

**JADER JOEL MACHADO JUNQUEIRA**

**Avaliação dos efeitos do tabagismo no metabolismo ósseo em  
modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica**

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**

**2020**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Junqueira, Jader Joel Machado  
Avaliação dos efeitos do tabagismo no metabolismo  
ósseo em modelo experimental de doença pulmonar  
obstrutiva crônica / Jader Joel Machado Junqueira. --  
São Paulo, 2020.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Fisiopatologia Experimental.  
Orientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino  
dos Santos Lopes.

Descritores: 1. Doença pulmonar obstrutiva crônica  
2. Remodelação óssea 3. Matriz óssea 4. Colágeno tipo I  
5. Colágeno tipo V 6. Tabagismo

USP/FM/DBD-275/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## *Dedicatória*

*À minha filha Helena, jóia mais preciosa;*

*À minha esposa Paula, parceira com quem tenho a  
sorte de poder compartilhar a vida;*

*Ao meu pai Carlos, minha maior referência de trabalho,  
integridade e dedicação;*

*À minha mãe Rosana, inesgotável fonte de amor e zelo pela família;*

*Aos meus irmãos Ivanessa, João e Romulo, obrigado por fazerem  
parte da minha história.*

*Vocês são meu alicerce e meu refúgio.*

## *Agradecimentos*

*À Profa. Dra. Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes agradeço pelo acolhimento, pela confiança e pelo seu frequente entusiasmo e disponibilidade em ensinar. Certamente seu conhecimento foi fator decisivo para a elaboração, execução e conclusão desta tese. Serei eternamente grato pelas aulas, pelas críticas, pelas orientações, pela compreensão e principalmente pela amizade.*

*À Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério agradeço pela oportunidade de estender minha formação acadêmica na mesma casa que me fez médico.*

*À Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro agradeço pela carinhosa recepção que tive no laboratório e por todos ensinamentos na bancada, no microscópio e na escrita da tese. Sua expertise em colágeno é indiscutível.*

*À Profa. Dra. Vanda Jorgetti agradeço pela importante contribuição nas difíceis análises da matriz mineral óssea.*



*Ao grande amigo cirurgião Dr. Alexandre Póvoa Barbosa, devo a você muitas das minhas conquistas pessoais, acadêmicas e profissionais. Tenho sorte em tê-lo ao meu lado todos os dias como verdadeiro professor.*

*Ao fisioterapeuta e ex-aluno de iniciação científica Kaique Rodrigues da Silva, agradeço pelo importante auxílio nos experimentos. Espero ter, de alguma forma, também contribuído com sua formação. Foi visível sua evolução ao longo dos anos.*

*A toda equipe de profissionais competentes e extremamente qualificados dos laboratórios de investigação médica (LIM-17 e LIM-20): Dra. Juliana Dias Lourenço, Dra. Juliana Tyiakí Ito, Dra. Larissa Emídio Silva, Dra. Julia Benini Kohler, Dra. Daniela Aparecida de Brito Cervilha, Dr. Jurandir Tomaz de Miranda e Mt. Lizandre Keren Ramos da Silveira, agradeço a preciosa contribuição e o tempo dedicado por vocês em todas as etapas deste trabalho.*

*Ao Dr. Aristides Tadeu Correia, amigo de longa data, agradeço pelo auxílio e importantes ensinamentos na análise estatística desta tese.*

*Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tíberio, Prof. Dr. Marcelo Rosa Rezende e Prof. Dr. Alvaro Baik Cho, agradeço pelas críticas e sugestões que foram de extrema importância para o aprimoramento deste trabalho.*

*Aos membros da banca examinadora, agradeço pela disponibilidade na leitura desta tese e por participarem da conclusão de mais esta importante etapa na minha vida.*

*À Faculdade de Medicina da USP, eterno templo dedicado ao ensino e pesquisa, serei sempre grato por toda formação recebida.*

*A todos os animais que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.*

*Muito obrigado.*

*Tudo alcança aquele que trabalha duro enquanto espera.*

Thomas Alva Edison

*Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.*

Isaac Newton

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 A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª 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, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 O hábito do tabagismo na população mundial e no Brasil.....	21
1.2 A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).....	23
1.3 Efeitos do tabagismo e DPOC no metabolismo ósseo.....	25
1.4 Arquitetura e metabolismo ósseo.....	27
1.4.1 Fibras Colágenas.....	29
1.4.2 Citocinas (RANKL e OPG).....	32
1.4.3 Fatores de Crescimento (BMP).....	34
1.5 Modelo experimental de DPOC.....	37
1.6 Justificativa.....	38
1.7 Hipótese.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Animais.....	42
3.1.1 Descarte de animais.....	43
3.2 Grupos experimentais.....	43
3.3 Exposição à fumaça de cigarro para indução de DPOC.....	44

3.3.1 Perdas de animais.....	46
3.4 Avaliação pulmonar.....	46
3.4.1. Avaliação da mecânica respiratória.....	46
3.4.2. Avaliação histológica do parênquima pulmonar.....	47
3.5 Avaliação celular e da matriz mineral óssea.....	50
3.6 Avaliação da matriz fibrilar óssea.....	52
3.6.1 Preparo histológico ósseo.....	52
3.6.2. Imunofluorescência para colágeno tipo I e V.....	54
3.7 Avaliação da expressão de citocinas e fatores de crescimento.....	56
3.8 Avaliação da expressão gênica de <i>COL1A1</i> .....	58
3.8.1 Extração do RNA.....	58
3.8.2 Reação de transcrição reversa com amplificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	59
3.9 Análise estatística.....	61
3.9.1 Estatística descritiva.....	61
3.9.2 Estatística inferencial.....	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Avaliação pulmonar.....	63
4.1.1 Avaliação da mecânica respiratória.....	63
4.1.2 Avaliação histológica do parênquima pulmonar.....	67
4.2 Avaliação celular e da matriz mineral óssea.....	69
4.3 Avaliação da matriz fibrilar óssea.....	74
4.4 Avaliação da expressão de citocinas e fatores de crescimento.....	78
4.5 Avaliação da expressão gênica de <i>COL1A1</i> .....	81
5. DISCUSSÃO.....	84

6. CONCLUSÃO.....	91
7. REFERÊNCIAS.....	92

Apêndice

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Arctg	- Arco tangente;
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
BFR/BS	- Taxa de formação óssea;
BMP	- Proteína morfogenética óssea;
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i> ;
BV	- Volume ósseo total;
cm	- Centímetro;
cmH <sub>2</sub> O	- Centímetro de água;
CO	- Monóxido de carbono;
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente;
Ct	- <i>Cycle threshold</i> ;
DNA	- Ácido desoxirribonucleico;
DPOC	- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica;
ELISA	- <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> ;
ES/BS	- Área da superfície erodida;
FGF	- Fator de crescimento fibroblástico;
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
g	- Grama;
Grupo C	- Grupo Controle;
Grupo F	- Grupo Fumo;
Grupo FP	- Grupo Fumo Provisório;
Gtis	- Resistência tecidual pulmonar;



h	- Hora;
H&E	- Hematoxilina e eosina;
H <sub>2</sub> O	- Água;
Htis	- Elastância tecidual pulmonar;
law	- Intertância das vias aéreas;
IGF	- Fator de crescimento semelhante a insulina;
IgG	- Imunoglobulina G;
IL	- Interleucina;
IQ	- Intervalo interquartil;
j	- Unidade imaginária;
KC	- Quimioatraente de queratinócitos;
kg	- Quilograma;
L	- Litros;
LIM	- Laboratório de investigação médica;
LIMPURB	- Departamento de Limpeza Urbana;
Lm	- Intercepto linear médio;
m <sup>3</sup>	- Metro cúbico;
MAPK	- Proteína-quinases ativadas por mitógenos;
mg	- Miligrama;
min	- Minuto;
mL	- Mililitro;
mm	- Milímetros;
MMP	- Metaloproteinase de matriz;
MPC	- Proteína de quimioatração de monócitos;

MTR	- Movimentação de Transporte de Resíduos;
NFkB	- Fator nuclear kappa B;
ng	- Nanograma;
Nm	- Número de vezes que as retas do retículo interceptam as paredes alveolares;
nM	- Nanomolar;
nm	- Nanômetro;
O.Th	- Espessura do osteóide;
Ob.S/BS	- Superfície osteoblástica;
°C	- Grau Célsius;
Oc.S/BS	- Superfície osteoclástica;
ODF	- Fator de diferenciação de osteoclastos;
OPG	- Osteoprotegerina;
OPGL	- Osteoprotegerina ligante;
OS/BS	- Área da superfície osteóide;
p	- Probabilidade de significância;
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i> ;
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ;
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaqueta;
pH	- Potencial hidrogênionico;
ppm	- Partes por milhão;
RANK	- Receptor ativador do ligante nuclear fator-kappa;
RANKL	- Receptor ativador do ligante nuclear fator-kappa ligante;
Raw	- Resistência das vias aéreas;

RNA	- Ácido ribonucleico;
rpm	- Rotações por minuto;
Tb.N	- Número de trabéculas;
Tb.Sp	- Separação entre trabéculas;
Tb.Th	- Espessura trabecular;
TGF	- Fator transformador de crescimento;
TNF	- Fator de necrose tumoral;
TRANCE	- Citocina induzida por ativação relacionada ao TNF;
TV	- Volume ósseo trabecular;
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular;
ZL	- Impedância do sistema;
$\mu\text{g}$	- Micrograma;
$\mu\text{L}$	- Microlitro;
$\mu\text{m}$	- Micrometro;
$\pi$	- Pi;
$\omega$	- Frequência angular;
%	- Porcentagem.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo das fases do remodelamento ósseo associado a unidade óssea multicelular.....	28
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo para representação da copolimerização das fibras heterotípicas de colágeno I e V.....	31
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo da modulação osteoclástica via sistema RANKL/OPG.....	33
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo da sinalização óssea intracelular da BMP via Smad ou MAPK culminando com a diferenciação e maturação de células de linhagem osteoblástica.....	36
<b>Figura 5.</b> Linha do tempo até a eutanásia conforme os grupos de exposição.....	44
<b>Figura 6.</b> Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.	45
<b>Figura 7.</b> Retículo utilizado para avaliação do intercepto linear médio.....	48
<b>Figura 8.</b> Tecidos extraídos (pulmão, fêmur e tíbia bilaterais).....	49
<b>Figura 9.</b> Imagem representativa da avaliação histomorfométrica das trabéculas ósseas na região metafisária tibial.....	51
<b>Figura 10.</b> Imagem representativa dos passos para análise da imunofluorescência para colágeno tipo I na trabécula óssea.....	55
<b>Figura 11.</b> Imagem representativa dos passos para análise da imunofluorescência para colágeno tipo V na trabécula óssea.....	55
<b>Figura 12.</b> Dispositivo utilizado para obtenção do homogenato ósseo.....	56
<b>Figura 13.</b> Método ELISA para avaliações das expressões de RANKL, OPG e BMP-2.....	58

<b>Figura 14.</b> Avaliação da resistência das vias aéreas (Raw).....	64
<b>Figura 15.</b> Avaliação da resistência do tecido pulmonar (Gtis).....	65
<b>Figura 16.</b> Avaliação da elastância do tecido pulmonar (Htis).....	66
<b>Figura 17.</b> Avaliação histológica do intercepto linear médio (Lm).....	68
<b>Figura 18.</b> Avaliação histomorfométrica dos parâmetros estruturais.....	70
<b>Figura 19.</b> Avaliação histomorfométrica dos parâmetros de remodelamento reabsortivos.....	72
<b>Figura 20.</b> Avaliação histomorfométrica dos parâmetros de remodelamento formativos.....	73
<b>Figura 21.</b> Avaliação imunohistoquímica para colágeno tipo I.....	75
<b>Figura 22.</b> Avaliação imunohistoquímica para colágeno tipo I (6 meses)....	76
<b>Figura 23.</b> Avaliação imunohistoquímica para colágeno tipo V.....	77
<b>Figura 24.</b> Avaliação imunohistoquímica para colágeno tipo V (6 meses)...	78
<b>Figura 25.</b> Avaliação da expressão de citocinas OPG/RANKL.....	80
<b>Figura 26.</b> Avaliação do fator de crescimento BMP-2.....	81
<b>Figura 27.</b> Avaliação da expressão gênica de <i>COL1A1</i> .....	82
<b>Figura 28.</b> Avaliação da expressão gênica de <i>COL1A1</i> (6 meses).....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros histomorfométricos avaliados.....	52
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos empregados para qRT-PCR quantitativo.....	60

## RESUMO

Junqueira JJM. *Avaliação dos efeitos do tabagismo no metabolismo ósseo em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

**Introdução:** O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), além de ser reconhecido por sua ação deletéria sobre o metabolismo ósseo, promovendo redução da densidade mineral óssea, o estímulo à osteoclastogênese e a inibição da osteoblastogênese. Entretanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos nestes processos ainda não estão totalmente esclarecidos. **Objetivo:** Avaliar o efeito temporal da exposição à fumaça de cigarro sobre o remodelamento ósseo durante o desenvolvimento da DPOC em modelo experimental. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 66 camundongos C57BL/6 machos jovens adultos (6-8 semanas). Os animais foram alocados em três grupos: Controle (C), 30 animais expostos a ar filtrado durante 1 mês (C1=10), 3 meses (C3=10) e 6 meses (C6=10); Fumo (F), 30 animais expostos à fumaça de cigarro durante 1 mês (F1=10), 3 meses (F3=10) e 6 meses (F6=10); Fumo Provisório (FP), 6 animais expostos à fumaça de cigarro durante 3 meses, seguido de mais 3 meses expostos à ar filtrado até a eutanásia. Todos os animais foram submetidos a avaliação da mecânica respiratória (Raw, Gtis e Htis) e análise do intercepto linear médio pulmonar (Lm) para caracterização da presença da DPOC. Também foi feita extração femoral e tibial bilateral para avaliação da: composição celular e da matriz mineral óssea (histomorfometria); matriz fibrilar óssea (imunofluorescência para colágenos tipo I e V); expressão de citocinas e fatores de crescimento (ELISA pra BMP-2, RANKL e OPG) e avaliação da expressão gênica de *COL1A1* (RT-qPCR). **Resultados:** A exposição à fumaça de cigarro gerou: redução da resistência (Gtis) e elastância (Htis) do tecido pulmonar a partir do 3º mês, progressiva ao longo do tempo, sem melhora no grupo FP; destruição do parênquima pulmonar com aumento do Lm a partir do 1º mês, sem efeito progressivo ao longo do tempo e sem melhora no grupo FP; piora dos parâmetros estruturais ósseos pela histomorfometria com 6 meses de seguimento; redução de colágeno tipo I e aumento de colágeno tipo V a partir do 1º mês, com efeito progressivo ao longo do tempo quanto a redução de colágeno tipo I e ainda com redução de colágeno tipo V no grupo FP; redução da relação OPG/RANKL a partir do 3º mês, sem efeito progressivo ao longo do tempo e sem melhora no grupo FP; redução na expressão gênica de *COL1A1* a partir do 3º mês, sem efeito progressivo ao longo do tempo, mas com uma melhora evidenciada no grupo FP, porém sem retomada efetiva da composição trabecular óssea de colágeno tipo I. **Conclusão:** A exposição a fumaça de cigarro gera uma piora progressiva de parâmetros arquiteturais ósseos ao longo do desenvolvimento da DPOC, sendo que alguns deles ocorrem antes mesmo da piora dos parâmetros respiratórios. A pausa da exposição a fumaça de cigarro gerou um aumento da expressão gênica de *COL1A1*, porém sem retomada da composição trabecular óssea de colágeno tipo I.

**Descritores:** Doença pulmonar obstrutiva crônica; Remodelação óssea; Matriz óssea; Colágeno tipo I; Colágeno tipo V; Tabagismo.

## ABSTRACT

Junqueira JJM. *Evaluation of the effects of smoking on bone metabolism in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

**Introduction:** Smoking is the main risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and is recognized for its deleterious action on bone metabolism, promoting reduction of bone mineral density, stimulation of osteoclastogenesis and inhibition of osteoblastogenesis. However, the physiological mechanisms involved in these processes are not yet fully understood. **Objective:** To evaluate the temporal effect of cigarette smoke exposure on bone remodeling during the development of COPD in an experimental model. **Materials and Methods:** Sixty-six young adult C57BL / 6 mice (6-8 weeks) were required. The animals were allocated to three groups: Control (C), 30 animals exposed to filtered air for 1 month (C1 = 10), 3 months (C3 = 10) and 6 months (C6 = 10); Smoke (F), 30 animals exposed to cigarette smoke for 1 month (F1 = 10), 3 months (F3 = 10) and 6 months (F6 = 10); Provisional smoking (FP), 6 animals exposed to cigarette smoke for 3 months, followed by another 3 months exposed to filtered air until euthanasia. All animals underwent respiratory mechanics evaluation (Raw, Gtis and Htis) and analysis of the pulmonary mean linear intercept (Lm) to characterize the presence of COPD. Bilateral femoral and tibial extraction was also performed to evaluate: cellular composition and bone mineral matrix (histomorphometry); bone fibrillar matrix (immunofluorescence for type I and V collagen); expression of cytokines and growth factors (ELISA for BMP-2, RANKL and OPG); evaluation of *COL1A1* (RT-qPCR) gene expression. **Results:** Exposure to cigarette smoke led to a progressive reduction in lung tissue resistance (Gtis) and elastance (Htis) from the 3rd month, with no improvement in the FP group; destruction of the pulmonary parenchyma with Lm increase from the 1st month, with no progressive effect over time and no improvement in the FP group; worsening of bone structural parameters by histomorphometry with 6 months of follow-up; reduction of type I collagen and increase of type V collagen from the 1st month, with a progressive effect over time regarding the reduction of type I collagen and also with reduction of type V collagen in the FP group; reduced OPG / RANKL ratio from the 3rd month, with no progressive effect over time and no improvement in the FP group; reduction in *COL1A1* gene expression from the 3rd month, with no progressive effect, but with an improvement in the FP group due to increased gene expression, without effective resumption of trabecular bone composition of type I collagen. **Conclusion:** Exposure to cigarette smoke generates a progressive worsening of bone architectural parameters throughout the development of COPD, with some of them occurring even before the worsening of respiratory parameters. Pausing exposure to cigarette smoke caused an increase in *COL1A1* gene expression, but without resuming the trabecular bone composition of type I collagen.

**Descriptors:** Pulmonary disease, chronic obstructive; Bone remodeling; Bone matrix; Collagen type I; Collagen type V; Smoking.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O hábito do tabagismo na população mundial e no Brasil

O cigarro é a única droga legalmente liberada para consumo capaz de provocar a morte de seus usuários quando utilizada conforme a orientação daquele que a produz<sup>1</sup>. Desta forma, o tabagismo se mantém como líder global na causa de mortes preveníveis, sendo responsável pela morte de aproximadamente 8 milhões de pessoas/ano e por aproximadamente 1,4 trilhões de dólares/ano de prejuízo à economia mundial<sup>2,3</sup>.

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou uma importante política de controle de tabagismo baseada na adoção de algumas medidas eficazes, baseadas em evidências, e que deveriam ser implementadas ao redor do mundo<sup>4</sup>. Estas medidas, conhecidas com o nome em inglês “MPOWER” incluem: M – Monitor, monitorização da prevalência de tabagismo e de políticas de prevenção; P – Protect, proteção de indivíduos com a criação de ambientes livres de cigarro; O – Offer, oferecimento de apoio a população em programas de cessação tabagismo; W – Warn, criação de rótulos de embalagens com advertências relacionadas aos perigos de fumar; E – Enforce, aplicação de proibições na publicidade, promoções e patrocínios vinculados ao tabagismo; e R – Raise, aumento de impostos sobre a venda de produtos associados ao tabaco<sup>4</sup>. O último informe da OMS em 2019 sobre as tendências na prevalência do uso de tabaco mostrou que a adoção destas políticas de controle do tabagismo já contam com a adesão de 136 países que coseguiram colocar em

prática pelo menos uma destas medidas, sendo que em 116 países já se obteve sucesso com visível declínio de suas taxas associadas ao tabagismo<sup>2</sup>.

Entre 1980 e 2012, a prevalência anual do tabagismo diário apresentou uma redução estimada de 25% entre homens e 42% entre mulheres. Porém, devido ao significativo crescimento da população mundial, houve um crescimento considerável do número de tabagistas e de cigarros consumidos, confirmando que o mercado mundial ligado ao tabaco se mantém forte<sup>5</sup>. Enquanto no ano de 2000 aproximadamente  $\frac{1}{3}$  (33,3%) da população global com mais de 15 anos eram usuários de alguma forma de tabaco, em 2015 esta taxa caiu para aproximadamente  $\frac{1}{4}$  (24,9%) e a projeção para 2025, assumindo esta manutenção de declínico, é de aproximadamente  $\frac{1}{5}$  (20,9%)<sup>2</sup>. No Brasil em 2013 a prevalência da população tabagista era de aproximadamente 14,7% e a perspectiva é que em 2025 este valor atinja taxas próximas a 12%<sup>1,6</sup>.

A fumaça do cigarro é composta por aproximadamente 5.000 substâncias químicas com ação tóxica e carcinogênica e apresenta duas fases: volátil (gasosa) e particulada<sup>7</sup>. Os riscos associados ao tabagismo dependem de fatores como: idade de início do uso, número de cigarros fumados por dia, características do cigarro (tipo de filtro, taxa de nicotina e alcatrão) e o comportamento (grau de inalação)<sup>8</sup>. O alcatrão é o maior responsável pelo efeito carcinógeno da fumaça. Já a nicotina, principal componente do cigarro, tem efeito viciante e ação inibitória sobre hemácias, macrófagos e fibroblastos, além de aumentar a agregação plaquetária<sup>9</sup>.

As principais causas de mortalidade associadas ao tabagismo são as neoplasias (principalmente de pulmão)<sup>10</sup>, as doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico<sup>11</sup> e a doença

pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)<sup>12</sup>. Alguns autores têm ainda descrito a influência do tabagismo no comprometimento do metabolismo ósseo, seja em sua densidade mineral, remodelamento ou consolidação de fraturas<sup>9,13,14</sup>.

### *1.2 A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)*

A DPOC é um dos principais líderes mundiais em causas de mortalidade e morbidade, com importantes impactos tanto sociais quanto econômicos. Ocorre como resultado de uma interação complexa entre exposição cumulativa a longo prazo a gases e partículas nocivas, combinada com uma série de outros fatores já bem conhecidos como genéticos, hiperresponsividade de vias aéreas e desenvolvimento pulmonar deficiente na infância<sup>15</sup>. Dados nacionais disponíveis mostram que a prevalência estimada de DPOC na população brasileira acima de 40 anos é de aproximadamente 12%, sendo responsável pela quinta maior causa de internação hospitalar<sup>16</sup> e estando entre as principais causas de morte no país (mais de 45 mil óbitos em 2017)<sup>17</sup>.

Considerada uma doença prevenível e tratável, é caracterizada por uma limitação persistente e frequentemente progressiva do fluxo aéreo associada a uma resposta inflamatória crônica exacerbada das vias aéreas e pulmões provocada por partículas e gases nocivos<sup>18</sup>. Ainda hoje, cerca de 75% dos casos de DPOC são atribuídos ao tabagismo, sendo assim o principal fator de risco para o desenvolvimento desta doença<sup>15</sup>.

O processo inflamatório crônico é caracterizado principalmente pela presença de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A migração e ativação destas células, no sítio pulmonar, acarreta o aumento da produção de fatores

quimiotáticos para mais células inflamatórias bem como de proteases e fatores de crescimento envolvidos na destruição do parênquima pulmonar, remodelamento tecidual e espessamento das paredes brônquicas<sup>19,20</sup>.

Além do processo inflamatório, outros mecanismos estão descritos na fisiopatologia da DPOC, e entre estes estão o aumento do estresse oxidativo e a apoptose. A inalação de gases tóxicos promove o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio tanto pelas células residentes do sítio pulmonar como pelas células inflamatórias que migram para este local. Isto decorre principalmente do aumento da demanda por fagocitose destas partículas exógenas que precisam ser removidas e eliminadas. No entanto, se este processo não ocorrer de forma adequada, em resposta aos estímulos presentes, agentes oxidantes serão liberados em maior concentração comparados aos anti-oxidantes. Este desequilíbrio além de promover uma piora da atividade celular, poderá levar à morte celular, perpetuando assim o processo inflamatório<sup>21</sup>.

As alterações estruturais promovidas por este processo inflamatório crônico acarretam alterações funcionais dos pulmões, promovendo manifestações clínicas como dispneia crônica e progressiva, tosse crônica, hipersecreção brônquica, caracterizando a presença de bronquite crônica e destruição das paredes alveolares, principalmente distais, caracterizando presença de enfisema pulmonar<sup>15</sup>.

Sabe-se que a DPOC apresenta ainda diversas manifestações extrapulmonares, dentre elas: redução da densidade mineral óssea, do índice de massa corpórea e da força muscular. Estas manifestações estão intimamente ligadas ao aumento da inflamação sistêmica e do estresse

oxidativo gerado pelo tabagismo, principal agente na fisiopatologia desta doença<sup>22,23</sup>. O uso crônico de corticoesteróides, comum em pacientes com DPOC, apesar de muitas vezes ser descrito como fator causal de alguns efeitos sistêmicos extrapulmonares destes pacientes, não é capaz de explicar todos os efeitos deletérios sobre o osso, sendo ainda pouco compreendidos os mecanismos envolvidos neste processo<sup>24</sup>.

