure in animal model. *Heliyon*. 2021 Dec 1;7(12).
74. Sørensen LT. Wound Healing and Infection in Surgery. *Ann Surg*. 2012 Jun;255(6):1069–79.
75. Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol*. 2016 Dec 19;7.
76. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 8(3):204–16.
77. Ragipoglu D, Dudeck A, Haffner-Luntzer M, Voss M, Kroner J, Ignatius A, et al. The Role of Mast Cells in Bone Metabolism and Bone Disorders. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
78. Zheng LW, Lan CN, Kong Y, Liu LH, Fan YM, Zhang CJ. Exosomal miR-150 derived from BMSCs inhibits TNF- $\alpha$ -mediated osteoblast apoptosis in osteonecrosis of the femoral head by GREM1/NF- $\kappa$ B signaling. *Regenerative Med*. 2022 Oct 1;17(10):739–53.
79. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*. 2007 Feb;40(2):345–53.
80. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G. The interplay between the bone and the immune system. Vol. 2013, *Clinical and Developmental Immunology*. 2013.
81. Charatcharoenwithaya N, Khosla S, Atkinson EJ, McCready LK, Riggs BL. Effect of Blockade of TNF- $\alpha$  and Interleukin-1 Action on Bone Resorption in Early Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007 Feb 12;22(5):724–9.
82. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050–5.
83. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2007 Apr;34(4):271–7.
84. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast Apoptosis and Bone Turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001 Jun 2;16(6):975–84.
85. Liu H, Wang X xia, Chen P. Angiopoietin-like 4 knockdown attenuates cigarette smoke extract-induced oxidative stress and apoptosis in lung bronchial epithelial cells by inhibiting NADPH oxidase. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2022 Sep 1;50(5):47–56.
86. Xie S, Wang X. CRYAB reduces cigarette smoke-induced inflammation, apoptosis, and oxidative stress by retarding PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B signaling

- pathways in human bronchial epithelial cells. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2022;50(5):23–9.
87. Banafshi O, Mohammadi E, Abdi M, Ghaderi E, Assadollahi V, Khadem Erfan MB, et al. Effect of cigarette smoke condensate on mouse embryo development and expression of pluripotency and apoptotic genes *in vitro*. *Zygote*. 2022 Sep 6;1–5.
  88. Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, Gallagher PJ, Jin Y, Norvell SM. Fluid shear stress inhibits TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in osteoblasts: A role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. *J Cell Physiol*. 2003 Feb;194(2):194–205.
  89. Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, et al. Leptin Induces Apoptosis via ERK/cPLA2/Cytochrome c Pathway in Human Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Jun;278(24):21920–9.
  90. Rodrigues AM, Caetano-Lopes J, Vale AC, Vidal B, Lopes A, Aleixo I, et al. Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. *Bone*. 2012 Dec;51(6):981–9.
  91. Barbosa AP, Lourenço JD, Junqueira JJM, Larissa Emidio de França S, Martins JS, Oliveira Junior MC, et al. The deleterious effects of smoking in bone mineralization and fibrillar matrix composition. *Life Sci*. 2020 Jan;241:117132.
  92. D.E. Birk PB. *The Extracellular Matrix: An Overview, Collagens, suprastructures and collagen fibril assembly*. Springer-Verlag; 2011. 77–115 p.
  93. Birk DE, Fitch JM, Babiarez JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990 Apr 1;95(4):649–57.
  94. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, 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. *Journal of Cell Biology*. 1993 Jun 1;121(5):1181–9.
  95. Adachi E, Hayashi T. 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. *Connect Tissue Res*. 1986 Jan 7;14(4):257–66.