### *1.3 Efeitos do tabagismo e DPOC no metabolismo ósseo*

Na década de 70, a associação entre tabagismo e fratura por insuficiência óssea em mulheres pós-menopausa já havia sido descrita<sup>25</sup>. Estudos experimentais e *in vitro* mostraram ainda que o tabagismo tem o potencial de agir no remodelamento ósseo induzindo a perda óssea<sup>26</sup> e redução da densidade mineral óssea<sup>27,28</sup>. Isto ocorre principalmente devido ao estímulo da osteoclastogênese e inibição da osteoblastogênese<sup>29</sup>.

O tabagismo tem mostrado ainda efeitos deletérios sobre as fraturas ósseas, promovendo retardo de sua consolidação ou até mesmo sua não consolidação<sup>30,31</sup>. O processo de consolidação óssea depende da ativação osteoblástica e da síntese de proteínas da matriz para restauração da estrutura óssea, sendo este processo dependente da ação de citocinas e fatores de crescimento específicos. A fumaça do cigarro, através do aumento da produção de radicais livres e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, interfere de modo importante neste processo<sup>32-34</sup>.

Em pacientes com diagnóstico de DPOC têm sido identificadas redução da densidade mineral óssea (osteopenia/osteoporose) e uma maior prevalência

de fraturas vertebrais<sup>23</sup>. A fratura vertebral por insuficiência óssea em pacientes com DPOC gera morbidade não apenas relacionada a fratura propriamente dita, mas ao comprometimento da função pulmonar devido a redução do volume da cavidade torácica.

Estudos em modelo experimental para indução de DPOC evidenciaram que a exposição à fumaça de cigarro, a longo prazo, é capaz de prejudicar o crescimento normal de vértebras lombares, além de deteriorar a qualidade óssea por promover um processo desordenado de remodelamento de fibras colágenas e do eixo biológico de cristais de apatita<sup>35</sup>.

Os efeitos deletérios do tabagismo no pré-operatório de cirurgias de urgência ou eletivas já são bem estabelecidos através de estudos de revisão sistemática com metanálise<sup>36,37</sup>. O tabagismo pré-operatório está associado ao aumento de risco de complicações pulmonares, neurológicas, de ferida operatória, infecções gerais e necessidade de suporte em unidade de terapia intensiva<sup>37</sup>, além de um risco de morte nos primeiros 30 dias de pós-operatório 38% maior do que pacientes não fumantes<sup>38</sup>. Este efeito negativo se estende também especificamente ao tecido ósseo, já que pacientes fumantes apresentam risco 2,2 vezes maior de atraso ou não-consolidação óssea após fraturas, osteotomias e artrodeses quando comparados a pacientes não fumantes<sup>36</sup>. Por outro lado, cessar o tabagismo antes de um procedimento cirúrgico, principalmente por um período de pelo menos 4 semanas, é capaz de reduzir o risco de complicações pós-operatórias em até 41%<sup>39</sup>.

Para entendermos mais sobre os efeitos do tabagismo sobre o metabolismo ósseo, descrevemos a seguir um pouco sobre a estrutura e funcionamento do tecido ósseo.

#### 1.4 Arquitetura e metabolismo ósseo

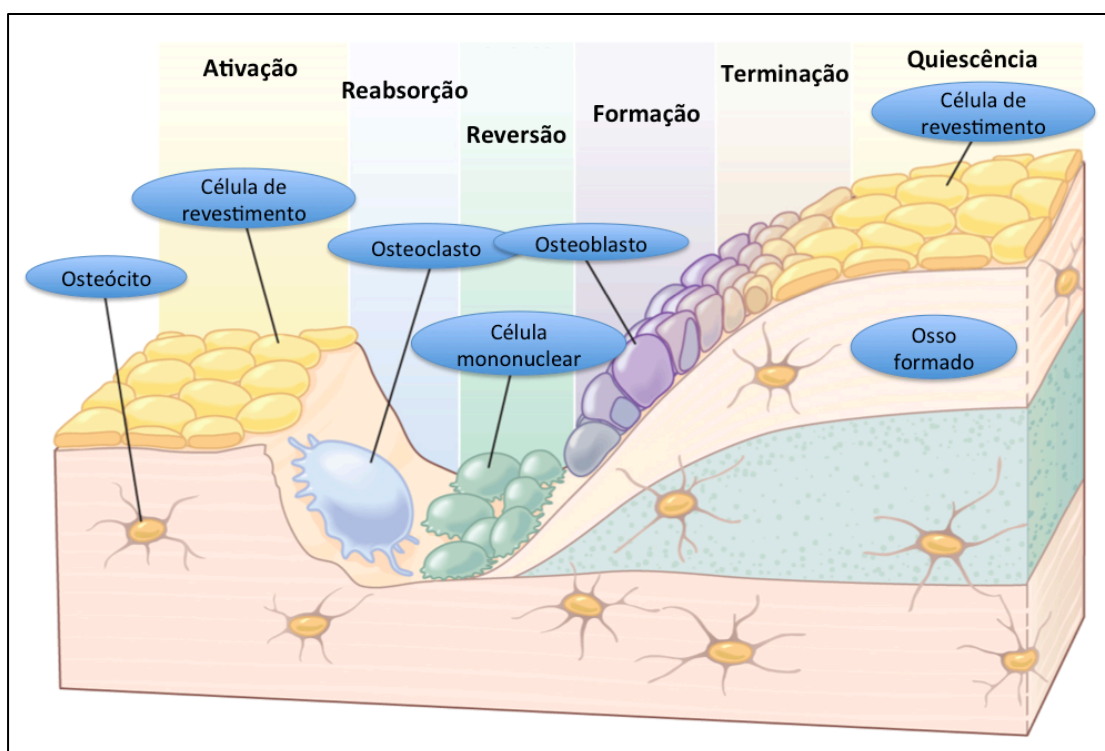
O osso é um tecido conectivo organizado e especializado composto por células e uma matriz extracelular calcificada. Existem dois grandes grupos de células especializadas no tecido ósseo que compõe a chamada unidade multicelular óssea e que estão intimamente relacionadas ao remodelamento ósseo: as células de linhagem osteoblástica (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ou *lining-cells*) e as células de reabsorção óssea (osteoclastos).

As células de linhagem osteoblástica são formadas por: osteoblastos, originados a partir de células mesenquimais na medula óssea e responsáveis pela síntese e subsequente mineralização da matriz óssea ou osteóide; osteócitos, células estreladas maduras, encontradas aprisionadas entre as camadas da matriz óssea e que apresentam processos citoplasmáticos na forma de pequenos canalículos para comunicação e transporte; células de revestimento ou *lining cells*, são osteoblastos quiescentes, mas com capacidade de serem ativados, que apresentam morfologia plana e alongada e ocupam a superfície óssea. Já as células de reabsorção da matriz óssea calcificada são compostas por osteoclastos, células gigantes multinucleadas formadas a partir da fusão citoplasmática de seus precursores mononucleares, pertencentes a linhagem mielóide de células hematopoiéticas que também dão origem aos macrófagos<sup>40</sup>.

O remodelamento ósseo é um processo contínuo de renovação óssea que ocorre em todo o indivíduo através de uma atividade celular coordenada entre formação e reabsorção óssea. Este processo permite que o osso tenha

capacidade plástica de adaptação frente ao estresse externo (tração e compressão) ao qual é submetido ao longo dos anos<sup>40</sup>. A composição bioquímica do osso possibilita que o esqueleto apresente características mecânicas e biológicas cruciais para manutenção de suas três principais funções: promover suporte mecânico a locomoção, proteger órgãos vitais e manter a homeostase mineral<sup>41</sup>.

É através da unidade multicelular óssea que ocorre este processo dinâmico de remodelamento composto por fases sequenciais e coordenadas descritas a seguir: ativação, reabsorção, reversão, formação, terminação e quiescência<sup>42</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das fases do remodelamento ósseo associado a unidade óssea multicelular. Adaptado de Encyclopaedia Britannica, Inc. 2013<sup>43</sup>.



O primeiro estágio envolve a detecção de um sinal inicial para o remodelamento gerado diretamente no tecido ósseo após uma lesão. O dano tecidual gera apoptose de osteócitos e cessação da inibição a osteoclastogênese. Osteoblastos respondem aos sinais gerados pelos osteócitos e recrutam precursores de osteoclastos para o sítio de reabsorção, com posterior diferenciação a osteoclastos maduros. Após reabsorção, segue-se a fase de reversão com desaparecimento dos osteoclastos recrutados e início do processo de formação. Osteoblastos maduros passam a depositar matriz osteóide que será em seguida mineralizada. Finalmente a superfície óssea retorna a um estado de quiescência, com osteoblastos se diferenciando em células de revestimento até a próxima onda de remodelamento se iniciar<sup>44</sup>.

A matriz extracelular é responsável por conferir propriedades estruturais ao osso, bem como auxiliar em algumas funções regulatórias celulares. É formada principalmente (60-70%) por uma porção inorgânica, responsável pela sua resistência à compressão e 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 o sódio, potássio, magnésio e carbonato<sup>41,45</sup>. A porção orgânica (30-40%) 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)<sup>42</sup>.

#### *1.4.1 Fibras colágenas*

Os colágenos representam uma família heterogênea de glicoproteínas da matriz extracelular e estão envolvidos na formação de redes de

macromoleculares com função não apenas de suporte, mas também atuando na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular. Estruturalmente sua molécula é composta por uma tripla hélice contendo três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias alfa, que podem ser idênticas (homotriméricas) ou não (heterotriméricas), sendo estas últimas mais frequentes<sup>46</sup>.

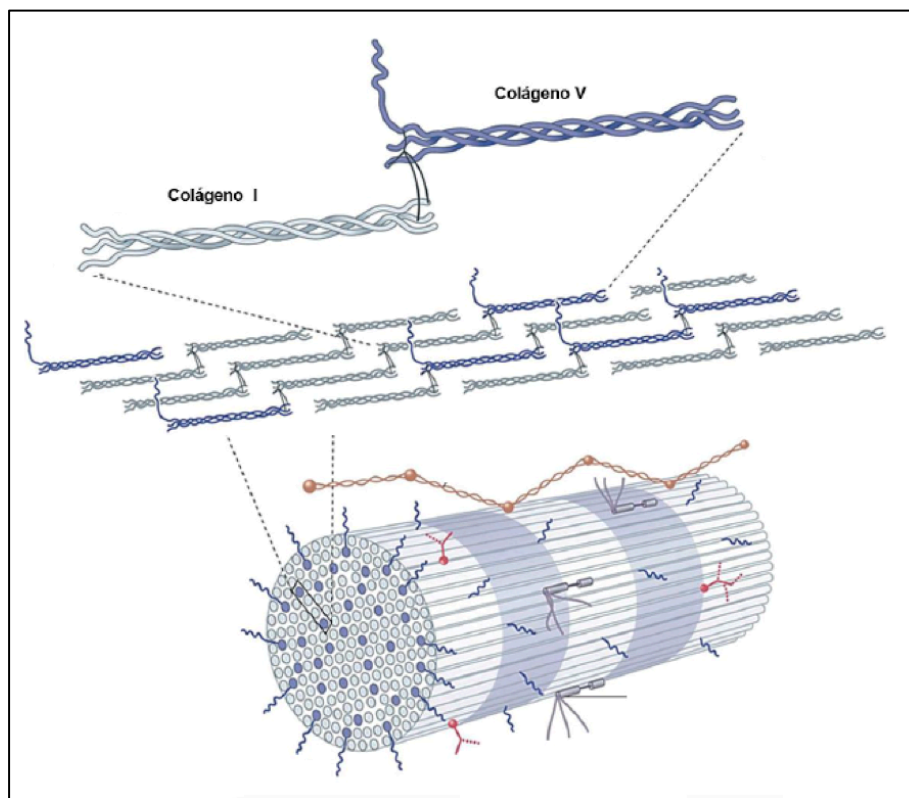
Os 29 tipos de colágenos descritos são diferenciados por sua composição estrutural, montagem e função e divididos em famílias, sendo as principais: colágenos formadores de fibrilas, colágenos da membrana basal, colágeno microfibrilar, fibrilas de ancoragem, colágenos formadores de redes hexagonais, colágenos associados à fibrilação com hélices triplas interrompidas, colágenos transmembrana e multiplexinas<sup>47</sup>. No osso, a família dos colágenos formadores de fibrilas é a mais importante, tendo como principais representantes os colágenos tipo I e V<sup>48</sup>.

O colágeno tipo I compõe 90% da massa orgânica óssea e é o principal colágeno em tecidos como tendões, pele, ligamentos, córnea e tecidos conectivos intersticiais. É responsável pelas propriedades biomecânicas ósseas de resistência à tensão, compressão e torção, principalmente após calcificação<sup>41</sup>. Sua tripla hélice é composta por duas cadeias idênticas alfa-1 e uma alfa-2 [ $\alpha 1(I)_2 \alpha 2(I)$ ], sintetizadas a partir dos genes *COL1A1* e *COL1A2*<sup>48</sup>.

O colágeno tipo V é outro importante componente da matriz óssea. Descrito como colágeno fibrilar regulador, está normalmente presente em tecidos que expressam colágeno tipo I, uma vez que age como agente regulatório de sua fibrilogênese, desencadeando seu processo de confecção<sup>49,50</sup>. Sua tripla hélice composta de cadeias alfa pode se apresentar em ao menos três possíveis diferentes isoformas: heterotriméricas [ $\alpha 1(V)_2$

$\alpha 2(V)$ ] ou [ $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$ ] e homotrimérica [ $\alpha 1(V)_3$ ], sendo a primeira a mais frequente<sup>50</sup>.

Encontra-se incorporada e oculta entre as fibras de colágeno tipo I por copolimerização, formando uma rede estável de fibras heterotípicas estabilizadas por ligações intermoleculares<sup>48</sup>. Apesar de presente em pequenas quantidades (2 a 5%) o colágeno tipo V apresenta características específicas na manutenção de propriedades fisiológicas dos tecidos, já que é capaz de controlar o diâmetro das fibras heterotípicas. Tecidos com mais colágeno tipo V têm fibrilas mais finas e flexíveis, já que novos monômeros de colágeno tipo I são impedidos fisicamente de se ligarem, porém tecidos com menos colágeno tipo V têm fibrilas com diâmetro maior e menos flexíveis<sup>51</sup> (Figura 2).

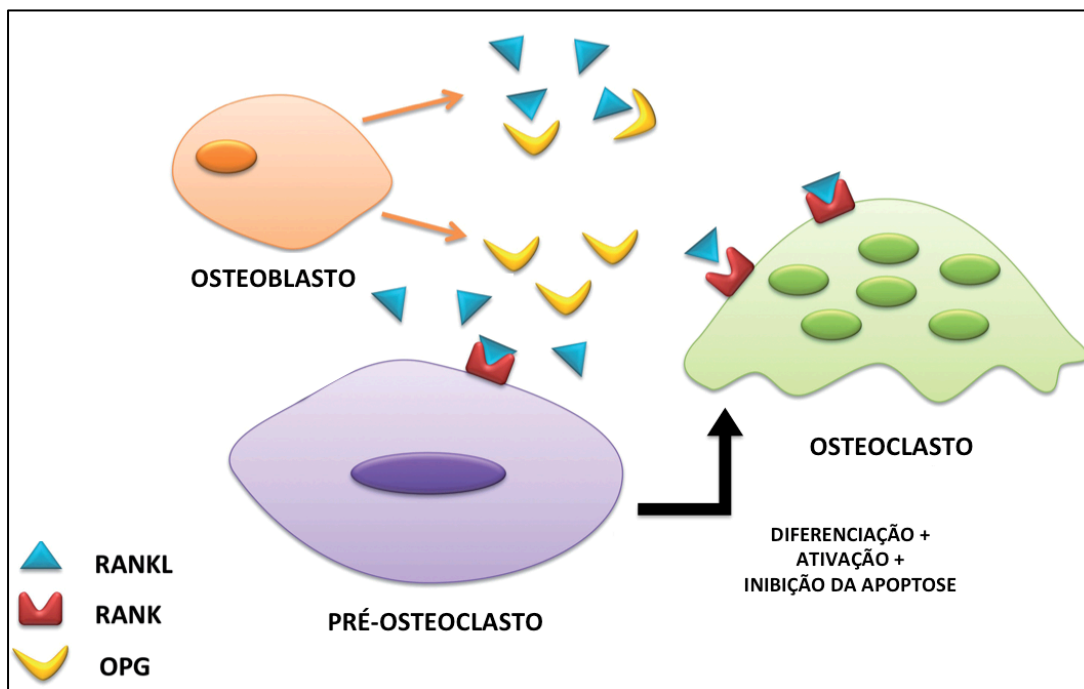


**Figura 2.** Esquema ilustrativo para representação da copolimerização das fibras heterotípicas de colágeno I e V. Adaptado de Levin et al. (2011)<sup>52</sup>.

Altos níveis de colágeno tipo V são ainda expressos em tecidos doentes, como os neoplásicos, ateroscleróticos, fibróticos e granulomatosos<sup>50</sup>. Uma vez que o colágeno tipo V tem características regulatórias e seu metabolismo é influenciado por citocinas que são afetadas pelo cigarro, uma possível relação entre os efeitos do tabagismo sobre o colágeno tipo V pode ser sugerida.

#### *1.4.2 Citocinas (RANKL e OPG)*

Dentre as citocinas presentes no tecido ósseo, chamamos atenção para o receptor ativador do ligante nuclear fator-kappa (RANKL ou CD254), membro da super-família dos fatores de necrose tumoral (TNF), produzido pelos osteoblastos durante a fase de reabsorção do remodelamento ósseo. Tem sido descrito como um marcador inflamatório de reabsorção óssea uma vez que estimula a proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos através da ligação RANK-RANKL<sup>53,54</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema ilustrativo da modulação osteoclástica via sistema RANKL/OPG. Osteoblastos produzem RANKL e OPG, reguladores do remodelamento ósseo. RANKL induz a proliferação, diferenciação e ativação de osteoclastos maduros. OPG inibe a ligação RANKL-RANK por bloqueio direto com RANKL. Adaptado de Castrogiovanni et al. (2016)<sup>54</sup>.

O RANKL, quando descoberto e isolado, foi ainda reconhecido com outros três nomes que tentam descrever um pouco sua função: TRANCE (citocina induzida por ativação relacionada ao TNF); OPGL (osteoprotegerina ligante) e ODF (fator de diferenciação de osteoclastos)<sup>55</sup>.

Para que a ativação ocorra, RANKL se liga aos receptores RANK expressos na superfície de células precursoras de osteoclastos (pré-osteoclastos). Após ativados, os osteoclastos aderem-se firmemente à superfície óssea usando podossomos especializados ricos em actina que são capazes de formar extensões circulares hermeticamente fechadas com a matriz óssea subjacente. Dentro destas regiões seladas, são ainda responsáveis pela secreção de ácidos, além de enzimas proteolíticas

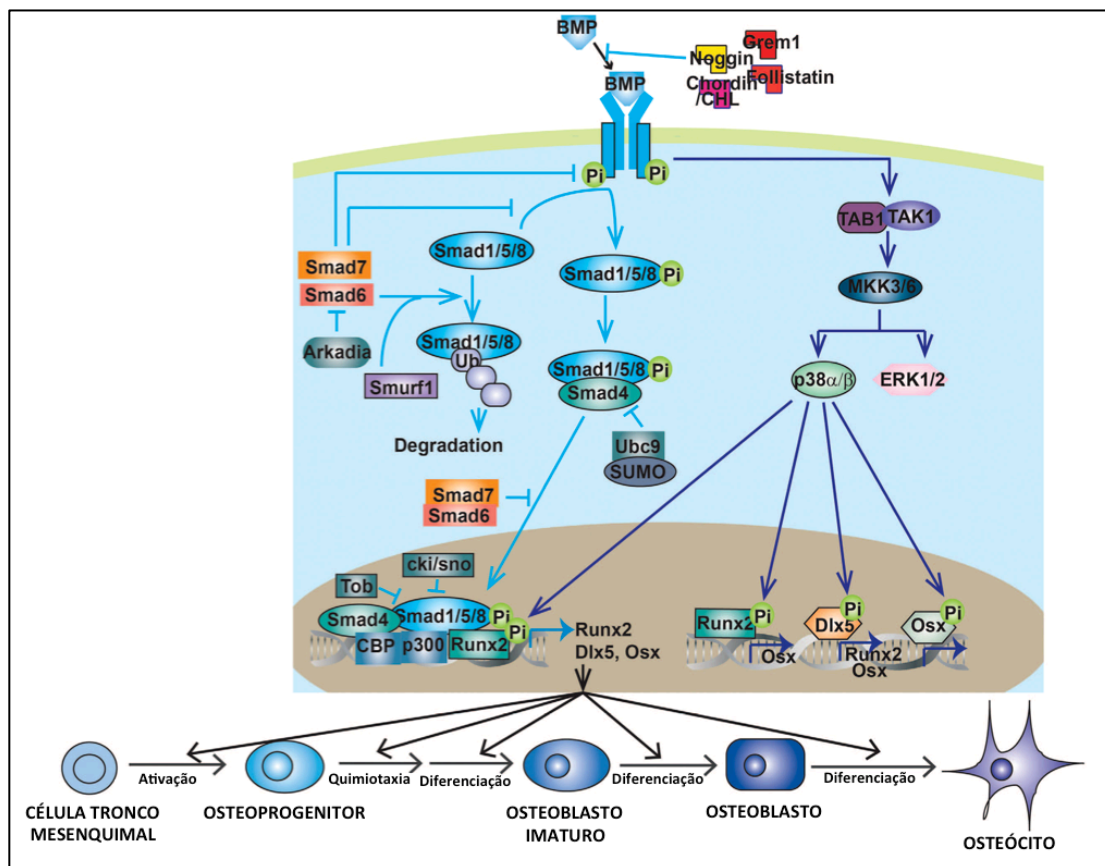
(catepsina K e metaloproteinases) capazes de destruir a matéria orgânica e inorgânica óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de reabsorção (ou lacunas de Howship)<sup>40</sup>.

As osteoprotegerinas (OPG), também produzidas pelos osteoblastos, são inibidores naturais da ação do RANKL, já que impedem que a ligação RANKL-RANK ocorra, não havendo assim diferenciação e ação dos osteoclastos<sup>56</sup>. Desta forma, reduções em seu nível de expressão deixariam de inibir a reabsorção óssea. A influência do tabagismo e da poluição na relação RANKL/OPG tem sido recentemente demonstradas<sup>53,56</sup>, sendo esta relação um dos principais determinantes da massa óssea.

#### *1.4.3 Fatores de crescimento (BMP)*

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são fatores de crescimento pertencentes à super-família dos fatores transformadores do crescimento (TGF) que apresentam papéis importantes no desenvolvimento do tecido ósseo e cartilagenoso (esqueletogênese), além da homeostase óssea pós-natal através da indução de precursores de osteoblastos e condrócitos<sup>57</sup>. Tem sido associadas a embriogênese e morfogênese de vários órgãos e tecidos, podendo regular o crescimento, diferenciação, quimiotaxia e apoptose de vários tipos celulares incluindo células mesenquimais, epiteliais, hematopoéticas e neuronais<sup>58</sup>. Descrito inicialmente em 1965 por Urist, atualmente existem mais de 20 diferentes tipos, sendo que BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-9 apresentam o maior potencial de indução osteoblástica a partir de células mesenquimais progenitoras<sup>59,60</sup>.

As BMP-2 são sintetizadas como um peptídeo precursor, processado a uma forma madura e secretado como um dímero. Estruturalmente podem ser descritas como um polipeptídeo glicosilado de 396 aminoácidos composto por uma sequência sinal de 19 aminoácidos, uma pró-região de 263 aminoácidos e um segmento maduro de 114 aminoácidos<sup>58</sup>. Seu mecanismo de ação inclui a ligação a receptores de membrana serina-treonina quinase tipo I e II na superfície celular, resultando em uma complexa cascata de sinalização intracelular via Smad ou MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) com transmissão direta ao núcleo celular e incorporação a complexos transcricionais, tendo como desfecho final ativação da expressão de genes alvo específicos que envolvem diferenciação osteoblástica e formação óssea<sup>61</sup> (Figura 4). O tabagismo em pacientes com DPOC é capaz de provocar uma regulação negativa da expressão gênica de receptores tipo II (BMP2), porém ainda pouco compreendida<sup>19</sup>.



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da sinalização óssea intracelular da BMP via Smad ou MAPK/MKK culminando com a diferenciação e maturação de células de linhagem osteoblástica. Adaptado de Wu et al. (2016)<sup>61</sup>.

Recombinantes humanos de BMP-2 e BMP-7 são utilizados atualmente na prática clínica em várias intervenções terapêuticas associadas a defeitos ósseos, não consolidação de fraturas, artrodeses e osteoporose devido ao seu potente estímulo a osteogênese<sup>59,60</sup>. A expressão de curto prazo de BMP-2 *in vivo* já é suficiente para a diferenciação osteocondral de células-tronco mesenquimais<sup>62</sup>.



### 1.5 Modelo experimental de DPOC

Os modelos experimentais são ferramentas que o pesquisador dispõe para o estudo de uma doença específica, uma vez que são capazes de refletir com alguma precisão sua fisiopatologia e permitir o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença<sup>63</sup>.

Apesar da utilização em modelos experimentais de várias espécies animais, como camundongos, cães, coelhos, porcos, ovelhas e primatas, os primeiros têm se destacado devido ao(a): baixo custo; amplo conhecimento atual de seu genoma; possibilidade de uso de animais modificados geneticamente e vasto mercado de venda de anticorpos específicos<sup>64</sup>.

Dentre os principais modelos experimentais de DPOC descritos podemos citar o induzido por instilação de proteases (elastase pancreática porcina) e o de exposição à fumaça de cigarro. Este último é o modelo que melhor mimetiza a etiologia desta doença em humanos, uma vez que o tabagismo é a principal causa de seu desenvolvimento<sup>65</sup>.

Os protocolos de exposição variam entre os estudos quanto ao tipo de exposição (corpo todo ou somente o nariz); tipo de cigarros (referência ou comercial); tempo/frequência de exposição; concentração; reservatório para exposição e cepas animais utilizadas<sup>64</sup>.

A utilização desta forma de exposição acarreta inflamação crônica tanto nos espaços peribroncovasculares quanto em porções distais do parênquima, alterações estruturais das vias aéreas, destruição das paredes alveolares e piora da função pulmonar<sup>66,67</sup>.

A grande vantagem desse modelo decorre do fato dele ser capaz de produzir, além de lesões teciduais pulmonares características do enfisema humano<sup>68</sup>, também alterações extrapulmonares, especificamente no sistema musculo-esquelético, como: redução do peso corporal, redução da massa muscular, redução da força de preensão e redução da resistência aeróbica (*endurance*)<sup>64,69</sup>.

Assim inferimos que por este mesmo modelo se consiga atingir também efeitos sobre o remodelamento ósseo decorrentes desta patologia.

### *1.6 Justificativa*

Embora estudos tenham demonstrado que o tabagismo, além de seus efeitos pulmonares, tenha o potencial de agir de forma deletéria no remodelamento do tecido ósseo induzindo a perda óssea, redução da densidade mineral óssea, estímulo à osteoclastogênese e inibição da osteoblastogênese, ainda está pouco compreendido quais mecanismos fisiológicos poderiam explicar estas alterações.

A dificuldade na compreensão deste processo decorre, entre outros fatores, da complexidade das vias de ativação e inibição celular mediadas por citocinas e fatores de crescimento que atuam na fisiologia óssea e da complexidade inerente a arquitetura óssea e seus constituintes.

Assim, um estudo temporal em modelo experimental de DPOC através da exposição a fumaça de cigarro que avalie a arquitetura óssea, constituição celular, matriz mineral e fibrilar e a análise de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente no metabolismo ósseo certamente

contribuirá para a obtenção dessas respostas e para a busca de melhores tratamentos de pacientes portadores de patologias ósseas associada ao tabagismo e DPOC.

### *1.7 Hipótese*

Em estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório por Barbosa et al. (2019)<sup>70</sup>, demonstramos que camundongos expostos à fumaça de cigarro por 45 dias já apresentaram comprometimento da mineralização óssea; aumento da ação osteoclastogênica e alteração da matriz fibrilar óssea (colágeno I e V). Ainda, ao tentar identificar mecanismos biológicos que explicassem estas alterações, evidenciou-se a redução de fatores de crescimento como VEGF e IGF-1 associados, respectivamente, a angiogênese e osteogênese; além de aumento da IL-6, de ação pró-inflamatória e envolvida no estímulo à formação osteoclástica.

Uma vez que vários estudos clínicos demonstram os efeitos deletérios do tabagismo não somente para os pulmões, com o desenvolvimento da DPOC, mas também sobre o metabolismo ósseo, pretendemos avaliar os efeitos desta exposição à fumaça de cigarro sobre o metabolismo ósseo durante o desenvolvimento da DPOC em modelo experimental.

Questionamos ainda se este efeito da exposição ao cigarro sobre o metabolismo ósseo seria progressivo ao longo do desenvolvimento da doença e, para isso, propusemos um estudo temporal com 1, 3 e 6 meses de exposição para avaliação da arquitetura óssea, sua constituição celular, da matriz mineral e fibrilar. Além disso, como forma de expandir a análise e

interpretação de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente ao metabolismo ósseo, optamos por avaliar RANKL, OPG e BMP-2 nestes mesmos grupos temporais.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito temporal da exposição a fumaça de cigarro sobre o remodelamento ósseo através de um modelo experimental de DPOC em camundongos.

Nossos objetivos específicos foram analisar a arquitetura trabecular óssea, sua constituição celular, matriz mineral e fibrilar, além de possíveis mecanismos biológicos mediados por citocinas e fatores de crescimento específicos ao metabolismo ósseo.

Tivemos ainda como objetivo secundário avaliar, neste modelo experimental, o efeito da cessação da exposição a fumaça de cigarro sobre o tecido ósseo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para este estudo experimental foram necessários 66 (sessenta e seis) camundongos C57BL/6 machos jovens adultos (6-8 semanas), com peso médio de 26g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Todos animais receberam os cuidados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório<sup>71</sup> e com a Lei Arouca (Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Os animais foram acondicionados em baias específicas de polipropileno para camundongos (aproximadamente 5 animais/baia) com as seguintes medidas (30 x 20 x 13cm) no Biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental da FMUSP. Todos os animais tiveram acesso irrestrito a água e ração (Nuvilab® CR-1 Irradiada, Quimtia S.A., Colombo/PR, Brasil), contendo 1,4% de cálcio e 0,8% de fósforo. Foram ainda mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com luz das 7h às 19h, em temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo cuidados por um profissional treinado e capacitado. Um período de adaptação destes animais de ao menos 3 semanas foi ainda estabelecido. Todas as atividades deste projeto foram realizadas nas dependências dos LIM-20, LIM-17 e LIM-16 que possuem todos os recursos e infra-estrutura necessários para realização deste protocolo. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da FMUSP, registrada com o número 937/2017.

Não houve necessidade da realização de um estudo piloto, uma vez que o mesmo modelo utilizado neste trabalho já havia sido testado previamente em nosso laboratório<sup>70</sup>.

### *3.1.1 Descarte de animais*

Os animais foram descartados segundo normas estabelecidas na FMUSP pelo Grupo Técnico de Gerenciamento de Resíduos.

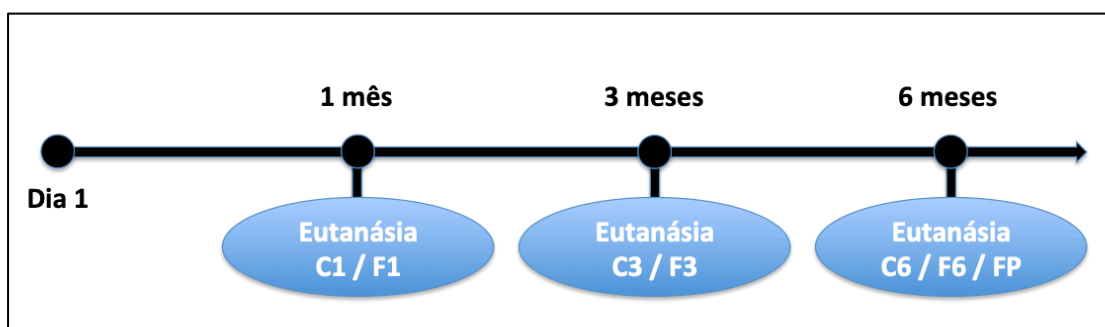
A FMUSP gera resíduos dos grupos A (infectantes), B (químicos), C (radioativos), D (comuns) e E (perfurocortantes) classificados pelas Legislações da ANVISA e CONAMA.

As carcaças dos animais utilizados em ensino e pesquisa fazem parte do grupo A e seu manejo desde a geração até as disposições finais segue algumas etapas. Após sua segregação, o resíduo é acondicionado em sacos próprios de material resistente e identificado com símbolo de substância infectante, sendo então transportado e mantido em câmara fria no abrigo de resíduos. O veterinário responsável emite então o laudo técnico de controle sanitário liberando as carcaças para recolhimento, que ocorre três vezes por semana pela LIMPURB, para tratamento e disposição final.

### *3.2 Grupos experimentais*

Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos: **Controle (C)**, composto por 30 animais mantidos no biotério recebendo ar filtrado durante 1 mês (C1=10), 3 meses (C3=10) e 6 meses (C6=10), até a eutanásia;

**Fumo (F)**, composto por 30 animais expostos a fumaça de cigarro durante 1 mês (F1=10), 3 meses (F3=10) e 6 meses (F6=10), até a eutanásia; **Fumo Provisório (FP)**, composto por 6 animais expostos a fumaça de cigarro durante 3 meses, seguido de mais 3 meses mantidos no biotério recebendo ar filtrado (FP=6). A Figura 5 mostra a linha do tempo até a eutanásia conforme os grupos de exposição.



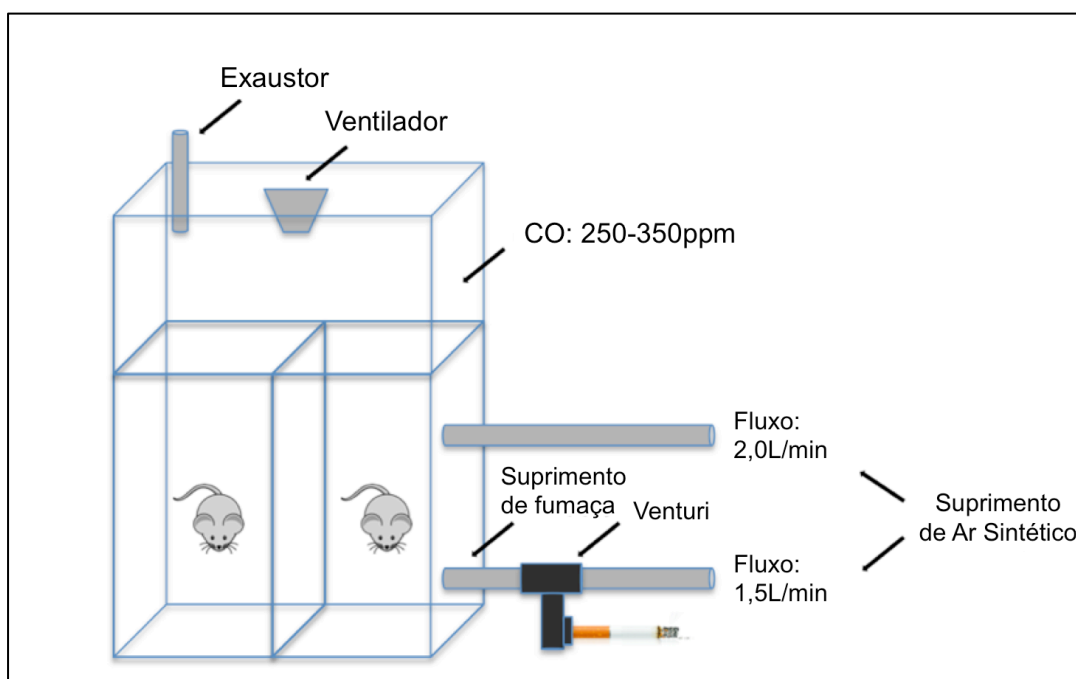
**Figura 5.** Linha do tempo até a eutanásia conforme os grupos de exposição.

### 3.3 Exposição à fumaça de cigarro para indução de DPOC

A exposição à fumaça de cigarro foi realizada de acordo com protocolo previamente descrito por Toledo et al. (2012)<sup>72</sup> que consiste na utilização de uma câmara para inalação de 28L contendo dois pontos de entrada para ar e fumaça, um ponto de saída, além de um aerador para aumentar a mistura ar/fumaça. O ar sintético, conectado a uma das entradas, tem fluxo de 2L/min. O ar sintético conectado a segunda entrada passa antes por um sistema Venturi acoplado a um cigarro aceso, promovendo a sucção da fumaça para dentro do reservatório (Figura 5). Os níveis de monóxido de carbono (CO) mantidos no interior do reservatório variam entre 250 e 350ppm e, para isto, o



fluxo de fumaça direcionado ao reservatório pela segunda entrada é mantido em 1,5L/min. Os animais foram expostos a  $12 \pm 1$  cigarros filtrados por dia (composição segundo o fabricante: 0,8mg de nicotina, 10mg de alcatrão e 10mg de CO). Esta forma de exposição mantém concentração média de carboxihemoglobina em  $10 \pm 1,3\%$  e a concentração total de material particulado por volta de  $354,8 \pm 50,3 \mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{dia}$ . As exposições foram realizadas em 2 períodos de 30 minutos por dia, 5 dias por semana, por um tempo total de 1, 3 e 6 meses a depender do grupo de exposição em que o animal foi alocado, sendo F1 (1 mês), F3 e FP (3 meses) e F6 (6 meses). Animais dos grupos controle C1, C3 e C6 foram mantidos no biotério recebendo apenas ar filtrado, respectivamente por 1, 3 e 6 meses.



**Figura 6.** Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.

### 3.3.1 Perdas de animais

Durante o período de exposição a fumaça de cigarro, tivemos algumas perdas de animais relacionadas ao tempo de exposição ou a fatores intrínsecos ao animal. As perdas ocorreram nos grupos C6 (3 animais), F1 (1 animal), F3 (2 animais) e FP (2 animais).

## 3.4 Avaliação pulmonar

### 3.4.1. Avaliação da mecânica respiratória

Para realizar a avaliação da mecânica pulmonar, os animais foram anestesiados com Tiopental (50mg/kg) por via intraperitoneal e traqueostomizados com instalação de um cateter vascular 20G conectado a um respirador para pequenos animais (*FlexiVent, SCIREQ, Canada*).

Com objetivo de evitar esforços respiratórios e interferência nas análises, os animais receberam administração de pancurônio (0,2mg/kg), um bloqueador neuromuscular não despolarizante, seguido de ventilação mecânica a um volume corrente de 10mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto.

Para o cálculo da impedância do sistema (ZL), utilizamos o modelo de fase constante descrito por Hantos et al. (1992)<sup>73</sup>, no qual Raw e law equivalem a resistência e inertância das vias aéreas (sem interferência dos tecidos pulmonares); j é uma unidade imaginária;  $\omega$  é a frequência angular; Gtis avalia

a resistência tecidual pulmonar e  $H_{tis}$  a elastância do tecido pulmonar (energia acumulada).

Desta forma,  $ZL = R_{aw} + j \cdot \omega \cdot I_{aw} + (G_{tis} - j \cdot H_{tis}) / \omega^\alpha$ , sendo

$\alpha = (2 / \pi) \cdot \arctg (H_{tis} / G_{tis})$ .

Os valores de  $H_{tis}$  e  $G_{tis}$  foram multiplicados pelo peso corporal de cada animal para obtenção dos valores normalizados. Esta normalização é descrita em estudos prévios e é realizada devido a variabilidade do peso causada pela exposição a fumaça de cigarro ao longo dos meses<sup>66,72,74</sup>.

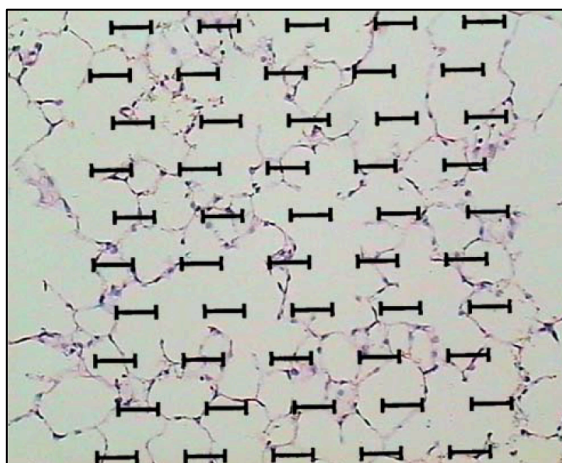
### *3.4.2 Avaliação histológica do parênquima pulmonar*

Após avaliação da mecânica respiratória, os animais foram eutanasiados nos tempos correspondente ao grupo do qual cada um faz parte (1, 3 ou 6 meses). A eutanásia foi realizada por exsanguinação através de secção da veia cava inferior.

Os pulmões foram retirados e fixados em formaldeído a 10% através de cateterização traqueal e infusão a pressão constante (20cmH<sub>2</sub>O) por 24h<sup>75</sup>. Os pulmões fixados foram posteriormente incluídos em parafina, submetidos a cortes transversais de 4µm de espessura e preparo histológico com coloração de hematoxilina e eosina (H&E).

A quantificação microscópica do enfisema pulmonar foi feita por meio da avaliação do intercepto linear médio (Lm), índice que avalia o diâmetro médio dos espaços aéreos distais<sup>76</sup>.

A análise morfométrica convencional foi realizada em microscópio óptico comum (*Olympus U-DO, Olympus Co., Japan*), utilizando o princípio de contagem de pontos em estruturas teciduais descrito por Hsia et al. (2010)<sup>77</sup>. Através de um retículo com 100 pontos e 50 segmentos de retas, em aumento de 200x e análise de 15 campos aleatórios, foi realizada a quantificação do número de vezes que as retas do retículo cruzam (interceptam) as paredes dos alvéolos (Figura 6). Os brônquios e as estruturas vasculares foram eliminadas da análise.



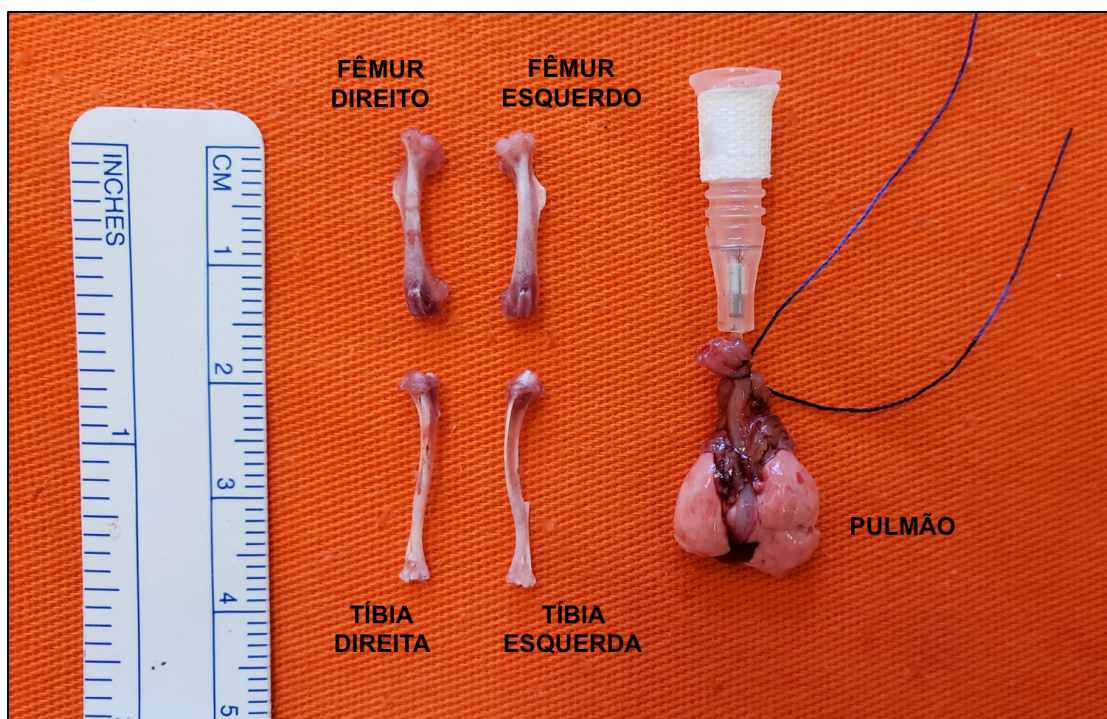
**Figura 7.** Retículo contendo 100 pontos e 50 segmentos de retas utilizado para avaliação do intercepto linear médio (Lm) em microscópio óptico comum. Aumento de 200x.

O índice Lm ( $\mu\text{m}$ ) foi calculado pela relação do somatório de todos os seguimentos de reta do retículo ( $L_{\text{total}} = 2500\mu\text{m}$ ) pela média do número de vezes que as retas do retículo interceptam as paredes dos alvéolos (Nm) nas regiões mais periféricas do parênquima e ao redor das vias aéreas.

Desta forma,  $Lm = L_{\text{total}} / Nm$ , ou seja,  $Lm = 2500\mu\text{m} / Nm$ .

Após eutanásia nos tempos determinados (1, 3 ou 6 meses) e extração pulmonar, os animais foram submetidos a um procedimento de extração dos ossos femoral e tibial bilateral (Figura 7), seguido de quatro avaliações conforme descrição abaixo:

- Avaliação celular e da matriz mineral óssea;
- Avaliação da matriz fibrilar óssea;
- Avaliação da expressão de citocinas e fatores de crescimento;
- Avaliação da expressão gênica de *COL1A1*.

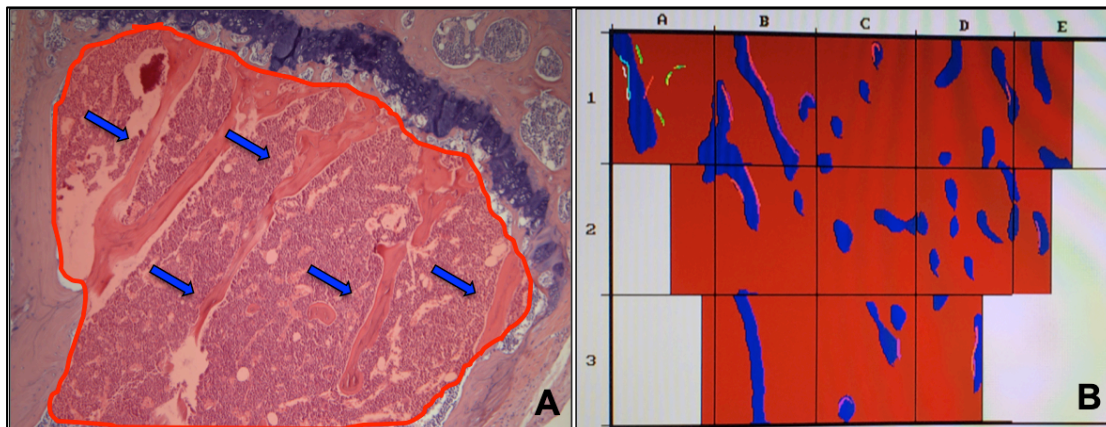


**Figura 8.** Tecidos extraídos (fêmur bilateral, tíbia bilateral e pulmões).

### 3.5 Avaliação celular e da matriz mineral óssea:

As tíbias direitas de cada animal foram submetidas a extração cirúrgica e limpeza dos tecidos adjacente, seguidas de imersão em álcool 70% e preparadas em um meio de incorporação de metilmetacrilato para osso não descalcificado, conforme técnica previamente descrita<sup>78</sup>. Através de uma PolycutS equipada com uma lâmina de tungstênio (*Leica, Heidelberg, Germany*) foram obtidos 12 cortes histológicos de 5µm de espessura distribuídos em 6 lâminas com dois cortes cada e coradas com azul de toluidina 0,1%, pH 6,4 e lamínulas com suporte médio Entellan H (*Merck, Darmstadt, Germany*).

Parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos da formação óssea e reabsorção foram aferidos em 8 a 10 campos dentro da metáfise proximal tibial utilizando um método padronizado de análise de imagem em que as estruturas de interesse foram marcadas manualmente (Figura 9) utilizando um microscópio (*Nikon, Labophot-2A, Japan*), cursor e placa digitalizadora. O cálculo final dos parâmetros foi realizado através de um software específico para histomorfometria - OsteoMeasure (*OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, USA*).



**Figura 9.** A. Fotomicrografia corada por H&E da região metafisária tibial (esponjosa secundária) de camundongo destacada em vermelho onde se realizou a avaliação histomorfométrica das trabéculas ósseas (setas azuis). B. Imagem já digitalizada da região metafisária tibial em vermelho onde são evidenciadas as trabéculas ósseas em azul.

Todas as medidas dos parâmetros histomorfométricos foram realizadas na região óssea metafisária, abaixo do ponto mais inferior da placa de crescimento (abaixo da esponjosa primária) e interno a cortical lateral, excluindo o osso cortical<sup>78</sup>. Esta área selecionada é composta por osso esponjoso rico em trabéculas (esponjosa secundária). Todos os parâmetros foram aferidos de acordo com o preconizado pela *American Society of Bone Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee*<sup>79</sup>.

Os parâmetros histomorfométricos são geralmente divididos em estruturais e de remodelamento, sendo o último subdividido em reabsortivos e formativos. **Parâmetros estruturais** incluem a relação do volume ósseo trabecular com o volume ósseo total (BV/TV), a espessura trabecular (Tb.Th), o número trabecular (Tb.N) e a separação trabecular (Tb.Sp). **Parâmetros de remodelamento** que incluem os reabsortivos como a área da superfície erodida (ES/BS) e a superfície osteoclástica (Oc.S/BS); e os formativos como a espessura do osteóide (O.Th), a área da superfície osteóide (OS/BS), a superfície osteoblástica (Ob.S/BS) (Tabela 1). Todas as análises foram

realizadas com cegamento do avaliador. Os índices foram todos reportados utilizando a nomenclatura recomendada pela *American Society for Bone and Mineral Research*<sup>79</sup>.

**Tabela 1.** Parâmetros histomorfométricos avaliados.

Parâmetro Histomorfométrico	Abreviação	Unidade
<b>Estruturais:</b>		
-Relação do volume ósseo trabecular com o volume ósseo total	BV/TV	%
-Espessura trabecular	Tb.Th	$\mu\text{m}$
-Número trabecular	Tb.N	$\text{mm}^{-1}$
-Separação trabecular	Tb.Sp	$\mu\text{m}$
<b>Remodelamento Reabsortivos:</b>		
-Área de superfície erodida	ES/BS	%
-Superfície osteoclástica	Oc.S/BS	%
<b>Remodelamento Formativos:</b>		
-Espessura do osteóide	O.Th	$\mu\text{m}$
-Área da superfície osteóide	OS/BS	%
-Superfície osteoblástica	Ob.S/BS	%

### 3.6 Avaliação da matriz fibrilar óssea

#### 3.6.1 Preparo histológico ósseo

As tíbias esquerdas de cada animal foram submetidas à extração cirúrgica e limpeza dos tecidos adjacente. Posteriormente os tecidos coletados foram fixados em formol 10% tamponado por 24 horas, descalcificados com solução de ácido nítrico 7% por 3 dias, lavados em água corrente por 20 minutos, banhados em água destilada e finalmente imersos em formol 10% tamponado. Após esse período, as amostras de osso foram imersas em álcool 70% por dois dias e incluídos em parafina. Foram realizados cortes com 4 $\mu\text{m}$  de espessura, com espaço de 50  $\mu\text{m}$  entre eles, para utilização nas técnicas de coloração histológica e de imunofluorescência.



### 3.6.2. Imunofluorescência para colágeno tipo I e V

Para realizar a imunomarcagem de colágenos tipo I e V cortes tibiais foram preparados em lâminas silanizadas, previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy Silano (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*). A desparafinização foi realizada com xilol aquecido (60°C) por 30 minutos, seguido de dois banhos de 10 minutos em xilol em temperatura ambiente. A rehidratação foi realizada através de lavagens em etanol 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=7,4).

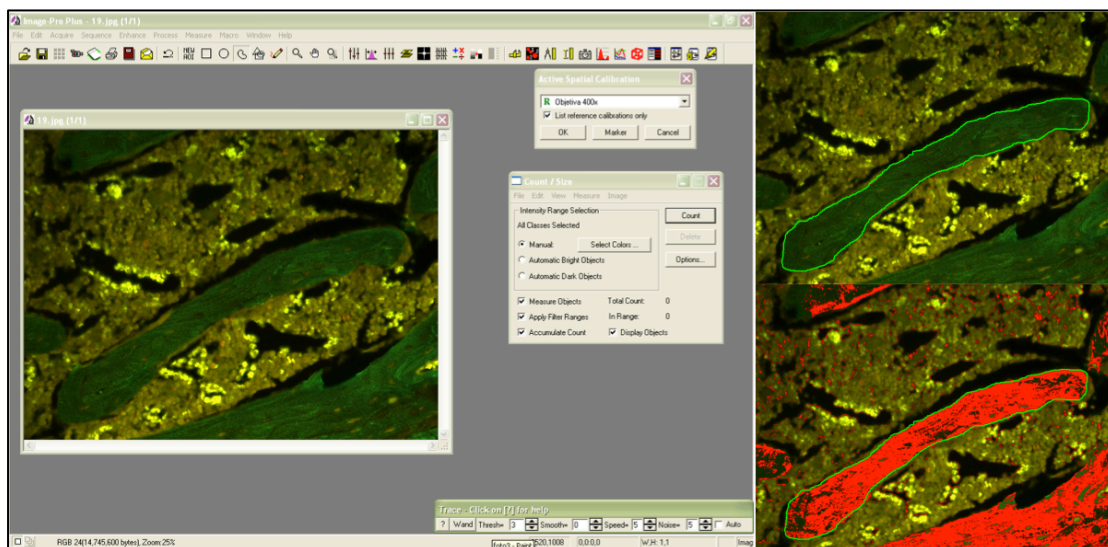
Para a exposição e recuperação dos sítios antigênicos os cortes foram submetidos à digestão com tampão citrato, pH=6,0 (*Diagnostic BioSystems, CA, USA*) por 10 minutos, a 95°C. Ao término desta incubação os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com água corrente e um ciclo de água destilada e posteriormente lavado com PBS por três vezes de 10 minutos.

Para a imunodeteção de colágeno tipo I e V, os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos policlonais de coelho anti-colágeno do tipo I (1:50, *Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA*) e anti-colágeno do tipo V (1:30, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*), diluídos em solução de PBS. As amostras foram lavadas em PBS com Tween<sub>20</sub> 0,05% e incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente com anticorpos de cabra anti-IgG de coelho ALEXA 488 (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USP*), diluídos 1:200 em Azul de Evans. Por fim, as lâminas

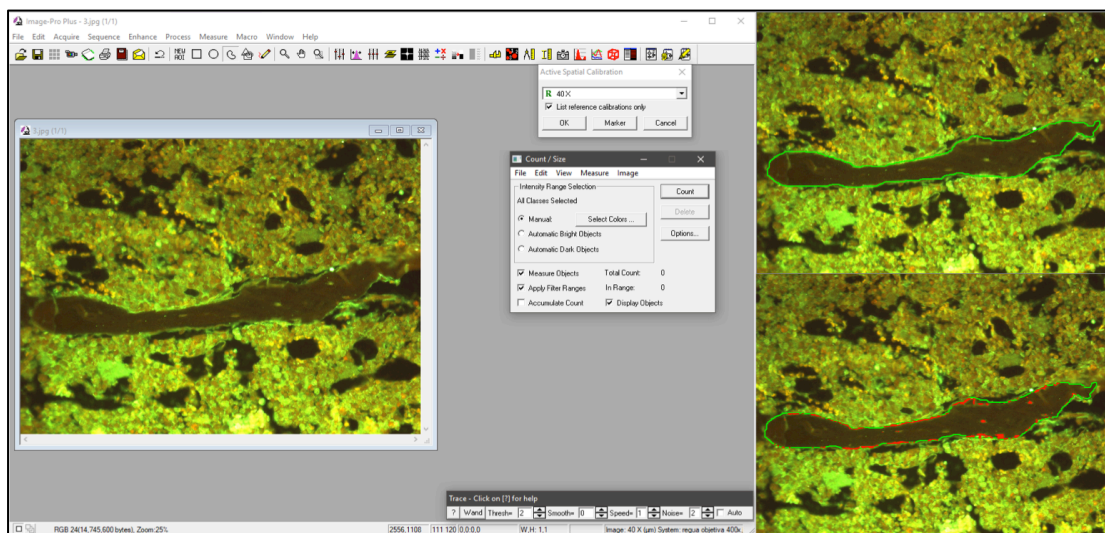
foram novamente lavadas, por cinco vezes, com PBS e Tween<sub>20</sub> 0,05% e montadas com solução de glicerina tamponada<sup>80</sup>.

As lâminas imunomarcadas foram visualizados em microscópio de imunofluorescência Olympus BX-51 (*Olympus BX51, Olympus Co., Tokyo, Japan*). Técnica de histomorfometria foi utilizada para quantificar a presença de fibras imunomarcadas com colágeno tipo I e V em trabéculas ósseas na região metafisária proximal tibial, por meio de análise de imagem digitalizada em aumento de 400x.

O sistema de digitalização e avaliação de imagem é constituído por uma câmera fotográfica (*Olympus Co., St. Laurent, Quebec, Canada*), acoplada ao microscópio de imunofluorescência, que captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (*Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada*). As imagens são então processadas por um software específico (*Image - Pro Plus 6.0.*) que permite analisar as fibras imunomarcadas em tonalidade verde, sendo o resultado apresentado como porcentagem em relação a área total das trabéculas. O resultado final de cada lâmina foi descrito como média de todas as trabéculas ósseas avaliadas (Figura 10 e 11).



**Figura 10.** Imagem representativa dos passos para análise da imunofluorescência para colágeno tipo I na trabécula óssea, utilizando o software Image Pro Plus 6.0. À direita, trabécula óssea delimitada (linha verde) e colorida (vermelho) nas áreas em que há presença de colágeno tipo I.



**Figura 11.** Imagem representativa dos passos para análise da imunofluorescência para colágeno tipo V na trabécula óssea, utilizando o software Image Pro Plus 6.0. À direita, trabécula óssea delimitada (linha verde) e colorida (vermelho) nas áreas em que há presença de colágeno tipo V.

### 3.7 Avaliação da expressão de citocinas e fatores de crescimento

Os ossos femorais esquerdos de cada animal, previamente submetidos a extração cirúrgica e limpeza dos tecidos adjacente, foram estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após finalização das exposições em todos os grupos, o tecidos foram homogeneizados e as avaliações das expressões de RANKL, OPG e BMP-2 foram realizadas por método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). O homogenato ósseo foi obtido através de um dispositivo manual específico conforme mostrado na figura 12.

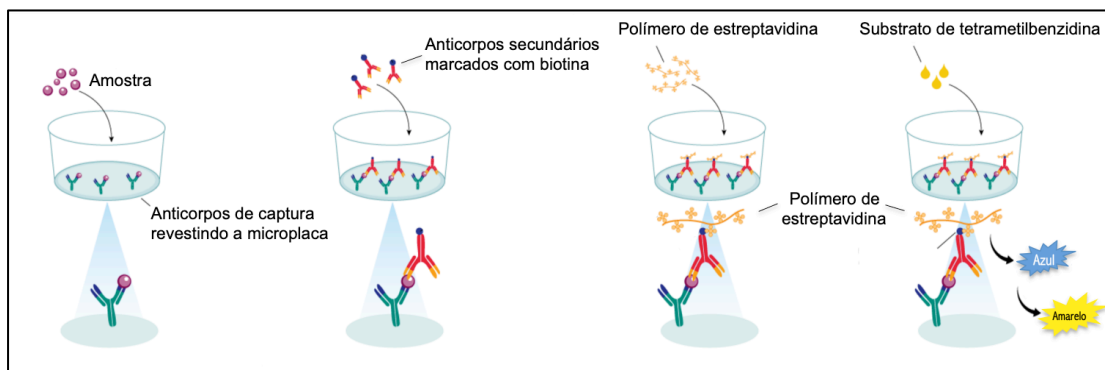


**Figura 12.** Dispositivo composto por um reservatório metálico inferior maior (asterisco) onde é colocado gelo seco, acoplado a um reservatório metálico superior menor (seta branca) onde é obtido o homogenato ósseo femoral através de disparos manuais com uma pistola específica (seta preta).

As análises foram realizadas de acordo com as especificações de cada fabricante:

- RANKL (*Mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit – R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*);
- OPG (*Mouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B Quantikine ELISA Kit – R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*);
- BMP-2 (*Mouse BMP-2 ELISA Kit (Colorimetric) – NovusBiologicals, Centennial, CO, USA*).

Para a análise das amostras pelo método ELISA foram utilizadas microplacas previamente revestidas com anticorpos de captura. As amostras foram então adicionadas aos poços de análise para que a proteína estudada se ligue ao anticorpo de captura. Um anticorpo secundário de detecção marcado com biotina foi adicionado a solução para que também se ligue a proteína estudada. Um polímero de estreptavidina foi utilizado para marcar os anticorpos secundários de detecção. Posteriormente, uma solução contendo substrato de tetrametilbenzidina foi adicionada a solução gerando o surgimento de uma coloração azulada com tonalidade proporcional a quantidade da proteína estudada. A reação foi interrompida gerando uma modificação da coloração da solução para amarela e então submetida a análise de absorvância de cor (Figura 13).



**Figura 13.** Método ELISA para avaliação das expressões de RANKL, OPG e BMP-2.

### 3.8 Avaliação da expressão gênica de COL1A1

#### 3.8.1 Extração do RNA

Para a avaliação da expressão gênica de *COL1A1* os tecidos ósseos femorais direitos, previamente submetidos à extração cirúrgica e limpeza dos tecidos adjacente, foram estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após finalização das exposições em todos os grupos, os tecidos foram homogeneizados para isolamento do RNA total de acordo com o protocolo padrão de isolamento de *RNA Trizol*® (*Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA*). O homogenato ósseo foi obtido através de dispositivo metálico manual previamente descrito (Figura 12).

Para a separação do RNA, as amostras do tecido imerso no *RNA Trizol*® foram incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, após adição de 200µL de clorofórmio, as amostras foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos, e submetidas à centrifugação (12.000 rpm) por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo. Para a precipitação do RNA, foram adicionados às amostras 500µl de álcool isopropílico, as quais foram homogeneizadas por

inversão e mantidas no freezer a -20°C por um período de 12 horas. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 rpm) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA diluído em 1ml de etanol (85%) e submetido a nova centrifugação (2.500 rpm) por 5 minutos a 4°C. Por fim, o RNA foi dissolvido em 20µL de H<sub>2</sub>O deionizada, tratada com dietilpirocarbonato (*DEPC; Merck, Darmstadt, Germany*), que constitui um forte inibidor de ribonuclease. O RNA total de cada amostra foi então quantificado e teve seu grau de pureza avaliado em espectrofotômetro (*NanoVue Plus® Spectrophotometer; GE Healthcare, Chicago, IL, USA*) a partir de 2µL de amostra dissolvidos em H<sub>2</sub>O DEPEC. Para a obtenção de RNA com alto grau de pureza, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm foi de 1,7 e 2,0.

### *3.8.2 Reação de transcrição reversa com amplificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)*

O método de PCR em tempo real se baseia em adequações da técnica de PCR convencional para uma maior sensibilidade, combinando amplificação e detecção em um único passo. Marcadores fluorescentes intercalantes na dupla fita de DNA são utilizados para a quantificação do produto amplificado através da análise da intensidade de fluorescência obtida.

A sequência dos genes de interesse foram adquirida através do endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> e mostrada na Tabela 2 .



**Tabela 2.** Oligonucleotídeos empregados para qRT-PCR quantitativo.

Gene	<i>Sense 3'→5'</i>	<i>Antisense 5'→3'</i>
<i>COL1A1</i>	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG	GCT TCT TTT CCT TGG GGT TC
<i>GAPDH</i>	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA

Todas as misturas para a reação de transcriptase reversa foram preparadas utilizando-se o equipamento Step One (*Applied Biosystems – Foster City, CA, USA*), com o kit Super Script III Platinum SYBR® Green One-Step qRT-PCR (*Life Technologies*). Cada reação foi realizada com 15µL, contendo 1,45 µL de água deionizada estéril; 7,5 µL da mistura de reação 2XSYBER® Green; 0,3 µL de cada *primer*, a 10nM; 0,3 µL de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; 0,15 µL de ROX Reference Dye e 5 µL de RNA total, a 20ng/mL. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra).

As amplificações foram normalizadas utilizando o gene *GAPDH* como controle interno, uma vez que sua expressão se mantém constante em camundongos, não sendo influenciada pela exposição à fumaça de cigarro.

A avaliação da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Neste método<sup>81</sup>, calcula-se o  $\Delta Ct$  que corresponde ao número de Ct (*Cycle threshold*) do gene estudado normalizado pelo Ct do gene *GAPDH* (*Housekeeping*). O Ct do gene alvo corresponde ao número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal de fluorescência acumulado da reação ultrapasse o limiar.

$$\text{Assim, } \Delta Ct_{COL1A1} = Ct_{COL1A1} - Ct_{GAPDH} \text{ e}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{COL1A1} - \Delta Ct_{\text{médio do controle}}$$



As reações de qRT-PCR foram padronizadas com o intuito de encontrar a melhor temperatura de anelamento para o gene em estudo. Os tamanhos dos fragmentos gerados pelo qRT-PCR foram validados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo. As condições de ciclagem para todos os genes foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Foi realizada curva de fusão (*melting*) para verificação e certificação de um único pico de fluorescência para cada amostra analisada.

### 3.9 Análise estatística

Todos os dados de comparação entre os grupos Fumo (F), Controle (C) e Fumo Provisório (FP) nos diferentes tempos estudados foram analisados utilizando o software *IBM SPSS® Statistics V21.0 for Windows*. O nível de significância utilizado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

#### 3.9.1 Estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal foram realizadas apresentando as médias acompanhadas dos respectivos desvios-padrão. Para os dados quantitativos sem distribuição normal, os resultados foram expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

### 3.9.2 Estatística inferencial

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal em que foram analisados dois fatores (grupo e tempo) foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) e, quando foi necessária a realização de comparações múltiplas de médias, foi utilizado o teste de *Bonferroni*. Quando a variável não apresentou distribuição normal, recorreremos ao teste de *Mann-Whitney* para o fator grupo. Para o fator tempo foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* e quando foi necessária a realização de comparações múltiplas, foi utilizado o teste de *Dunn*.

Na comparação entre os grupos (Controle, Fumo e Fumo Provisório) com tempo de seis meses, foi utilizado o teste ANOVA de um fator.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação pulmonar

#### 4.1.1 Avaliação da mecânica respiratória

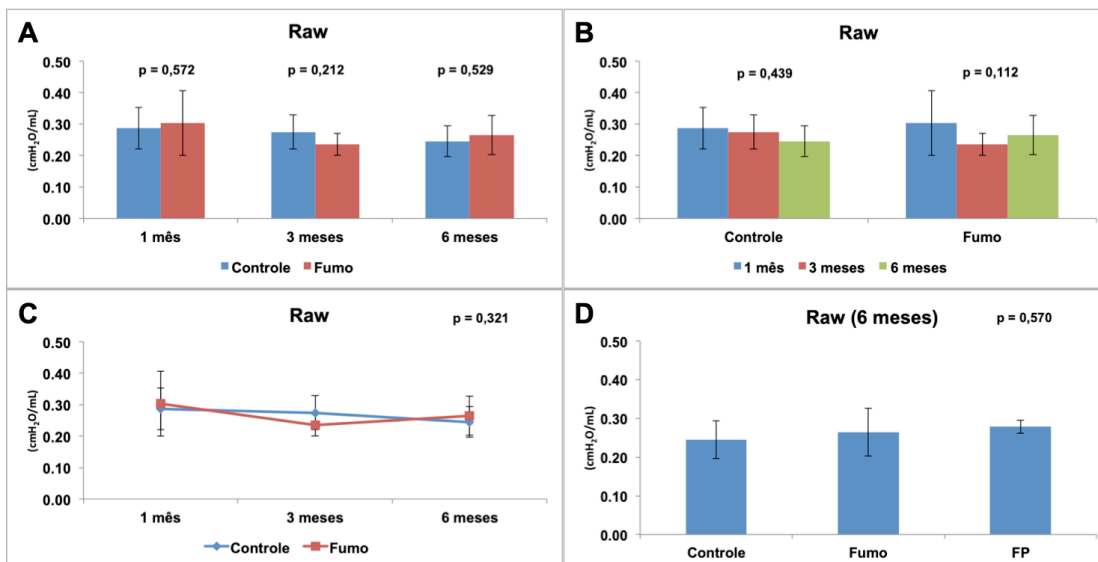
Os parâmetros da avaliação mecânica do sistema respiratório, que incluem **Raw**, **Gtis** e **Htis** nos grupos controle e fumo com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6, F6 e FP) de seguimento são mostrados nas figuras 14, 15 e 16, respectivamente.

A avaliação da resistência das vias aéreas (Raw) não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 14A): C1 x F1 ( $p=0,572$ ); C3 x F3 ( $p=0,212$ ); C6 x F6 ( $p=0,529$ ).

Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle bem como entre os grupos Fumo no decorrer do tempo (Figura 14B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,439$ ); F1 x F3 x F6 ( $p=0,112$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (Raw), controle e fumo são independentes do tempo ( $p=0,321$ ) (Figura 14C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 14D), não houve também diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,570$ ).



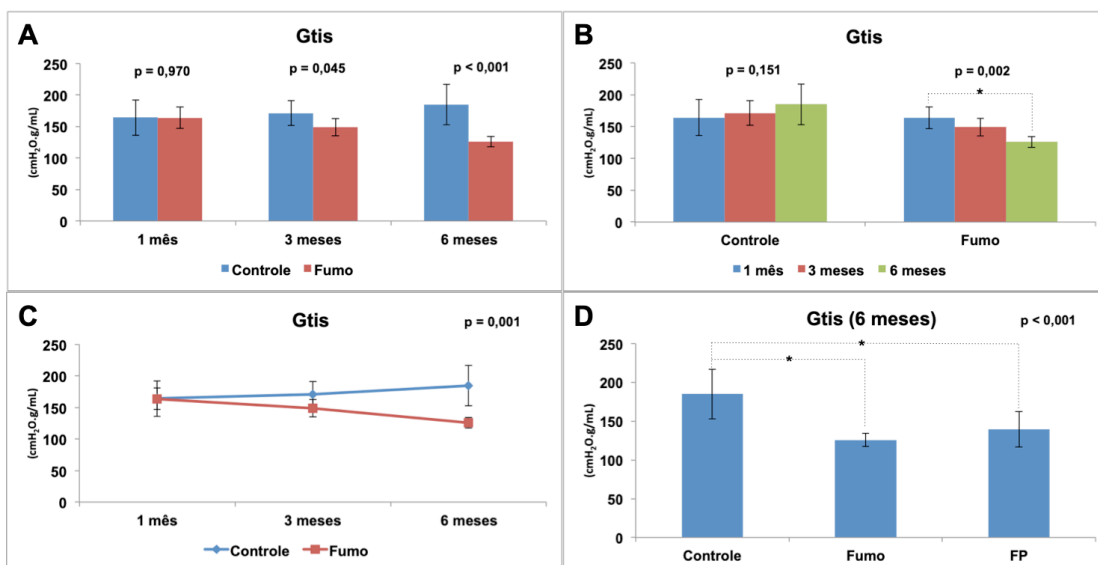
**Figura 14.** Avaliação da resistência das vias aéreas (Raw). Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão.

A avaliação da resistência do tecido pulmonar (Gtis) normalizada pelo peso evidenciou redução dos valores nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle com 3 e 6 meses de seguimento (Figura 15A): C1 x F1 ( $p=0,970$ ); C3 x F3 ( $p=0,045$ ); C6 x F6 ( $p<0,001$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo (Figura 15B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,151$ ). Porém, houve redução estatisticamente significativa entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (Figura 15B): F1 x F3 x F6 ( $p=0,002$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F1 x F6 ( $p=0,001$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (Gtis), controle e fumo são dependentes do tempo ( $p=0,001$ ) (Figura 15C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 15D), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre C6 x F6 ( $p < 0,001$ ) e C6 x FP ( $p = 0,013$ ), mas não entre F6 x FP ( $p = 0,977$ ), mostrando que a pausa de 3 meses de exposição a fumaça de cigarro ocorrida no grupo FP não trouxe nenhuma melhora identificável no parâmetro analisado (Gtis), quando comparado ao grupo F6.



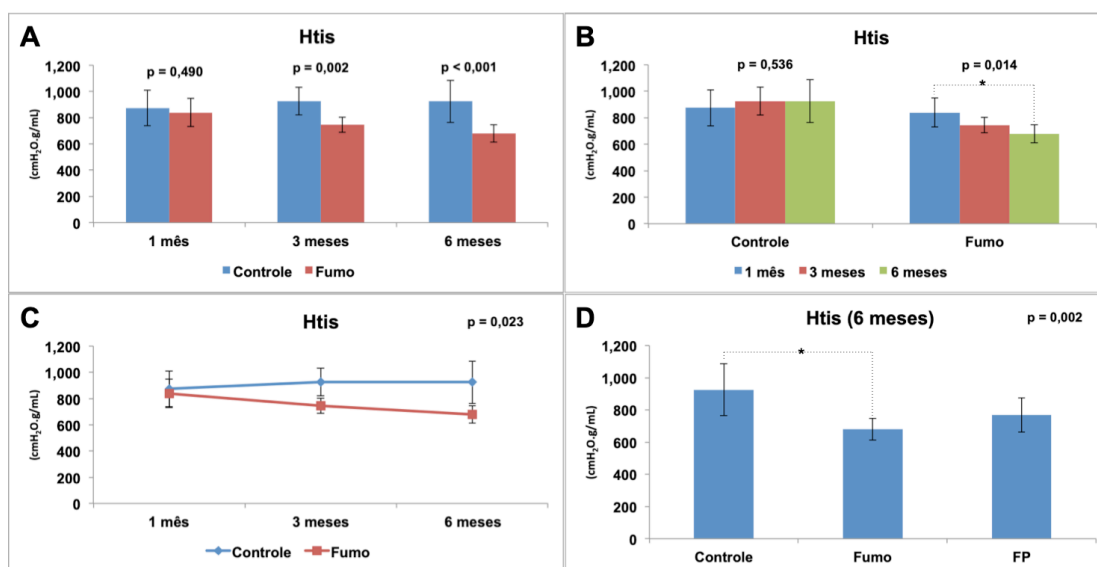
**Figura 15.** Avaliação da resistência do tecido pulmonar (Gtis). Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

A avaliação da elastância do tecido pulmonar (Htis) normalizada pelo peso evidenciou redução dos valores nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle com 3 e 6 meses de seguimento (Figura 16A): C1 x F1 ( $p = 0,490$ ); C3 x F3 ( $p = 0,002$ ); C6 x F6 ( $p < 0,001$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo (Figura 16B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,536$ ). Porém, houve redução estatisticamente significativa entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (Figura 16B): F1 x F3 x F6 ( $p=0,014$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F1 x F6 ( $p=0,012$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (Htis), controle e fumo são dependentes do tempo ( $p=0,023$ ) (Figura 16C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 16D), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,002$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu apenas entre C6 x F6 ( $p=0,002$ ), mas não entre C6 x FP ( $p=0,138$ ) ou F6 x FP ( $p=0,654$ ).



**Figura 16.** Avaliação da elastância do tecido pulmonar (Htis). Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou alterações na mecânica respiratória com redução do Gtis e Htis a partir do 3º mês e com efeito progressivo e dependente ao longo do tempo. Além disso, a melhora esperada no grupo FP associada a pausa de 3 meses da exposição a fumaça de cigarro não foi evidenciada.

#### *4.1.2 Avaliação histológica do parênquima pulmonar*

A avaliação do parênquima pulmonar distal através do cálculo do intercepto linear médio (**Lm**) nos grupos fumo e controle com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6, F6 e FP) de seguimento são mostrados na figura 17.

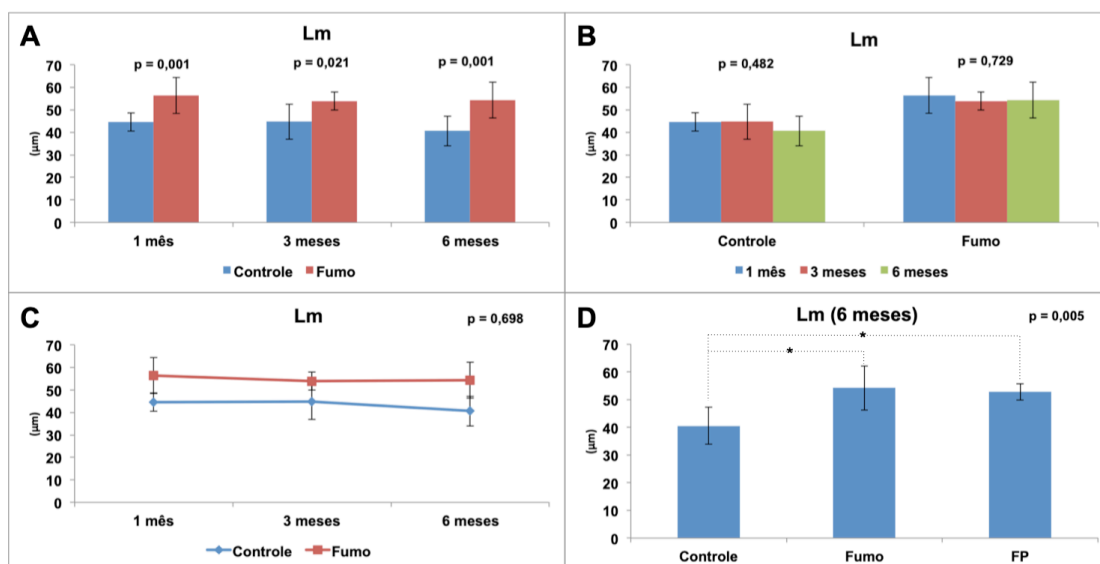
Evidenciamos um aumento estatisticamente significativa do Lm nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle em todos os tempos estudados (Figura 17A): C1 x F1 (**p=0,001**); C3 x F3 (**p=0,021**); C6 x F6 (**p=0,001**).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo (Figura 17B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,482$ ). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (Figura 17B): F1 x F3 x F6 ( $p=0,729$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (Lm), controle e fumo são independentes do tempo ( $p=0,698$ ) (Figura 17C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 17D), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**p=0,005**), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações

múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre C6 x F6 ( $p=0,006$ ) e C6 x FP ( $p=0,042$ ), mas não entre F6 x FP ( $p>0,999$ ), mostrando que a pausa de 3 meses de exposição a fumaça de cigarro ocorrida no grupo FP não trouxe nenhuma melhora identificável no parâmetro analisado (Lm), quando comparado ao grupo F6.



**Figura 17.** Avaliação histológica do intercepto linear médio (Lm). Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

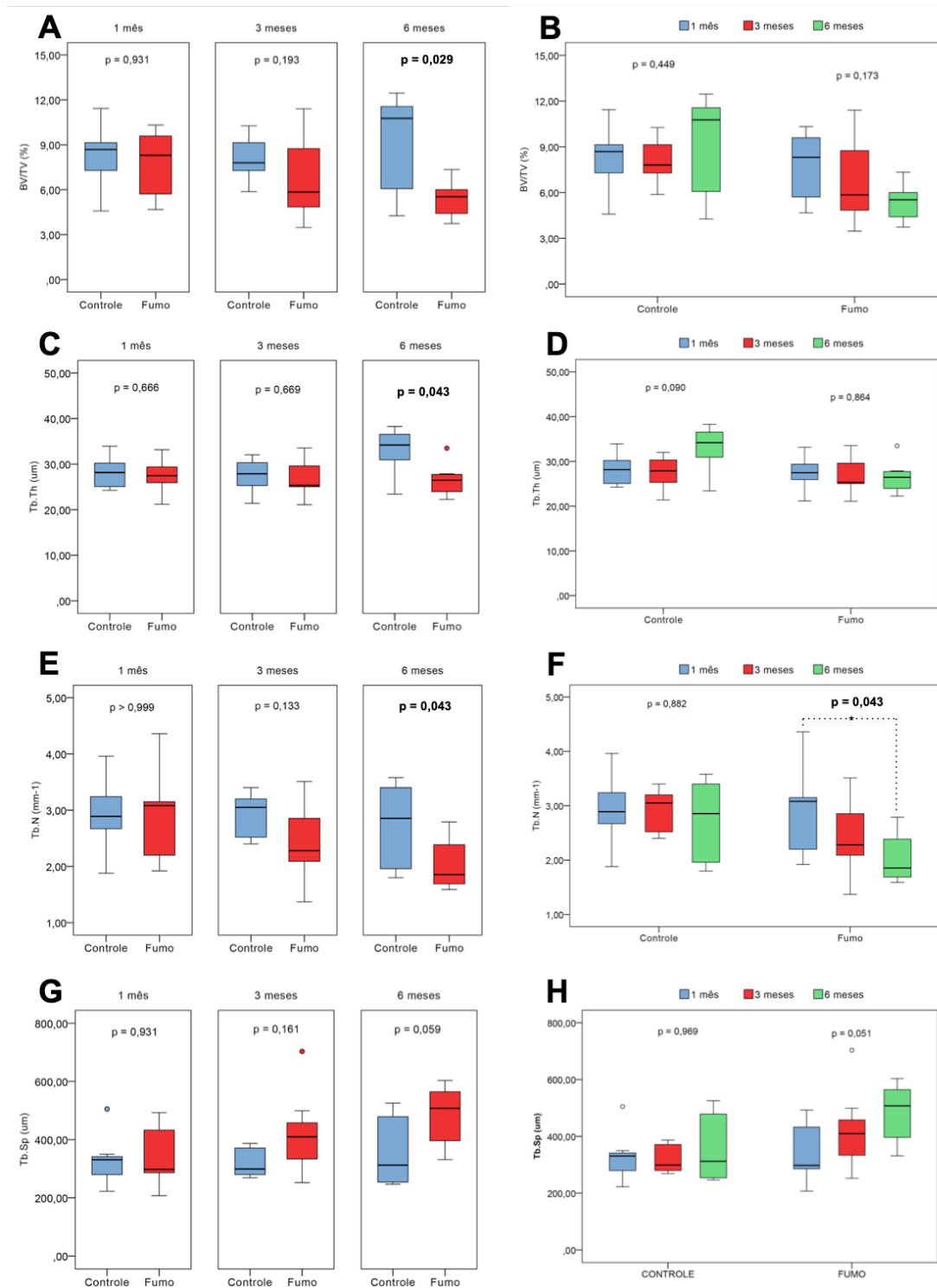
Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro acarretou alterações no parênquima pulmonar a partir do 1º mês, não havendo porém constatação de um efeito progressivo ao longo dos meses. Além disso, a melhora esperada no grupo FP associada a pausa de 3 meses da exposição a fumaça de cigarro não foi evidenciada.



#### 4.2 Avaliação celular e da matriz mineral óssea

Os parâmetros histomorfométricos de avaliação celular e da matriz mineral óssea foram analisados nos grupos controle e fumo com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6 e F6) de seguimento e incluíram **parâmetros estruturais** (BV/TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp), **parâmetros de remodelamento reabsortivos** (ES/BS e Oc.S/BS) e **parâmetros de remodelamento formativos** (O.Th, OS/BS e Ob.S/BS).

Quanto aos **parâmetros estruturais** (Figura 18 A-H), não houve diferença entre os grupos com 1 e 3 meses de seguimento (C1 x F1 e C3 x F3). Porém, evidenciamos uma redução estatisticamente significativa dos parâmetros BV/TV ( $p=0,029$ ), Tb.Th ( $p=0,043$ ) e Tb.N ( $p=0,043$ ) nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle com 6 meses de seguimento (C6 x F6). Houve ainda um visível aumento do parâmetro Tb.Sp no grupo de exposição quando comparado ao grupo controle também com 6 meses de seguimento (C6 x F6), porém estatisticamente não significativa ( $p=0,059$ ).

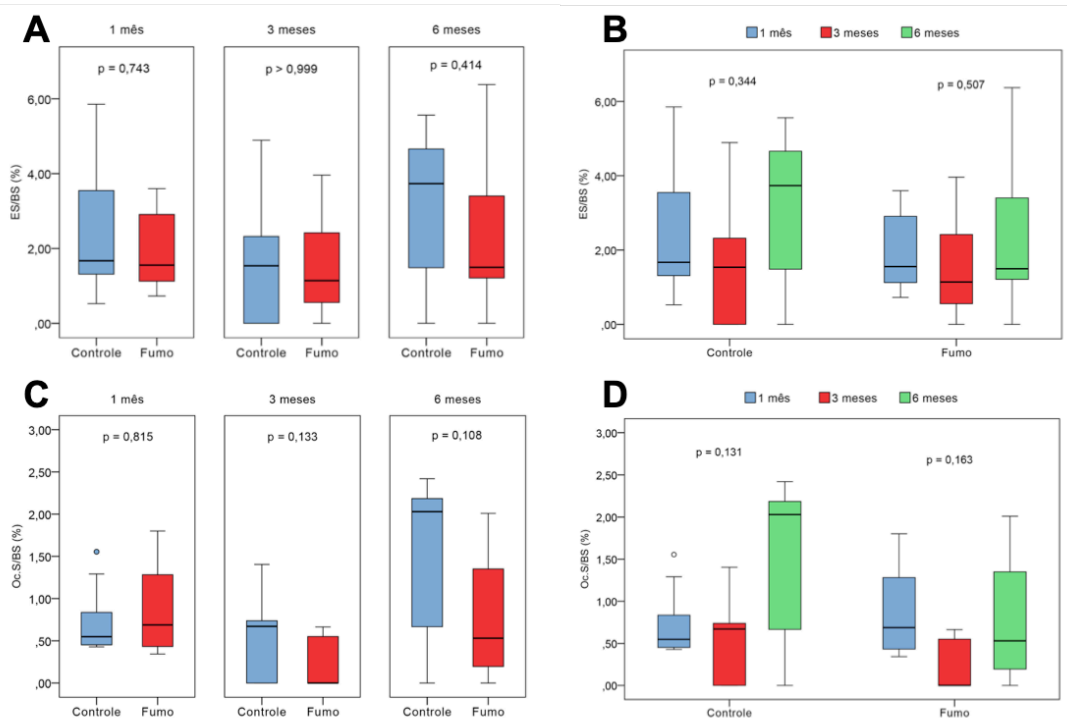


**Figura 18.** Avaliação histomorfométrica dos parâmetros estruturais. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A, C, E e G; e teste de Kruskal-Wallis em B, D, F e H. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Dunn.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo para todos os parâmetros estruturais (C1 x C3 x C6). No entanto, houve uma redução estatisticamente significativa do parâmetro Tb.N ( $p=0,043$ ) entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (F1 x F3 x F6), sendo que o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F1 x F6 ( $p=0,037$ ). Da mesma forma, notamos um visível aumento do parâmetro Tb.Sp entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (F1 x F3 x F6), porém estatisticamente não significativa ( $p=0,051$ ).

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou alterações nos parâmetros estruturais ósseos no 6<sup>o</sup> mês de seguimento, com redução do volume ósseo, da espessura trabecular e do número trabecular, demonstrando uma evidente perda óssea. Além disso, evidenciamos que esta piora foi progressiva ao longo do tempo para o número trabecular.

Com relação aos **parâmetros de remodelamento reabsortivos** (Figura 19 A-D), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (C1 x F1, C3 x F3 e C6 x F6) para nenhum dos dois parâmetros analisados (ES/BS e Oc.S/BS). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no decorrer do tempo (C1 x C3 x C6 e F1 x F3 x F6).

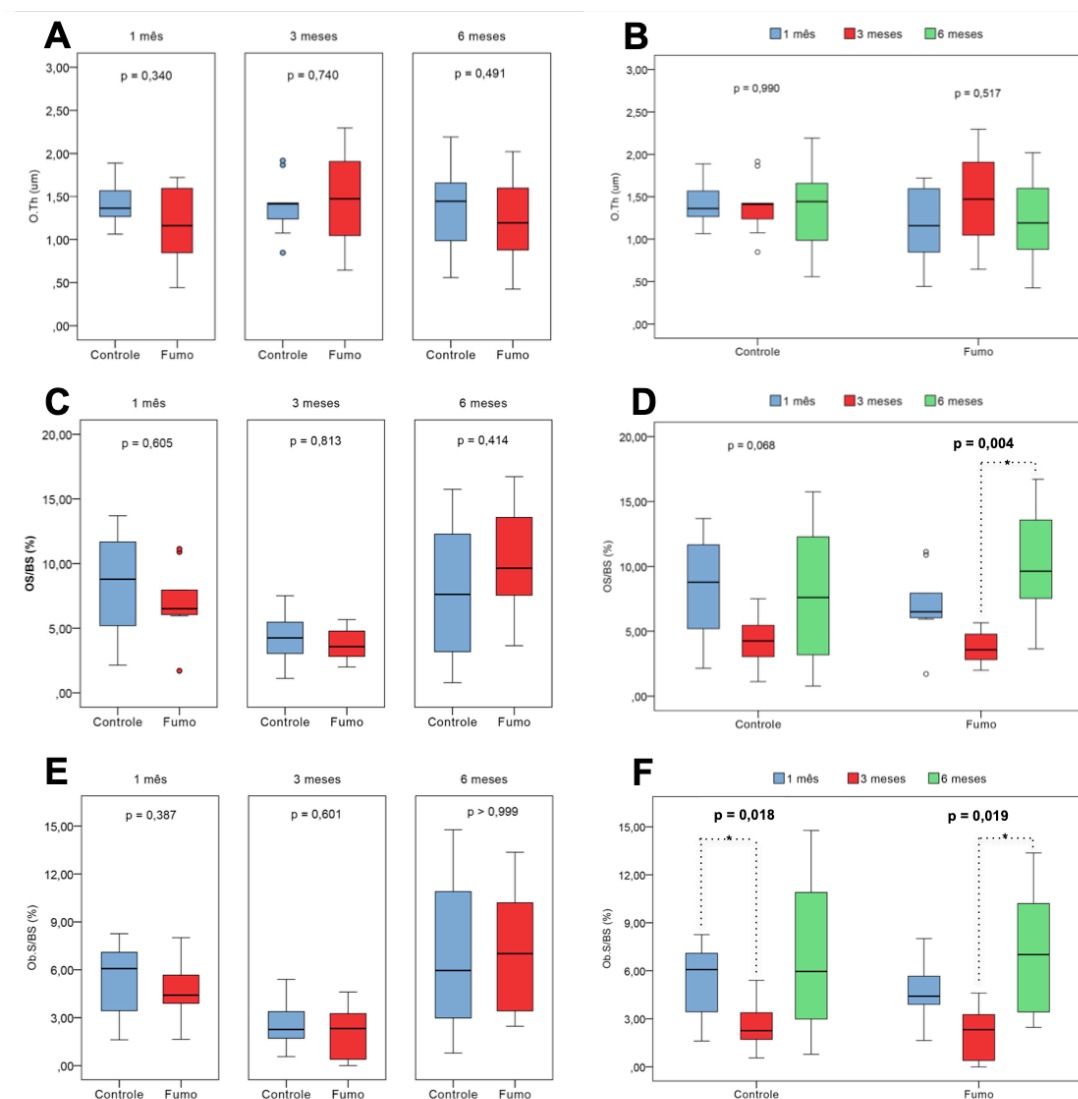


**Figura 19.** Avaliação histomorfométrica dos parâmetros de remodelamento reabsortivos. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A e C; e teste de Kruskal-Wallis em B e D. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%).

Já com relação aos **parâmetros de remodelamento formativos** (Figura 20 A-F), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (C1 x F1, C3 x F3 e C6 x F6) para nenhum dos três parâmetros analisados (O.Th, OS/BS e Ob.s/BS).

Porém, evidenciamos um aumento estatisticamente significativa do parâmetro OS/BS (**p=0,004**) entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (F1 x F3 x F6), sendo que o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F3 x F6 (**p=0,003**). Da mesma forma, notamos um aumento estatisticamente significativo do parâmetro Ob.S/BS (**p=0,019**) entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (F1 x F3 x F6), sendo que o pós-teste

de Dunn para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F3 x F6 ( $p=0,018$ ).



**Figura 20.** Avaliação histomorfométrica dos parâmetros de remodelamento formativos. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A, C, E e G; e teste de Kruskal-Wallis em B, D, F e H. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Dunn.

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou alterações nos parâmetros formativos ao longo do tempo com aumento da área de superfície osteóide e da superfície osteoblástica. Apesar do

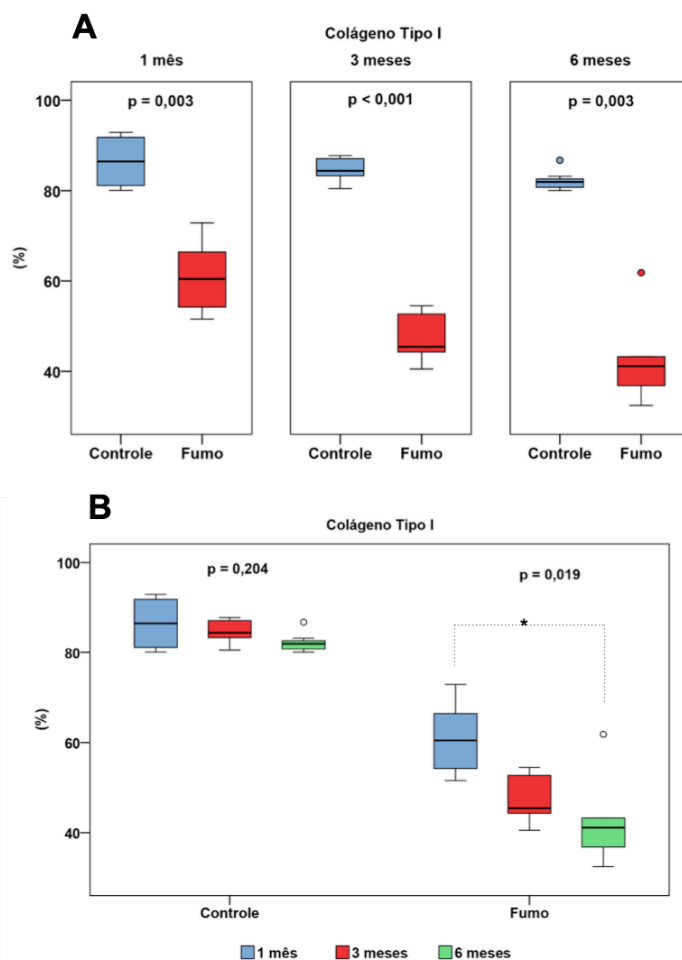
aumento dos parâmetros relacionados a formação tecidual, o desfecho final ainda se manteve pela piora estrutural óssea.

#### 4.3 Avaliação da matriz fibrilar óssea

A avaliação imunohistoquímica da composição de fibras colágenas **tipo I** e **tipo V** presentes na matriz óssea nos grupos fumo e controle com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6, F6 e FP) de seguimento são mostrados nas figuras 21 a 24.

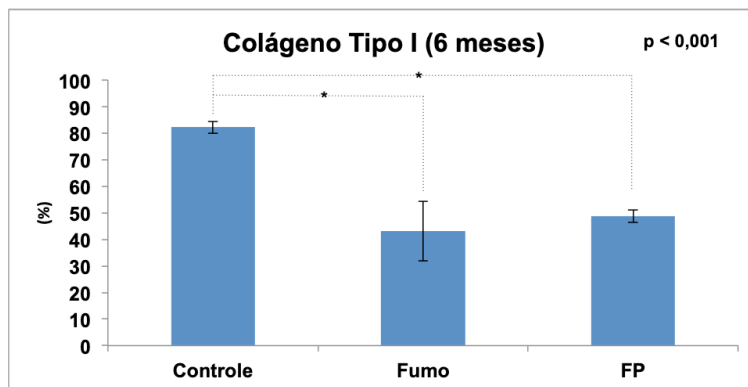
Evidenciamos uma redução de colágeno tipo I nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle em todos os tempos de seguimento (Figura 21A): C1 x F1 (**p=0,003**); C3 x F3 (**p<0,001**); C6 x F6 (**p=0,003**).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo (Figura 21B): C1 x C3 x C6 (**p=0,204**). Porém, houve redução estatisticamente significativa entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (Figura 21B): F1 x F3 x F6 (**p=0,019**), sendo que o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F1 x F6 (**p=0,023**), mas não entre F1 x F3 (**p=0,123**) ou F3 x F6 (**p>0,999**).



**Figura 21.** Avaliação imunohistoquímica de fibras colágenas tipo I. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A e teste de Kruskal-Wallis em B. Os resultados foram apresentados como a porcentagem média da área de colágeno tipo I em relação a área total da trabécula óssea. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Dunn.

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 22), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre C6 x F6 ( $p < 0,001$ ) e C6 x FP ( $p < 0,001$ ), mas não entre F6 x FP ( $p = 0,668$ ).

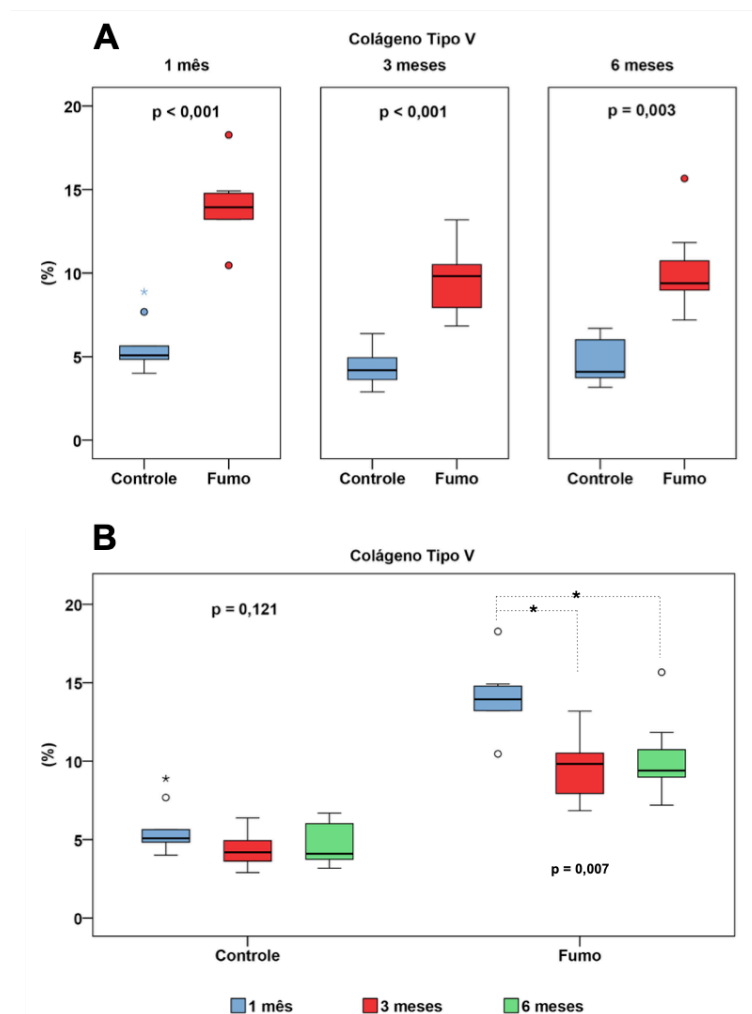


**Figura 22.** Avaliação imunohistoquímica de fibras colágenas tipo I apenas nos grupos com 6 meses de seguimento (C6, F6 e FP). Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de um fator. Os resultados foram apresentados como a porcentagem média da área de colágeno tipo I em relação a área total da trabécula óssea. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

Em relação ao colágeno tipo V, evidenciamos um aumento nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle em todos os tempos de seguimento (Figura 23A): C1 x F1 ( $p < 0,001$ ); C3 x F3 ( $p < 0,001$ ); C6 x F6 ( $p = 0,003$ ).

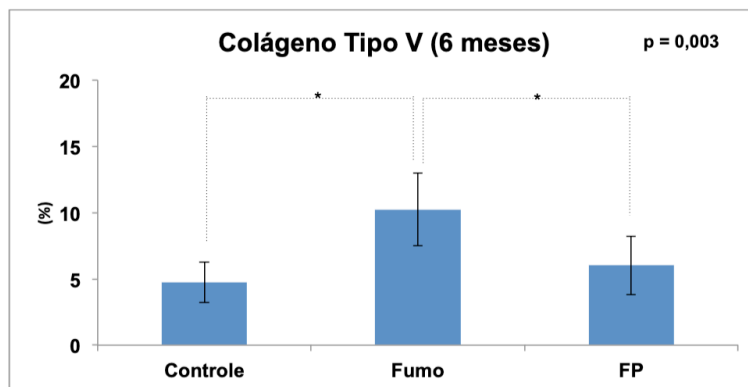
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles no decorrer do tempo (Figura 23B): C1 x C3 x C6 ( $p = 0,121$ ). Porém, houve redução estatisticamente significativa entre os grupos de exposição a fumaça de cigarro no decorrer do tempo (Figura 23B): F1 x F3 x F6 ( $p = 0,007$ ), sendo que o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre F1 x F3 ( $p = 0,010$ ) e F1 x F6 ( $p = 0,042$ ), mas não entre F3 x F6 ( $p > 0,999$ ).





**Figura 23.** Avaliação imunohistoquímica de fibras colágenas tipo V. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A e teste de Kruskal-Wallis em B. Os resultados foram apresentados como a porcentagem média da área de colágeno tipo V em relação a área total da trabécula óssea. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Dunn.

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 24), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,003$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu entre C6 x F6 ( $p=0,004$ ) e F6 x FP ( $p=0,036$ ), mas não entre C6 x FP ( $p>0,999$ ).



**Figura 24.** Avaliação imunohistoquímica de fibras colágenas tipo V apenas nos grupos com 6 meses de seguimento (C6, F6 e FP). Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de um fator. Os resultados foram apresentados como a porcentagem média da área de colágeno tipo V em relação a área total da trabécula óssea. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou alterações na composição da matriz fibrilar óssea, a partir do 1º mês, com redução de colágeno tipo I e aumento de colágeno tipo V, havendo ainda a constatação de um efeito progressivo ao longo dos meses quanto a redução de colágeno tipo I. Além disso, a melhora esperada no grupo FP associada a pausa de 3 meses da exposição a fumaça de cigarro foi evidenciada pela redução da composição de colágeno tipo V em relação ao grupo F6, porém sem melhora da composição de colágeno tipo I.

#### 4.4 Avaliação da expressão de citocinas e fatores de crescimento

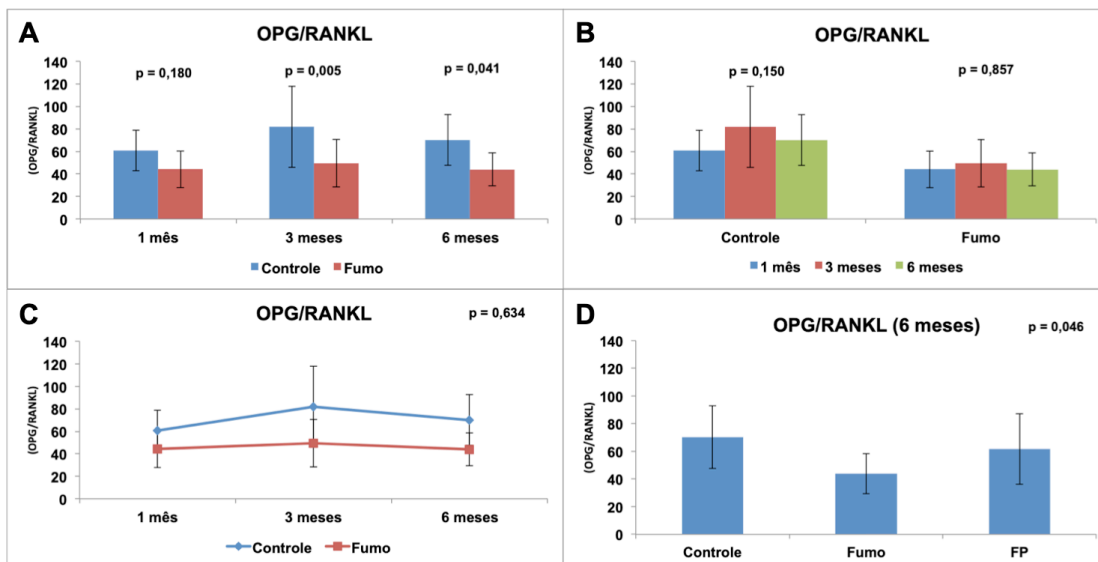
A avaliação da expressão de citocinas (OPG e RANKL, descritos pela relação **OPG/RANKL**) e fatores de crescimento (**BMP-2**) nos grupos fumo e controle com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6, F6 e FP) de seguimento são mostrados nas figuras 25 e 26, respectivamente.

A avaliação da expressão de citocinas OPG e RANKL evidenciou uma redução da relação OPG/RANKL nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos controle com 3 e 6 meses de seguimento (Figura 25A): C1 x F1 ( $p=0,180$ ); C3 x F3 ( **$p=0,005$** ); C6 x F6 ( **$p=0,041$** ).

Não houve diferença estatisticamente significativa em cada grupo experimental no decorrer do tempo (Figura 25B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,150$ ); F1 x F3 x F6 ( $p=0,857$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (OPG/RANKL), controle e fumo são independentes do tempo ( $p=0,634$ ) (Figura 25C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 25D), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( **$p=0,046$** ), porém o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas não conseguiu identificar esta diferença: C6 x F6 ( $p=0,059$ ), C6 x FP ( $p>0,999$ ) e F6 x FP ( $p=0,386$ ).



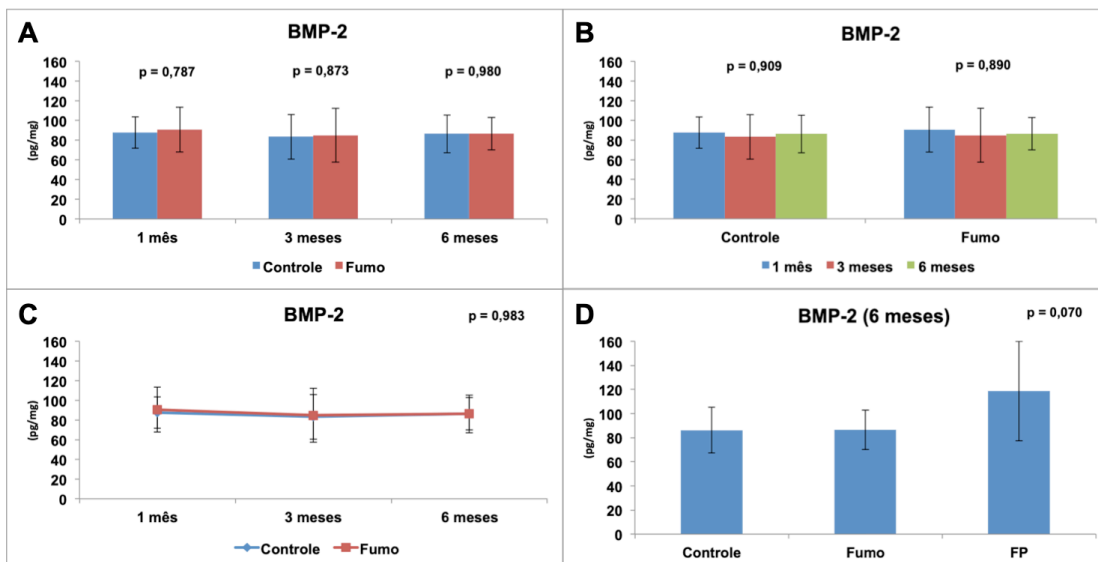
**Figura 25.** Avaliação da expressão de citocinas OPG/RANKL. Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão.

A avaliação do fator de crescimento BMP-2 não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 26A): C1 x F1 ( $p=0,787$ ); C3 x F3 ( $p=0,873$ ); C6 x F6 ( $p=0,980$ ).

Da mesma forma, não houve também diferença estatisticamente significativa em cada grupo experimental no decorrer do tempo (Figura 26B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,909$ ); F1 x F3 x F6 ( $p=0,890$ ).

Os resultados encontrados mostram ainda que, para este parâmetro (BMP-2), controle e fumo são independentes do tempo ( $p=0,983$ ) (Figura 26C).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 26D), não houve também diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,070$ ).



**Figura 26.** Avaliação do fator de crescimento BMP-2. Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA) em A, B e C; e teste ANOVA de um fator em D. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão.

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou uma redução da relação OPG/RANKL intimamente relacionada ao aumento da atividade osteoclastogênica e de reabsorção óssea a partir do 3<sup>o</sup> mês, porém não houve constatação de um efeito progressivo ao longo do tempo. Não identificamos diferença na ação da BPM-2 entre os grupos.

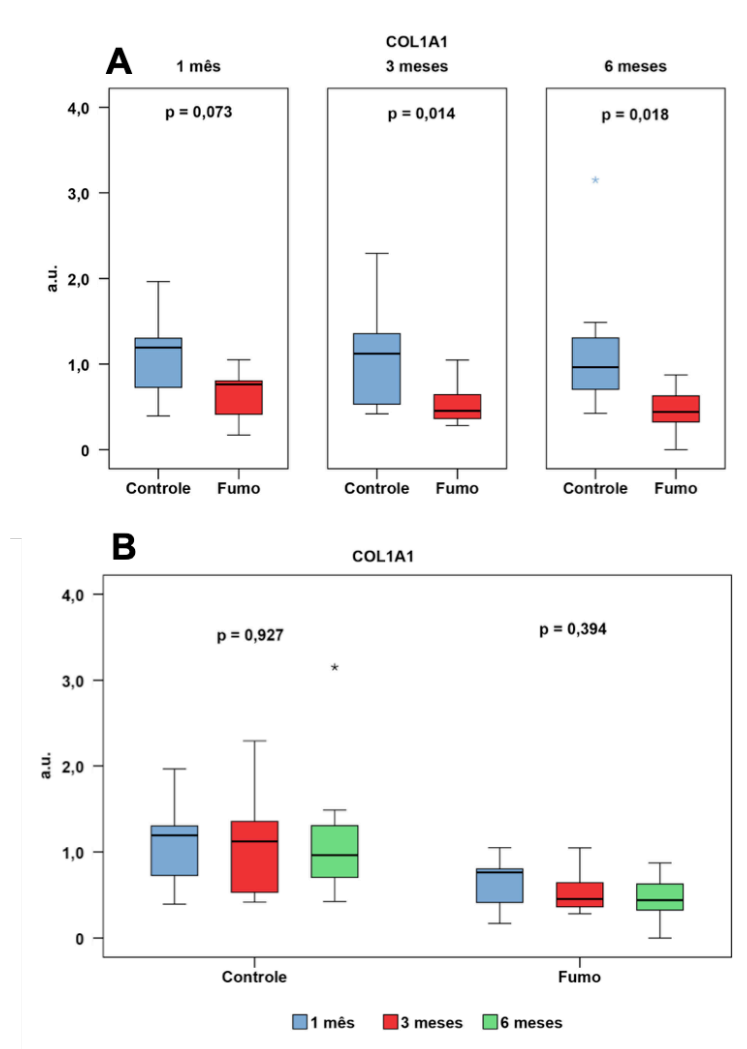
#### 4.5 Avaliação da expressão gênica de COL1A1

A avaliação da expressão gênica de **COL1A1** nos grupos fumo e controle com 1 (C1 e F1), 3 (C3 e F3) e 6 meses (C6, F6 e FP) de seguimento são mostradas nas figuras 27 e 28.

Evidenciamos uma redução dos valores de expressão gênica nos grupos de exposição a fumaça de cigarro quando comparados aos grupos

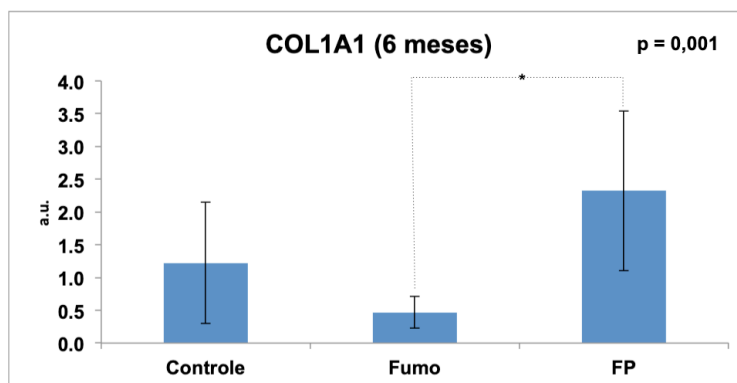
controle com 3 e 6 meses de seguimento (Figura 27A): C1 x F1 ( $p=0,073$ ); C3 x F3 ( $p=0,014$ ); C6 x F6 ( $p=0,018$ ).

Não houve também diferença estatisticamente significativa em cada grupo experimental no decorrer do tempo (Figura 27B): C1 x C3 x C6 ( $p=0,927$ ); F1 x F3 x F6 ( $p=0,394$ ).



**Figura 27.** Avaliação da expressão gênica de *COL1A1*. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney em A e teste de Kruskal-Wallis em B. Os dados são expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%).

Ao adicionar o grupo FP na análise dos grupos de 6 meses (Figura 28), notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,001$ ), sendo que o pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas evidenciou que a diferença ocorreu apenas entre F6 x FP ( $p=0,001$ ).



**Figura 28.** Avaliação da expressão gênica de *COL1A1* apenas nos grupos com 6 meses de seguimento (C6, F6 e FP). Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de um fator. Os dados são apresentados em médias e desvios-padrão. \*Diferença estatisticamente significativa presente no pós-teste de Bonferroni.

Por estes resultados notamos que a exposição a fumaça de cigarro gerou redução na expressão gênica de *COL1A1*, a partir do 3<sup>o</sup> mês. Além disso, a melhora esperada no grupo FP associada a pausa de 3 meses da exposição a fumaça de cigarro foi evidenciada pelo retomada de aumento da expressão gênica, porém sem melhora da deposição de colágeno tipo 1 vista na imunohistoquímica.

## 5. DISCUSSÃO

Já no início do desenvolvimento da DPOC, em que observamos uma piora funcional pulmonar com redução da resistência (Gtis) e elastância (Htis) além de uma alteração estrutural com destruição do parênquima pulmonar (aumento do Lm), identificamos alterações na composição da matriz fibrilar do tecido ósseo com redução de colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo V, mantidos até o final do protocolo.

As alterações de Gtis, Htis e Lm caracterizam a presença de DPOC. Apesar da destruição do parênquima pulmonar ter sido identificada a partir do 1º mês através do aumento do Lm, a redução da resistência (Gtis) e elastância (Htis) foram confirmadas apenas a partir do 3º mês. A não redução esperada de Gtis e Htis no 1º mês provavelmente ocorreu devido à presença de um edema tecidual inicial<sup>82</sup>. Além disso, sabe-se que o surgimento de alterações estruturais são geralmente mais precoces que as alterações funcionais, principalmente devido às dificuldades técnicas de avaliação da mecânica respiratória em camundongos e da necessidade de uma maior lesão estrutural para que o efeito funcional seja identificado<sup>66,83</sup>.

A alteração estrutural pulmonar associada a DPOC se manteve durante todo o protocolo assim como as alterações funcionais, sendo que estas últimas se mostraram progressivamente piores ao longo do tempo. A melhora esperada no grupo em que houve interrupção da exposição a fumaça de cigarro por 3 meses (FP) não foi evidenciada em nenhuma análise pulmonar. Infelizmente sabemos que pacientes com DPOC geralmente não apresentam melhoras dos parâmetros estruturais pulmonares mesmo após a cessação do



tabagismo, mas apenas uma redução no agravamento desses parâmetros ao longo dos anos<sup>84</sup>. De Cunto et al. (2018)<sup>85</sup> demonstraram que mesmo após 6 meses de cessação do tabagismo, camundongos C57BL6 ainda apresentavam inflamação persistente, lesão progressiva do parênquima, bem como remodelamento das vias aéreas. Este efeito está relacionado com uma ativação persistente de NFkB e uma regulação positiva da expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, KC e MIP-1). Isto não exclui a possibilidade de que talvez poderíamos ter observado alguma melhora estrutural pulmonar em camundongos caso houvésssemos acompanhado estes animais por um tempo ainda maior após a interrupção da exposição.

Uma vez demonstrada a eficácia do modelo experimental para indução da DPOC, prosseguimos com as análises do tecido ósseo. A fragilidade do tecido ósseo em pacientes tabagistas tem sido tema recorrente na literatura, seja pela perda de massa óssea<sup>86</sup>, aumento do risco de fraturas<sup>87,88</sup> aumento do risco de não consolidação ou retardo de consolidação de fraturas<sup>31,70,89</sup>, porém os mecanismos fisiológicos envolvidos neste processo são pouco conhecidos.

Recentemente Sasaki et al. (2018)<sup>35</sup>, através de um estudo experimental, associou a deterioração do tecido ósseo de camundongos submetidos à exposição de fumaça de cigarro (tempo > 20 semanas) à desorganização de fibras colágenas e desalinhamento dos cristais de apatita. Em nosso estudo, verificamos uma redução progressiva da proporção de colágeno tipo I ao longo do tempo a partir do 1º mês, bem como da expressão gênica de *COL1A1*.

Estes resultados corroboram os achados de Rothem et al. (2009)<sup>34</sup> que, em estudo com cultura de células osteoblásticas humanas (MG63), evidenciaram que a nicotina em altas concentrações apresenta efeitos tóxicos, antiproliferativos e de regulação negativa sobre a expressão gênica de colágeno tipo I. Da mesma forma, Theiss et al. (2000)<sup>90</sup>, utilizando um modelo experimental de fusão vertebral, evidenciaram redução da expressão gênica de colágeno tipo I no calo ósseo de coelhos submetidos a administração de uma solução de nicotina em um seguimento de 4 semanas.

Talvez o motivo da redução precoce do colágeno tipo I na DPOC esteja associado a uma redução em sua síntese, seja pelo efeito citotóxico direto da fumaça sobre fibroblastos e osteoblastos, células responsáveis pela produção de fibras de colágeno, ou pela redução da expressão de *COL1A1* no osso<sup>70</sup>. Além disso, sabe-se que a própria DPOC está associada ao aumento da metaloproteinase-1 da matriz pulmonar<sup>91</sup> e óssea<sup>92</sup> (MMP-1), também conhecida como colagenase intersticial, que está envolvida na quebra das fibras de colágeno constituintes da matriz extracelular. Um estudo experimental desenvolvido por Gao et al. (2012)<sup>92</sup> no tecido ósseo de camundongos já havia demonstrado a associação do aumento da expressão do mRNA para MMP-1 a uma maior reabsorção e degradação do tecido ósseo na DPOC. Da mesma forma, Katono et al. (2009)<sup>93</sup>, através de um estudo de cultura de osteoblastos, mostraram que a nicotina aumenta a expressão de MMP-1.

O efeito da cessação do tabagismo sobre as alterações do tecido ósseo foi estudado através do grupo de Fumo Provisório (FP), em que os camundongos tiveram uma pausa de 3 meses no tempo de exposição a fumaça de cigarro. No corpo humano, após a cessação, existe um rápido

declínio dos níveis de nicotina e CO; em 1 semana a maioria dos metabólitos da nicotina é eliminada e em 2 meses a viscosidade e o fluxo sanguíneo melhoram nos membros<sup>87,94</sup>. Oncken et al. (2006)<sup>95</sup> mostraram uma melhora da densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa em 1 ano de seguimento após cessação do tabagismo.

Em nosso estudo não conseguimos notar melhoras estruturais ósseas relacionadas a pausa de 3 meses de exposição, porém evidenciamos uma importante retomada de expressão gênica de *COL1A1* no grupo FP relacionada a cessação da exposição. Talvez um seguimento mais longo neste grupo seria capaz de identificar esta melhora estrutural que a avaliação da expressão gênica foi capaz de evidenciar mais precocemente.

Sabemos que moléculas de colágeno tipo V se encontram distribuídas entre as fibras de colágeno tipo I tendo função regulatória sobre a fibrilogênese, controlando o diâmetro das fibras colágenas e agindo diretamente na estrutura tecidual<sup>48,52,96</sup>. Altos níveis de colágeno tipo V são expressos em tecidos doentes, como os neoplásicos, ateroscleróticos, fibróticos e granulomatosos<sup>50</sup>. Diniz-Fernandes et al. (2018)<sup>97</sup> recentemente evidenciaram, em pacientes com diagnóstico de tendinopatia do tibial posterior, uma diminuição da deposição de colágeno tipo I e um aumento da deposição de colágeno tipo V tendíneo, associando estes achados a redução da resistência mecânica do tecido.

Evidenciamos em nosso estudo um aumento da deposição de colágeno tipo V no grupo submetido a exposição a fumaça de cigarro em todos os tempos de estudo, corroborando os dados de nosso estudo anterior<sup>70</sup>. Barbosa et al (2019)<sup>70</sup> evidenciaram, através de um estudo experimental, um aumento da expressão gênica de *COL5A1/COL5A2* e da deposição óssea de colágeno

tipo V em camundongos expostos a fumaça de cigarro e/ou submetidos a fratura tibial.

Apesar do aumento da deposição de colágeno tipo V quando comparado aos respectivos grupos controles, notamos uma redução desta deposição ao longo do tempo dentro dos grupos de intervenção. Acreditamos que esta redução possa estar associada a idade do animal, uma vez que trata-se de um estudo temporal com seguimento total de 6 meses. A alteração da arquitetura colágena associada a idade já foi descrita em outros estudos de tecido dérmico humano, tendo-se notado uma redução da expressão gênica de colágeno tipo V<sup>98</sup> e redução da produção de colágeno tipo I com a idade<sup>99</sup>. A redução global da arquitetura colágena tecidual relacionada a idade ocorre por dois mecanismos: envelhecimento celular dos fibroblastos e redução da tensão mecânica tecidual, importante para o estímulo da síntese colágena<sup>99</sup>.

A avaliação do efeito da cessação do tabagismo por meio do grupo FP para colágeno tipo V evidenciou uma redução da composição destas fibras em relação ao grupo F6. Assim, considerando que tecidos lesionados apresentam maior exposição de moléculas de colágeno tipo V que interagem com receptores de membrana de fibroblastos perpetuando a resposta inflamatória local<sup>70</sup>, é possível que, interrompido o fator desencadeante do processo inflamatório inicial (fumo), este processo deixaria de ser retroalimentado gerando, ao longo do tempo, uma consequente e benéfica redução de colágeno tipo V.

O tabagismo gera um processo inflamatório sistêmico caracterizado por um aumento acentuado na expressão de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela diferenciação e ativação de osteoclastos<sup>100</sup>. A regulação

dinâmica de citocinas osteoclastogênicas e anti-osteoclastogênicas é importante na manutenção do equilíbrio entre os osteoclastos e osteoblastos, promovendo assim a manutenção da integridade óssea<sup>101</sup>. A função reabsortiva dos osteoclastos é, em grande parte, modulada pela interação de um trio de marcadores bioquímicos: RANKL (ligante), RANK (receptor celular) e OPG (receptor de bloqueio), sendo que a função deste último é reduzir a interação RANKL-RANK<sup>56</sup>.

O aumento da relação RANKL/OPG (ou diminuição da relação OPG/RANKL) está relacionado a atividade osteoclastogênica local e reabsorção óssea em diversas patologias como periodontites<sup>56</sup>, artrite reumatóide<sup>102</sup>, mieloma múltiplo<sup>103</sup>, osteoporose<sup>104</sup> e DPOC<sup>105,106</sup>. Em nosso estudo evidenciamos uma redução da relação OPG/RANKL a partir do 3<sup>o</sup> mês, sem efeito progressivo identificado ao longo do tempo e sem benefício evidenciado pela pausa de 3 meses na exposição a fumaça de cigarro representado pelo grupo FP.

Este mesmo aumento da função reabsortiva dos osteoclastos ficou ainda indiretamente evidente nas análises histomorfométricas da matriz mineral. Embora os parâmetros propriamente reabsortivos não mostraram diferença entre os grupos, evidenciamos uma piora importante dos parâmetros estruturais ósseos com redução do volume ósseo, da espessura das trabéculas e do número de trabéculas associada a exposição a fumaça de cigarro com 6 meses de seguimento quando comparado ao grupo controle. Tais achados foram similares aos encontrados por Kulak et al. (2010)<sup>107</sup> em um estudo clínico de mulheres pós-menopausa com DPOC. Apesar de não termos conseguido captar um aumento de células osteoclasticas na superfície da trabécula, é

possível que estas células estivessem mais ativas, uma vez que houve uma evidente piora estrutural óssea associada a exposição a fumaça de cigarro.

Ainda na avaliação histomorfométrica, os parâmetros formativos mostraram um aumento da superfície osteoblástica e da superfície osteóide no grupo de exposição ao longo do tempo, o que sugere um aumento da formação óssea. Porém, como houve comprovação da piora estrutural associada a perda óssea, este aumento da formação óssea poderia ser resultado do aumento da frequência de ativação osteoclástica, fazendo com que a reabsorção óssea excedesse a formação, como já demonstrado anteriormente por Lee et al. (2002)<sup>108</sup>.

As BMP's são os principais fatores estimuladores de osteoblastos dentro da grande família dos TGF, tendo um importante papel na manutenção da massa óssea. Chassanidis et al. (2012)<sup>109</sup>, através de um estudo em perióstio humano, avaliou o efeito do tabagismo (média de 20 maços-ano) na expressão gênica de BMP's, evidenciando uma redução da expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-6 associado ao tabagismo. Da mesma forma, Theiss et al. (2000)<sup>90</sup> demonstraram que a nicotina é capaz de regular negativamente a expressão gênica de BMP-2, BMP-4 e BMP-6. No entanto, em nosso estudo, não identificamos nenhuma diferença entre os grupos quanto a expressão de BMP-2 em todos os tempos. Talvez seja requerido um tempo maior, neste modelo experimental, para detectarmos alteração destes marcadores.

## 6. CONCLUSÃO

Através de um modelo experimental eficaz de indução de DPOC demonstramos que o tabagismo foi capaz de gerar importantes alterações na matriz extracelular óssea, com redução da expressão gênica de COL1A1 e da deposição de colágeno tipo I, sendo esta última progressiva ao longo do tempo. Demonstramos ainda um aumento da deposição de colágeno tipo V possivelmente relacionado ao processo inflamatório local e a piora do padrão estrutural ósseo. A redução da relação OPG/RANKL diretamente relacionada ao aumento da atividade osteoclastogênica e consequente aumento da reabsorção óssea também foi observada. Por fim, houve confirmação da piora dos parâmetros estruturais ósseos com redução do volume ósseo, da espessura das trabéculas e do número de trabéculas associada a exposição a fumaça de cigarro com 6 meses de seguimento.

A cessação do tabagismo por 3 meses evidenciou uma ausência de benefício funcional e estrutural pulmonar; ausência de benefício estrutural óssea (colágeno tipo I), porém uma evidente retomada de expressão de COL1A1, talvez como uma tentativa de reparo tecidual, e uma redução de colágeno tipo V ósseo, associado a redução do estímulo inflamatório.

Assim, nossos resultados chamam a atenção para a influência negativa do tabagismo no metabolismo ósseo desde os primeiros momentos do desenvolvimento da DPOC e, de alguma forma, podem contribuir para uma melhor compreensão das manifestações extrapulmonares desta doença, bem como para melhorar o manejo clínico de doenças ósseas agravadas pelo tabagismo.

## 7. REFERÊNCIAS

1. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015. Geneva: World Health Organization. 2015.
2. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025. 3rd ed. Geneva: World Health Organization. 2019.
3. Goodchild M, Nargis N, Tursan d'Espaignet E. Global economic cost of smoking-attributable diseases. *Tob Control*. 2018 Jan;27(1):58-64. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2016-053305.
4. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic 2013. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship [Internet]. 2013 [citado 31 de outubro 2020]. Disponível em: [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2013/en/](http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/).
5. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, Wollum A, Sanman E, Wulf S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA*. 2014 Jan 8;311(2):183-92. doi: 10.1001/jama.2013.284692.
6. Malta DC, Vieira ML, Szwarcwald CL, Caixeta R, Brito SM, Dos Reis AA. Smoking Trends among Brazilian population - National Household Survey, 2008 and the National Health Survey, 2013. *Rev Bras Epidemiol*. 2015 Dec;18 Suppl 2:45-56. English, Portuguese. doi: 10.1590/1980-5497201500060005.
7. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Feb;8(2):613-28. doi: 10.3390/ijerph8020613.
8. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet*. 2003 Sep 13;362(9387):847-52. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14338-3.
9. Porter SE, Hanley EN Jr. The musculoskeletal effects of smoking. *J Am Acad Orthop Surg*. 2001 Jan-Feb;9(1):9-17. doi: 10.5435/00124635-200101000-00002.
10. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg*. 2006 Nov;391(6):603-13. doi: 10.1007/s00423-006-0111-z.
11. Breitling LP. Current genetics and epigenetics of smoking/tobacco-related cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul;33(7):1468-72. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300157.
12. Forey BA, Thornton AJ, Lee PN. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence relating smoking to COPD, chronic bronchitis and



emphysema. *BMC Pulm Med*. 2011 Jun 14;11:36. doi: 10.1186/1471-2466-11-36.

13. Adams CI, Keating JF, Court-Brown CM. Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury*. 2001 Jan;32(1):61-5. doi: 10.1016/s0020-1383(00)00121-2.

14. Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM; LEAP Study Group. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma*. 2005 Mar;19(3):151-7. doi: 10.1097/00005131-200503000-00001.

15. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for The Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2020 Report). [Internet]. 2020 [citado 31 de outubro 2020]. Disponível em: <https://goldcopd.org/gold-reports/>.

16. Jardim JR, Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J Bras Pneumol*. 2004;30: S1–41.

17. Ministério da Saúde (Brasil). Base de Dados de Informações de Saúde (Tabnet), DATASUS [Internet]. 2017 [citado 16 de junho de 2019]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

18. Inoue D, Watanabe R, Okazaki R. COPD and osteoporosis: links, risks, and treatment challenges. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016 Mar 29;11:637-48. doi: 10.2147/COPD.S79638.

19. Llinàs L, Peinado VI, Ramon Goñi J, Rabinovich R, Pizarro S, Rodriguez-Roisin R, Barberà JA, Bastos R. Similar gene expression profiles in smokers and patients with moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011 Feb;24(1):32-41. doi: 10.1016/j.pupt.2010.10.010.

20. Ito JT, Lourenço JD, Righetti RF, Tibério IFLC, Prado CM, Lopes FDTQS. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? *Cells*. 2019 Apr 11;8(4):342. doi: 10.3390/cells8040342.

21. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004 Aug;59(8):713-21. doi: 10.1136/thx.2003.012468.

22. Vrieze A, de Greef MH, Wijkstra PJ, Wempe JB. Low bone mineral density in COPD patients related to worse lung function, low weight and decreased fat-free mass. *Osteoporos Int*. 2007 Sep;18(9):1197-202. doi: 10.1007/s00198-007-0355-7.

23. Xiaomei W, Hang X, Lingling L, Xuejun L. Bone metabolism status and associated risk factors in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Biochem Biophys*. 2014 Sep;70(1):129-34. doi: 10.1007/s12013-014-9868-9.

24. Singh S, Loke YK. An overview of the benefits and drawbacks of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010 Aug 9;5:189-95. doi: 10.2147/copd.s6942.
25. Daniell HW. Osteoporosis of the slender smoker. Vertebral compression fractures and loss of metacarpal cortex in relation to postmenopausal cigarette smoking and lack of obesity. *Arch Intern Med*. 1976 Mar;136(3):298-304. doi: 10.1001/archinte.136.3.298.
26. Broulik PD, Jaráb J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. *Horm Metab Res*. 1993 Apr;25(4):219-21. doi: 10.1055/s-2007-1002080.
27. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, Brewer PD, Chuang AH. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1440-6. doi: 10.1902/jop.2003.74.10.1440.
28. de Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M, Gueris J, Hott M, Modrowski D, Kuntz D, Miravet L, Ryckewaert A. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Orthop Relat Res*. 1983 Oct;(179):107-15.
29. Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone JE 3rd, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med*. 2006 Jan;17(1):121-7.
30. Chen F, Osterman AL, Mahony K. Smoking and bony union after ulna-shortening osteotomy. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2001 Jun;30(6):486-9.
31. Little CP, Burston BJ, Hopkinson-Woolley J, Burge P. Failure of surgery for scaphoid non-union is associated with smoking. *J Hand Surg Br*. 2006 Jun;31(3):252-5. doi: 10.1016/j.jhsb.2005.12.010.
32. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):459-66. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.004.
33. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21. doi: 10.1097/00003086-199810001-00003.
34. Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab*. 2009;27(5):555-61. doi: 10.1007/s00774-009-0075-5.
35. Sasaki M, Chubachi S, Kameyama N, Sato M, Haraguchi M, Miyazaki M, Takahashi S, Nakano T, Kuroda Y, Betsuyaku T, Matsuo K. Effects of long-term cigarette smoke exposure on bone metabolism, structure, and quality in a mouse model of emphysema. *PLoS One*. 2018 Jan 30;13(1):e0191611. doi: 10.1371/journal.pone.0191611.

36. Pearson RG, Clement RG, Edwards KL, Scammell BE. Do smokers have greater risk of delayed and non-union after fracture, osteotomy and arthrodesis? A systematic review with meta-analysis. *BMJ Open*. 2016 Nov 14;6(11):e010303. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010303.
37. Grønkjær M, Eliassen M, Skov-Ettrup LS, Tolstrup JS, Christiansen AH, Mikkelsen SS, Becker U, Flensburg-Madsen T. Preoperative smoking status and postoperative complications: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2014 Jan;259(1):52-71. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182911913.
38. Turan A, Mascha EJ, Roberman D, Turner PL, You J, Kurz A, Sessler DI, Saager L. Smoking and perioperative outcomes. *Anesthesiology*. 2011 Apr;114(4):837-46. doi: 10.1097/ALN.0b013e318210f560.
39. Mills E, Eyawo O, Lockhart I, Kelly S, Wu P, Ebbert JO. Smoking cessation reduces postoperative complications: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2011 Feb;124(2):144-154.e8. doi: 10.1016/j.amjmed.2010.09.013.
40. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology. Text and Atlas*. 14th Ed. 2016.
41. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*. 2009 May 1;3(2):189-196. doi: 10.2174/187231309788166398.
42. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016 May;31(3):233-45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014.
43. Encyclopaedia Britannica, Inc. Bone Remodeling [Internet]. 2013 [citado 2 de junho 2019]. Disponível em: <https://www.britannica.com/media/full/topic/684133/138385>.
44. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087.
45. Court-Brown CM, Heckman JD, McQueen MM, e cols. *Rockwood and Green's Fractures in Adults*. 8th Ed. 2015.
46. Exposito JY, Valcourt U, Cluzel C, Lethias C. The fibrillar collagen family. *Int J Mol Sci*. 2010 Jan 28;11(2):407-26. doi: 10.3390/ijms11020407.
47. Soroushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, Mullen AM, Bayon Y, Pandit A, Raghunath M, Zeugolis DI. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater*. 2019 Jan;31(1):e1801651. doi: 10.1002/adma.201801651.
48. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Nov 28;55(12):1531-46. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002.

49. 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.
50. Mak KM, Png CY, Lee DJ. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016 May;299(5):613-29. doi: 10.1002/ar.23330.
51. Bächinger HP, Mizuno K, Vranka J, Boudko SP. Collagen Formation and Structure. In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd; 2010. pp. 469–530.
52. Levin LA, Nilsson SFE, Ver Hoeve J, Wu SM. Cornea and Sclera. *Adler's Physiology of the Eye*. Sunders; 2011. p. Chapter 4.
53. Saha H, Mukherjee B, Bindhani B, Ray MR. Changes in RANKL and osteoprotegerin expression after chronic exposure to indoor air pollution as a result of cooking with biomass fuel. *J Appl Toxicol*. 2016 Jul;36(7):969-76. doi: 10.1002/jat.3275.
54. Castrogiovanni P, Trovato FM, Szychlinska MA, Nsir H, Imbesi R, Musumeci G. The importance of physical activity in osteoporosis. From the molecular pathways to the clinical evidence. *Histol Histopathol*. 2016 Nov;31(11):1183-94. doi: 10.14670/HH-11-793.
55. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001 Apr;142(4):1419-26. doi: 10.1210/endo.142.4.8070.
56. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WM, Macpherson LM. 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. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01048.x.
57. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41. doi: 10.1080/08977190412331279890.
58. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34. doi: 10.1126/science.3201241.
59. Dimitriou R, Giannoudis PV. Discovery and development of BMPs. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S28-33. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.031.
60. Even J, Eskander M, Kang J. Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012 Sep;20(9):547-52. doi: 10.5435/JAAOS-20-09-547.
61. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016 Apr 26;4:16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9.

62. Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, Sany J, Jorgensen C. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(1):74-85. doi: 10.1634/stemcells.22-1-74.
63. Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L612-31. doi: 10.1152/ajplung.00390.2007.
64. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Feb;126(4):253-65. doi: 10.1042/CS20130182.
65. Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 1):223S-7S. doi: 10.1378/chest.117.5\_suppl\_1.223s.
66. Ito JT, Cervilha DAB, Lourenço JD, Gonçalves NG, Volpini RA, Caldini EG, Landman G, Lin CJ, Velosa APP, Teodoro WPR, Tibério IFLC, Mauad T, Martins MA, Macchione M, Lopes FDTQS. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model. *PLoS One*. 2019 Jan 10;14(1):e0209351. doi: 10.1371/journal.pone.0209351.
67. Cervilha DAB, Ito JT, Lourenço JD, Olivo CR, Saraiva-Romanholo BM, Volpini RA, Oliveira-Junior MC, Mauad T, Martins MA, Tibério IFLC, Vieira RP, Lopes FDTQS. The Th17/Treg Cytokine Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation in an Animal Model of Cigarette Smoke Exposure and Lipopolysaccharide Challenge Association. *Sci Rep*. 2019 Feb 13;9(1):1921. doi: 10.1038/s41598-019-38600-z.
68. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jul;295(1):L1-15. doi: 10.1152/ajplung.90200.2008.
69. Hansen MJ, Chen H, Jones JE, Langenbach SY, Vlahos R, Gualano RC, Morris MJ, Anderson GP. The lung inflammation and skeletal muscle wasting induced by subchronic cigarette smoke exposure are not altered by a high-fat diet in mice. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e80471. doi: 10.1371/journal.pone.0080471.
70. Barbosa AP, Lourenço JD, Junqueira JJM, Larissa Emidio de França S, Martins JS, Oliveira Junior MC, Begalli I, Velosa APP, Olivo CR, Bastos TB, Jorgetti V, Rodolfo de Paula V, Teodoro WR, Lopes FDTQS. The deleterious effects of smoking in bone mineralization and fibrillar matrix composition. *Life Sci*. 2020 Jan 15;241:117132. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117132.
71. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals*. 8th ed. 500 Fifth Street, NW, Lockbox 285, Washington, DC 20055: The National Academies Press; 2011.

72. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012 Feb;39(2):254-64. doi: 10.1183/09031936.00003411.
73. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Jan;72(1):168-78. doi: 10.1152/jappl.1992.72.1.168.
74. Gomes RF, Shen X, Ramchandani R, Tepper RS, Bates JH. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Sep;89(3):908-16. doi: 10.1152/jappl.2000.89.3.908.
75. Lopes FDTQS, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, Santos AB, Garippo A, Martins MA, Mauad T. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013 Feb;28(2):269-76. doi: 10.14670/HH-28.269.
76. Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JH, Hoidal JR, Cosio MG. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Dec 15;166(12 Pt 1):1596-603. doi: 10.1164/rccm.2202001.
77. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER; ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):394-418. doi: 10.1164/rccm.200809-1522ST.
78. Difford J. A simplified method for the preparation of methyl methacrylate embedding medium for undecalcified bone. *Med Lab Technol*. 1974 Jan;31(1):79-81.
79. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013 Jan;28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
80. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004;200(10):681-91. doi: 10.1016/j.prp.2004.05.007.
81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

82. Toumpanakis D, Kastis GA, Zacharatos P, Sigala I, Michailidou T, Kouvela M, Glynos C, Divangahi M, Roussos C, Theocharis SE, Vassilakopoulos T. Inspiratory resistive breathing induces acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Nov 1;182(9):1129-36. doi: 10.1164/rccm.201001-0116OC.
83. Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto Tda S, Moriya HT, Mauad T, Martins Mde A, Lopes FD. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1797-803. doi: 10.1590/s1807-59322011001000020.
84. Willemse BW, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*. 2004 Mar;23(3):464-76. doi: 10.1183/09031936.04.00012704.
85. De Cunto G, Bartalesi B, Cavarra E, Balzano E, Lungarella G, Lucattelli M. Ongoing Lung Inflammation and Disease Progression in Mice after Smoking Cessation: Beneficial Effects of Formyl-Peptide Receptor Blockade. *Am J Pathol*. 2018 Oct;188(10):2195-2206. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.06.010.
86. Szulc P, Garnero P, Claustrat B, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD. Increased bone resorption in moderate smokers with low body weight: the Minos study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Feb;87(2):666-74. doi: 10.1210/jcem.87.2.8232.
87. Hernigou J, Schuind F. Tobacco and bone fractures: A review of the facts and issues that every orthopaedic surgeon should know. *Bone Joint Res*. 2019 Jul 5;8(6):255-265. doi: 10.1302/2046-3758.86.BJR-2018-0344.R1.
88. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005 Feb;16(2):155-62. doi: 10.1007/s00198-004-1640-3.
89. Hernigou J, Schuind F. Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *Int Orthop*. 2013 May;37(5):883-7. doi: 10.1007/s00264-013-1809-5.
90. Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000 Oct 15;25(20):2588-94. doi: 10.1097/00007632-200010150-00008.
91. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2003;54:113-29. doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152209.
92. Gao Z, Li FS, Wang J. [The expressions of TNF-alpha and MMP-9 in serum and MMP-1 mRNA in the bone tissue in chronic obstructive pulmonary disease patients of cold dryness syndrome in northwest China]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2012 Aug;32(8):1103-6. Chinese.

93. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol.* 2009 Feb;54(2):146-55. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.09.017.
94. No authors listed. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Tobacco control: reversal of risk after quitting smoking. IARC handbooks of cancer prevention, 2007. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Tobacco-Control-Reversal-Of-Risk-After-Quitting-Smoking-2007>.
95. Oncken C, Prestwood K, Kleppinger A, Wang Y, Cooney J, Raisz L. Impact of smoking cessation on bone mineral density in postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt).* 2006 Dec;15(10):1141-50. doi: 10.1089/jwh.2006.15.1141.
96. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 2001 Apr;32(3):223-37. doi: 10.1016/s0968-4328(00)00043-3.
97. Diniz-Fernandes T, Godoy-Santos AL, Santos MC, Pontin P, Pereira CAA, Jardim YJ, Velosa APP, Maffulli N, Teodoro WR, Capelozzi VL. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy. *Histol Histopathol.* 2018 Sep;33(9):929-936. doi: 10.14670/HH-11-982.
98. Jarrold BB, Osborne R, Tamura M, Chan W, Bascom CC, Isfort RJ, Alora-Palli MB. Collagen type V expression and localization in aging skin. *JAAD.* 2017; 76 (6), Suppl1: AB75. Doi: 10.1016/j.jaad.2017.04.308.
99. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 2006 Jun;168(6):1861-8. doi: 10.2353/ajpath.2006.051302.
100. De Cunto G, Lunghi B, Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Ulivieri C, Lungarella G, Lucattelli M. Severe Reduction in Number and Function of Peripheral T Cells Does Not Afford Protection toward Emphysema and Bronchial Remodeling Induced in Mice by Cigarette Smoke. *Am J Pathol.* 2016 Jul;186(7):1814-1824. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.03.002.
101. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw.* 2018 Feb 7;18(1):e8. doi: 10.4110/in.2018.18.e8.
102. Xu S, Wang Y, Lu J, Xu J. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2012 Nov;32(11):3397-403. doi: 10.1007/s00296-011-2175-5.



103. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, Viniou N, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):1064-9. doi: 10.1182/blood-2003-02-0380.
104. Zhang PF, Pan L, Luo ZY, Zhao HJ, Cai SX. Interrelationship of circulating matrix metalloproteinase-9, TNF- $\alpha$ , and OPG/RANK/RANKL systems in COPD patients with osteoporosis. *COPD*. 2013 Dec;10(6):650-6. doi: 10.3109/15412555.2013.813928.
105. Bai P, Sun Y, Jin J, Hou J, Li R, Zhang Q, Wang Y. Disturbance of the OPG/RANK/RANKL pathway and systemic inflammation in COPD patients with emphysema and osteoporosis. *Respir Res*. 2011 Dec 16;12(1):157. doi: 10.1186/1465-9921-12-157.
106. Ugay L, Kochetkova E, Nevzorova V, Maistrovskaia Y. Role of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand in Bone Loss Related to Advanced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Jul 20;129(14):1696-703. doi: 10.4103/0366-6999.185857.
107. Kulak CA, Borba VC, Jorgetti V, Dos Reis LM, Liu XS, Kimmel DB, Kulak J Jr, Rabelo LM, Zhou H, Guo XE, Bilezikian JP, Boguszewski CL, Dempster DW. Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *J Bone Miner Res*. 2010 Sep;25(9):1931-40. doi: 10.1002/jbmr.88.
108. Lee LL, Lee JS, Waldman SD, Casper RF, Grynpas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone*. 2002 Jun;30(6):917-23. doi: 10.1016/s8756-3282(02)00726-3.
109. Chassanidis CG, Malizos KN, Varitimidis S, Samara S, Koromila T, Kollia P, Dailiana Z. Smoking affects mRNA expression of bone morphogenetic proteins in human periosteum. *J Bone Joint Surg Br*. 2012 Oct;94(10):1427-32. doi: 10.1302/0301-620X.94B10.28405.

## APÊNDICE



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TABAGISMO NO METABOLISMO ÓSSEO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA**”, registrada com o nº **937/2017**, sob a responsabilidade de **FERNANDA DEGOBBI TENORIO QUIRINO DOS SANTOS LOPES** e **JADER JOEL MACHADO JUNQUEIRA**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11.10.2017

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-11-2017 Término: 01-11-2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	<b>60</b>
Peso/Idade	6-8 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 11 de Outubro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**



## Decreased Bone Type I Collagen in the Early Stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Jader Joel Machado Junqueira , Juliana Dias Lourenço , Kaique Rodrigues da Silva , Daniela Aparecida de Brito Cervilha , Lizandre Keren Ramos da Silveira , Aristides Tadeu Correia , Larissa Emidio de França Silva , Walcy Rosolia Teodoro , Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério , Alexandre Póvoa Barbosa & Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

To cite this article: Jader Joel Machado Junqueira , Juliana Dias Lourenço , Kaique Rodrigues da Silva , Daniela Aparecida de Brito Cervilha , Lizandre Keren Ramos da Silveira , Aristides Tadeu Correia , Larissa Emidio de França Silva , Walcy Rosolia Teodoro , Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério , Alexandre Póvoa Barbosa & Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes (2020): Decreased Bone Type I Collagen in the Early Stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, DOI: [10.1080/15412555.2020.1808605](https://doi.org/10.1080/15412555.2020.1808605)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15412555.2020.1808605>



Published online: 19 Aug 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)




View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Decreased Bone Type I Collagen in the Early Stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Jader Joel Machado Junqueira<sup>a</sup> , Juliana Dias Lourenço<sup>a</sup>, Kaique Rodrigues da Silva<sup>a</sup>, Daniela Aparecida de Brito Cervilha<sup>a</sup>, Lizandre Keren Ramos da Silveira<sup>b</sup>, Aristides Tadeu Correia<sup>a</sup>, Larissa Emidio de França Silva<sup>a</sup>, Walcy Rosolia Teodoro<sup>b</sup>, Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério<sup>a</sup>, Alexandre Póvoa Barbosa<sup>a</sup>, and Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Medicine, Laboratory of Experimental Therapeutics (LIM-20), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; <sup>b</sup>Rheumatology Division (LIM-17), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

### ABSTRACT

Smoking is the main risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and is known to have deleterious effects on bone metabolism. However, the effects on bone collagen matrix during the development of COPD are unclear. The aim of this study was to evaluate the temporal effect of cigarette smoke exposure on bone type I collagen during COPD development in a cigarette smoke-induced model. C57BL/6 mice were allocated to three groups: control (C), animals exposed to filtered air for 1, 3 and 6 months; cigarette smoke (S), animals exposed to cigarette smoke for 1, 3 and 6 months; provisional smoking (PS), animals exposed to cigarette smoke for 3 months, followed by another 3 months of filtered air exposure. Evaluation of the respiratory mechanics and alveolar enlargement were performed. Femoral and tibial extraction was also performed to evaluate the type I collagen by immunofluorescence and *COL1A1* gene expression. Exposure to cigarette smoke led to an alveolar enlargement and progressive reduction in lung tissue resistance and elastance, progressive reduction of type I collagen and reduction in *COL1A1* gene expression. Although we did not observe any improvement in the functional and histological parameters in the provisional smoking group, we detected an increase in *COL1A1* gene expression. A worsening in bone collagen matrix is part of the initial physiopathological events during COPD development and the smoking cessation induced an evident recovery of *COL1A1* expression, possibly to attempt at tissue repair.

### ARTICLE HISTORY

Received 13 July 2020  
Accepted 6 August 2020

### KEYWORDS

Smoking; COPD; bone remodeling; bone matrix; collagen

### Introduction

Smoking remains the global leader in causes of preventable deaths, accounting for approximately 6 million deaths/year and over 1.5 trillion dollars/year of damage to the world economy [1]. Cigarette smoke is composed of approximately 5,000 toxic and carcinogenic chemicals and has two phases: volatile (gaseous) and particulate [2]. The risks associated with smoking depend on factors such as age of onset, number of cigarettes per day, cigarette characteristics (filter type, nicotine and tar rate) and behavior (degree of inhalation) [3].

The main causes of mortality associated with smoking are neoplasms (mainly lung) [4], cardiovascular diseases [5] and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [6].

COPD is one of the leading causes of mortality and morbidity worldwide, with important social and economic impacts. This condition occurs as a result of a complex interaction between long-term cumulative exposure to harmful gases and particles and a number of other well-known factors such as genetics, airway hyperresponsiveness, and poor lung development in childhood [7]. COPD is characterized by

persistent and often progressive airflow limitation associated with an exacerbated chronic inflammatory response of the airways and lungs associated with smoking [8].

Inflammatory and structural cells release cytokines, growth factors and proteases in the pulmonary site, causing destruction of the alveolar walls (emphysema) and structural remodeling, resulting in fibrosis, mainly in small airways [9]. The main clinical manifestations of COPD are chronic and progressive dyspnea, chronic cough and bronchial hypersecretion, formerly described in terms of “chronic bronchitis” and “pulmonary emphysema” [7].

COPD is also known to have several extrapulmonary manifestations, including a reduction in bone mineral density, body mass index and muscle strength. These manifestations are closely linked to increased systemic inflammation and oxidative stress generated by smoking, the main agent in the pathophysiology of this disease [10,11].

In the 1970s, the association between smoking and bone fracture in postmenopausal women was described [12]. Experimental and *in vitro* studies have also shown that smoking can affect bone remodeling by inducing a reduction in bone

mineral density [13,14], stimulating osteoclastogenesis, inhibiting osteoblastogenesis [15] and altering bone fibrillar matrix [16]. Smoking has also shown deleterious effects, promoting delayed healing or even nonhealing of fractures [17,18].

In patients diagnosed with COPD, a reduction in bone mineral density (osteopenia/osteoporosis) and a higher prevalence of vertebral fractures have also been identified [11]. Vertebral fracture due to bone insufficiency in a patient with COPD generates morbidity not only related to the fracture itself but also to the impairment of pulmonary function due to the reduction of the thoracic cavity volume.

Studies in an experimental model of COPD have shown that long-term COPD can impair the normal growth of the lumbar vertebrae, as well as deteriorate bone quality by disorientation of collagen fibers [19]. Similarly, in an elastase-induced model, some authors showed that the lumbar vertebrae and femurs/tibiae exhibited trabecular bone loss and impaired osteogenic activity at the 24-week follow-up [20].

Collagens are a heterogeneous family of extracellular matrix glycoproteins and are involved in the formation of macromolecular networks with not only supportive functions but also effects on cell differentiation, adhesion, migration and proliferation [21].

Type I collagen makes up 90% of bone organic mass and is the major collagen in tissues such as tendons, skin, ligaments, cornea and interstitial connective tissues. This molecule is responsible for bone biomechanical properties of tensile strength, compression and torsion, especially after calcification [22]. Its triple helix is composed of two identical alpha-1 and one alpha-2 [ $\alpha 1(I) 2 \alpha 2(I)$ ] chains synthesized from the *COL1A1* and *COL1A2* genes [23].

Considering the importance of type I collagen in bone tissue integrity to support mechanical forces and the increase in bone fragility in smokers and COPD patients [19,20], this study aims to evaluate the temporal effect of cigarette smoke exposure and smoking cessation on the bone collagen matrix during COPD development in a cigarette smoke-induced model. To our knowledge, no previous study has focused on the long-term temporal effects of cigarette smoke on changes in type I collagen fibers of the bone matrix.

## Methods

### Experimental procedures

This experimental study required sixty-six C57BL/6 young adult male mice (6–8 weeks), with an average weight of 26 g,

provided by the Central Animal Facility of the University of São Paulo School of Medicine. All animals received care in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [24]. This study was approved by the Review Board for human and animal studies from the University of São Paulo School of Medicine (Project Number 937/2017).

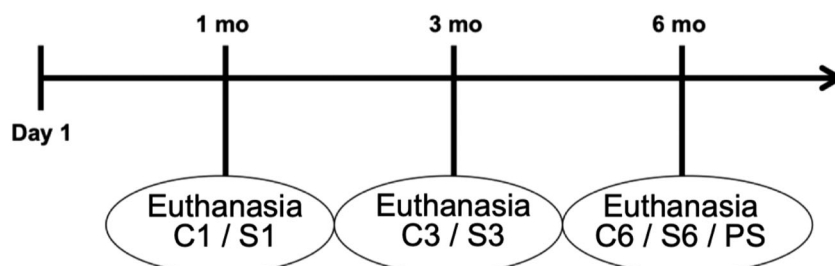
The animals were housed in specific polypropylene boxes for mice (approximately 5 animals/box) with the following measures (30 × 20 × 13 cm) at the Experimental Therapeutics Laboratory. All animals had unrestricted access to water and feed (Nuvilab® CR-1 Irradiada, Quimtia S.A., Colombo/PR, Brazil) containing 1.4% calcium and 0.8% phosphorus. The animals were also maintained in a 12-hour light-dark cycle, with light from 7 am to 7 pm, at an ambient temperature of 20 ± 2 °C and were cared for a trained and qualified professional. An acclimatization period of at least 3 weeks was established.

### Experimental groups

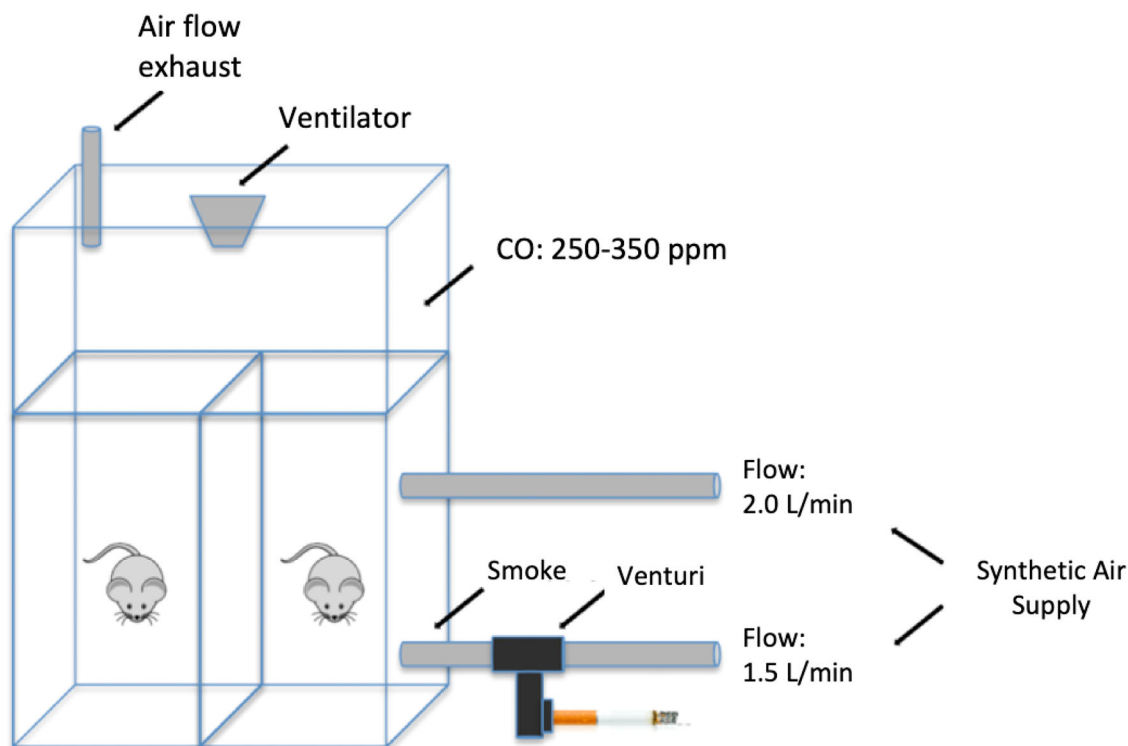
The animals were randomly assigned to three groups: control (C), composed of 30 animals exposed to filtered air for 1 month (C1 = 10), 3 months (C3 = 10) and 6 months (C6 = 10) until euthanasia; smoke (S), composed of 30 animals exposed to cigarette smoke for 1 month (S1 = 10), 3 months (S3 = 10) and 6 months (S6 = 10) until euthanasia; and provisional smoke (PS), composed of 6 animals exposed to cigarette smoke for 3 months, followed by another 3 months of exposure to filtered air (Figure 1).

### Exposure to cigarette smoke to induce COPD

Exposure to cigarette smoke was performed according to a protocol previously described by Toledo et al. [25], which involves using a 28 L inhalation chamber containing two inlet points for air and smoke supplies, one outlet point and one aerator to increase the air/smoke mixture. The synthetic air, connected to one of the inlets, has a flow rate of 2 L/min. The synthetic air connected to the second inlet has a flow rate of 1.5 L/min and passes through a Venturi system connected to a lit cigarette that suctions the smoke into the chamber (Figure 2). The levels of carbon monoxide (CO) maintained inside the chamber ranged from 250 to 350 ppm. The animals were exposed to 10 commercially filtered cigarettes per exposure (0.8 mg nicotine, 10 mg tar and 10 mg



**Figure 1.** Timeline of the study. mo: month; C1: control group 1 month (10 animals); S1: smoke group 1 month (10 animals); C3: control group 3 months (10 animals); S3: smoke group 3 months (10 animals); C6: control group 6 months (10 animals); S6: smoke group 6 months (10 animals); PS: provisional smoking group (6 animals).



**Figure 2.** Cigarette smoke exposure chamber.

CO). This form of exposure maintains an average concentration of carboxyhemoglobin at  $10 \pm 1.3\%$  and a total concentration of particulate matter at approximately  $354.8 \pm 50.3 \mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{day}$ . Animals were exposed twice a day for 30 min per exposure, 5 days per week over 1, 3 and 6 months depending on the exposure group (S1 = 1 month, S3 = 3 months, S6 = 6 months). Control animals C1, C3 and C6 received only filtered air for 1, 3 and 6 months.

During the exposure to cigarette smoke, we had some animal losses related to the time of exposure and prolonged follow-up. Losses occurred in groups C6 (3 animals), S1 (1 animal), S3 (2 animals) and PS (2 animals).

### Evaluation of respiratory mechanics

To evaluate the respiratory mechanics, we intraperitoneally anesthetized the animals with thiopental (50 mg/kg), and they were tracheostomized with the installation of a 20 G vascular catheter connected to a respirator for small animals (FlexiVent, SCIREQ, Canada).

To avoid respiratory efforts and interference in the analyses, we administered pancuronium (0.2 mg/kg), a nondepolarizing neuromuscular blocker, to the animals, followed by mechanical ventilation at a tidal volume of 10 mL/kg and respiratory rate of 120 cycles/minute.

To calculate the system impedance (ZL), we used the constant phase model described by Hantos et al. [26], in which  $R_{aw}$  and  $I_{aw}$  represent the airway resistance and the airway inertance (without interference from lung tissues);  $j$  is an imaginary unit;  $\omega$  is the angular frequency;  $G_{tis}$  assesses pulmonary tissue resistance; and  $H_{tis}$  evaluates lung tissue elastance (accumulated energy).

Thus,  $ZL = R_{aw} + j \cdot \omega \cdot I_{aw} + (G_{tis} - j \cdot H_{tis})/\omega^\alpha$  and  $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctg(H_{tis}/G_{tis})$ .

The values of  $H_{tis}$  and  $G_{tis}$  were multiplied by the body weight of each animal to obtain normalized values. This normalization has been described in previous studies and is performed due to the weight variability caused by exposure to cigarette smoke over the months [25,27,28]. Data of body weight of each group are shown in Table 1.

### Histological evaluation of alveolar enlargement

After assessment of the respiratory mechanics, the animals were euthanized at the times corresponding to each group (1, 3 or 6 months). Euthanasia was performed by exsanguination through a section of the inferior vena cava.

The lungs were removed and fixed in 10% formaldehyde through tracheal catheterization and infusion at constant pressure (20 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ) for 24 h [29]. The fixed lungs were later included in paraffin cross-sections with a thickness of  $4 \mu\text{m}$  and underwent histological preparation with hematoxylin and eosin staining (H&E).

The microscopic quantification of alveolar enlargement was carried out through the evaluation of the mean linear intercept (Lm), an index that is equivalent to the mean diameter of the distal air spaces [30].

Conventional morphometric analysis was performed using a standard optical microscope (Olympus U-DO, Olympus Co., Japan) using the principle of counting points in tissue structures described by Hsia et al. (2010) [31]. Through a reticule with 100 points and 50 line segments, in a 200x magnification and analysis of 15 random fields, the number of times the lines of the reticulum cross (intercept)



**Table 1.** Data of body weight of each group are shown as mean and standard deviation.

Group	Body Weight (grams; mean $\pm$ standard deviation)
C1	24.1 $\pm$ 0.7
C3	25.2 $\pm$ 2.6
C6	31.3 $\pm$ 2.4
S1	21.7 $\pm$ 1.0
S3	26.4 $\pm$ 2.1
S6	28.1 $\pm$ 2.0
PS	30.0 $\pm$ 3.8

C: control groups (C1, 1 month; C3, 3 months; C6, 6 months); S: smoke groups (S1, 1 month; S3, 3 months; S6, 6 months); PS: provisional smoke.

the walls of the alveoli was quantified. Bronchi and vascular structures were eliminated from the analysis.

The Lm index ( $\mu\text{m}$ ) was calculated by the ratio of the sum of all segments of the reticulum ( $L_{\text{total}} = 2500 \mu\text{m}$ ) by the average number of times that the lines of the reticulum intersect the walls of the alveoli (Nm) in the most peripheral regions of the parenchyma and around the airways.

Thus,  $Lm = L_{\text{total}}/Nm$  and  $Lm = 2500 \mu\text{m}/Nm$ .

After euthanasia at the specified times (1, 3 or 6 months) and lung extraction, all animals underwent femoral and tibial bone extraction procedures (Figure 3).

### Immunofluorescence and morphometry

To perform immunostaining for type I collagen, the tibiae of each animal were extracted and cleaned from adjacent tissues. A  $4 \mu\text{m}$  thick slices were mounted on slides previously treated with 3-aminopropyltriethoxy silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dewaxed in xylene and hydrated in graded ethanol. For negative controls, the sections were incubated with fetal bovine serum instead of primary antibody. The same treatment was carried out for immunofluorescence detection.

For exposure and recovery of antigenic sites, the samples were submitted to digestion with citrate buffer, pH = 6.0 (Diagnostic BioSystems, CA, USA), for 10 min at  $95^\circ\text{C}$ . For the immunodetection of collagen type I, nonspecific sites were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature. Then, the samples were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ , in a humidified atmosphere, with rabbit polyclonal antibodies type I collagen (1:50, Rockland Immunochemicals, Gilbertville, PA, USA) diluted in PBS solution plus BSA 1%. The samples were washed in PBS with 0.05% Tween 20 and incubated for 60 min at room temperature with Alexa 488-conjugated goat antirabbit IgG (1:200, Invitrogen, Life Technologies, OR, USA), diluted in PBS containing 0.005% Evans blue [32].

The immunostained slides were viewed using an Olympus BX-51 immunofluorescence microscope (Olympus BX51, Olympus Co., Tokyo, Japan). Histo-morphometry was used to quantify the presence of fibers immunostained with collagen type I in the bone trabeculae in the tibial proximal metaphyseal region *via* digitalized image analysis at 400x magnification.

The digitalization and image evaluation system consists of a photographic camera (Olympus Co., St. Laurent, Quebec, Canada), attached to the immunofluorescence microscope,

which captures the images and sends them to the monitor through a scanning system (Oculus TCX, Coreco, Inc., St. Laurent, Quebec, Canada). The images are then processed using specific software (Image - Pro Plus 6.0.) that allows the analysis of the immunostained fibers in green tones, and the results are presented as a percentage in relation to the total area of the trabeculae. The final result of each slide is described as the average of all bone trabeculae evaluated.

### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

For the evaluation of *COL1A1* gene expression, the femoral bone tissues, previously extracted and cleaned from adjacent tissues, were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . After completion of the exposures in all groups, the tissues were macerated to isolate total RNA according to the standard RNA Trizol® isolation protocol (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA).

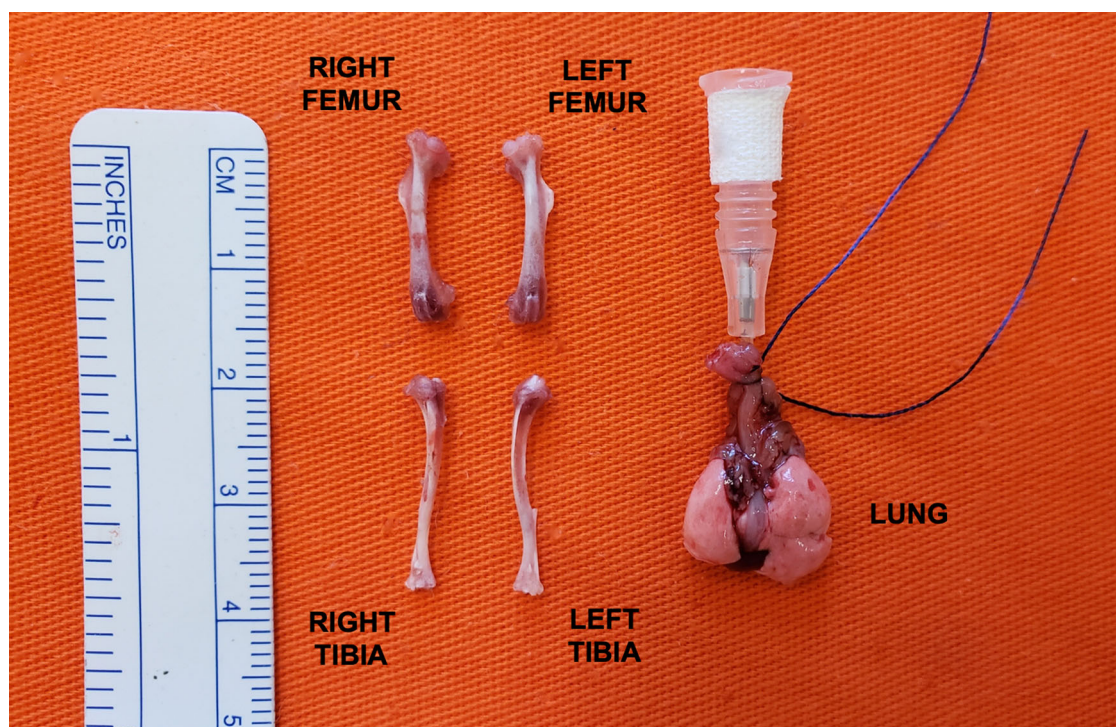
The RNA was dissolved in  $20 \mu\text{l}$  of deionized  $\text{H}_2\text{O}$  and treated with diethylpyrocarbonate (DEPEC; Merck, Germany), which is a strong ribonuclease inhibitor. Total RNA was quantified by optical density measurements (NanoVue Plus® Spectrophotometer; GE).

We performed reverse transcription from the RNA to cDNA using the Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequence of the genes of interest was acquired through at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>, and is shown in Table 2. Gene expression was evaluated using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and SYBR Green as the fluorescent dye (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All reactions were accompanied by a negative control (all reagents, except the sample). The amplifications were normalized using the GAPDH house-keeping gene as an internal control, since its expression remains constant in mice and is not influenced by exposure to cigarette smoke.

Gene expression was assessed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method [33]. In this method, the  $\Delta\text{Ct}$  that corresponds to the number of Ct (cycle threshold) of the studied gene normalized by the Ct of the GAPDH gene is calculated. The Ct of the target gene corresponds to the number of amplification cycles necessary for the accumulated fluorescence signal of the reaction to exceed the threshold.

$$\text{Thus, } \Delta\text{Ct}_{\text{COL1A1}} = \text{Ct}_{\text{COL1A1}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}} \text{ and } \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{COL1A1}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Control Mean}}$$

The qRT-PCR reactions were standardized to determine the best annealing temperature for the gene under study. The sizes of the fragments generated by qRT-PCR were validated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The cycling conditions for all genes were as follows:  $95^\circ\text{C}$  for 10 min, followed by 35 cycles at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s,  $60^\circ\text{C}$  for 30 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 30 s. A melting curve was performed to verify and certify a single fluorescence peak for each sample analyzed ( $95^\circ\text{C}$  for 15 s,  $65^\circ\text{C}$  for 30 s, and  $95^\circ\text{C}$  for 15 s).



**Figure 3.** Extracted tissues (femur, tibia and lung). The dissected bones were completely clean from the surrounding tissues to avoid interference in gene expression analysis.

**Table 2.** Oligonucleotides employed for quantitative qRT-PCR.

Gene	Sense 3'→ 5'	Antisense 5'→ 3'
COL1A1	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG	GCT TCT TTT CCT TGG GGT TC
GAPDH	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA

### Statistical analysis

All comparison data among the smoke (S), control (C) and provisional smoke (PS) groups at the different times studied were performed using IBM SPSS® Statistics V21.0 for Windows software. The level of significance used was 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

The descriptive analyses for the quantitative data that showed normal distribution are expressed as the mean and standard deviation. For quantitative data without a normal distribution, the results are expressed as the median and interquartile range IQ (25–75%). The assumptions of the normal distribution in each group and the homogeneity of the variances among groups were evaluated using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively.

For the quantitative data that showed a normal distribution in which two factors (group and time) were analyzed, the double factor analysis of variance test (ANOVA) was used, and when it was necessary to perform multiple comparisons of means, the Bonferroni test was used. When the data did not present a normal distribution, we used the Mann-Whitney test for the group factor. For the time factor, the Kruskal-Wallis test was used, and when it was necessary to perform multiple comparisons, the Dunn test was used.

In the comparison among groups (control, smoke and provisional smoke) with a time of six months, one-way ANOVA was used.

## Results

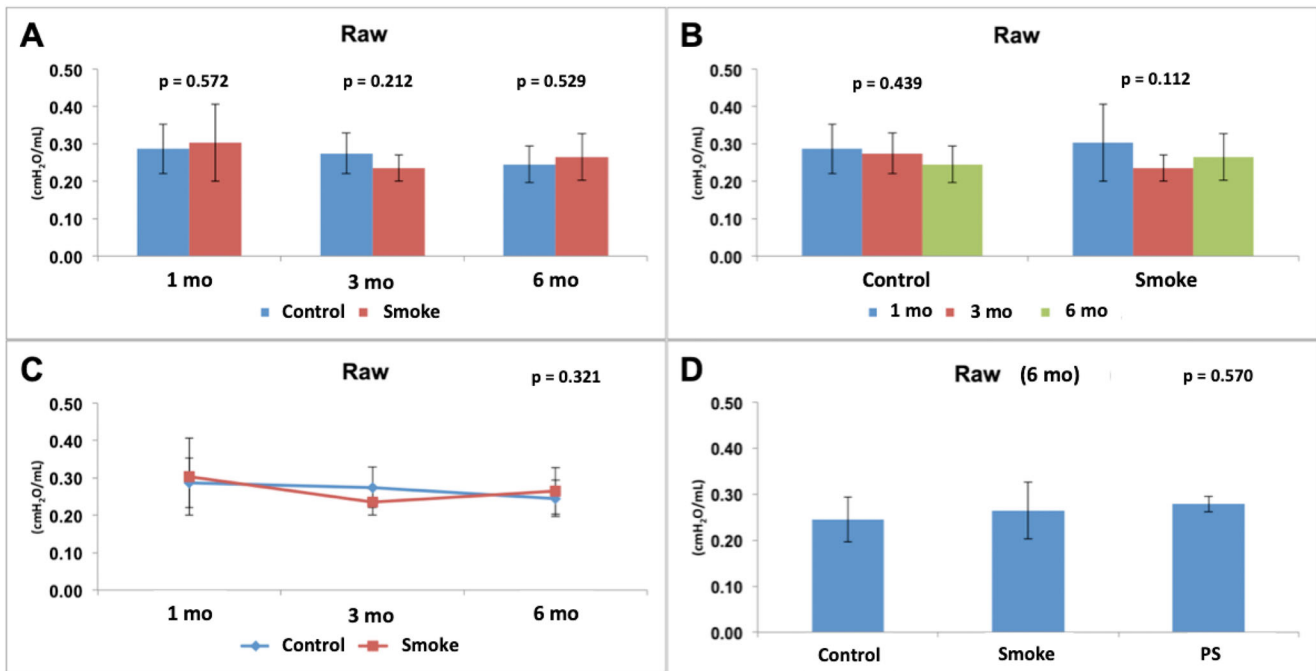
### Respiratory mechanics

The parameters of the mechanical assessment of the respiratory system, which included **Raw**, **Gtis** and **Htis** in the control and smoking groups with 1 (C1 and S1), 3 (C3 and S3) and 6 months (C6, S6 and PS) of follow-up, are shown in Figures 4–6, respectively.

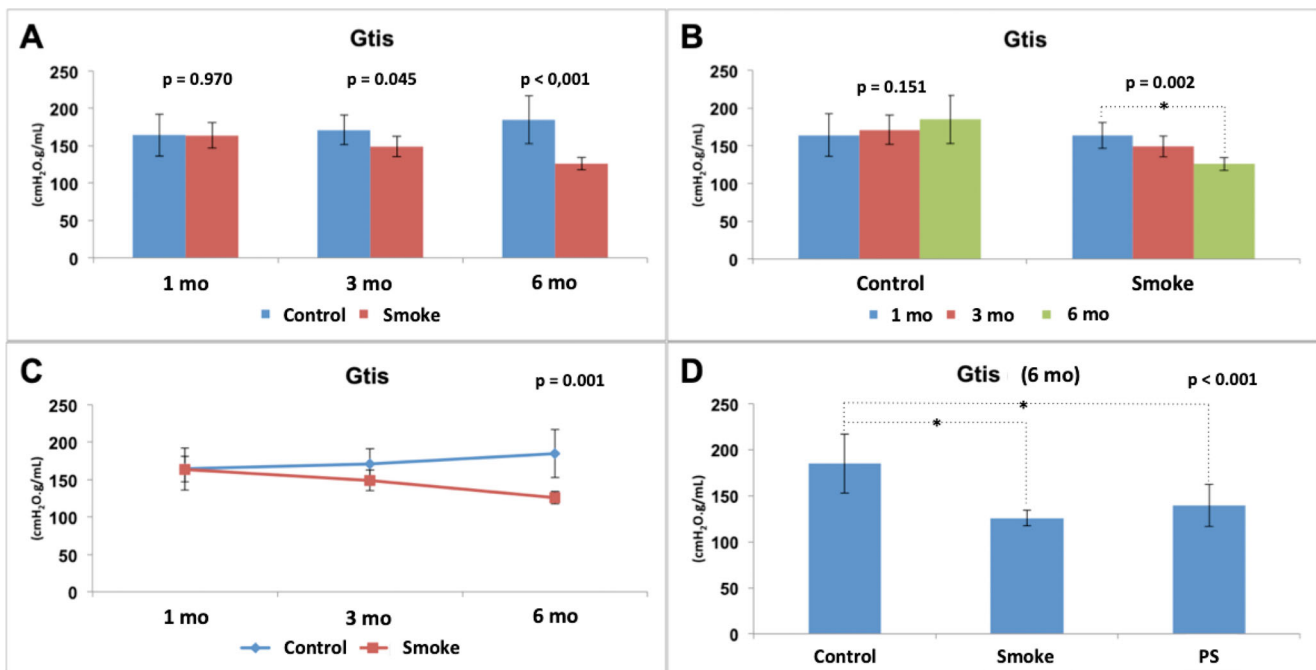
The assessment of airway resistance (**Raw**) did not show any significant difference between the experimental groups (Figure 4(A)) [C1 × S1 ( $p = 0.572$ ), C3 × S3 ( $p = 0.212$ ), C6 × S6 ( $p = 0.529$ )]. Moreover, there was no significant difference between the control groups or between the smoke groups over time (Figure 4(B)) [C1 × C3 × C6 ( $p = 0.439$ ), S1 × S3 × S6 ( $p = 0.112$ )]. The results also showed that for this parameter (**Raw**), the control condition and smoking are independent of time ( $p = 0.321$ ) (Figure 4(C)). After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 4(D)), there was also no significant difference among the groups ( $p = 0.570$ ).

The assessment of pulmonary tissue resistance (**Gtis**) normalized by weight showed a reduction in the values in the groups with exposure to cigarette smoke compared to the control groups with 3 and 6 months of follow-up (Figure 5(A)) [C1 × S1 ( $p = 0.970$ ), C3 × S3 ( $p = 0.045$ ), C6 × S6 ( $p < 0.001$ )]. There was no significant difference among the control groups over time (Figure 5(B)) [C1 × C3 × C6 ( $p = 0.151$ )]. However, there was a significant reduction among the groups with exposure to cigarette smoke over time (Figure 5(B)) [S1 × S3 × S6 ( $p = 0.002$ )], and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that there was a difference between S1 and S6 ( $p = 0.001$ ). The





**Figure 4.** Airway resistance assessment (Raw). Statistical analyses were performed with double factor analysis of variance test (ANOVA) in A, B and C; and one-way ANOVA test in D. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month.

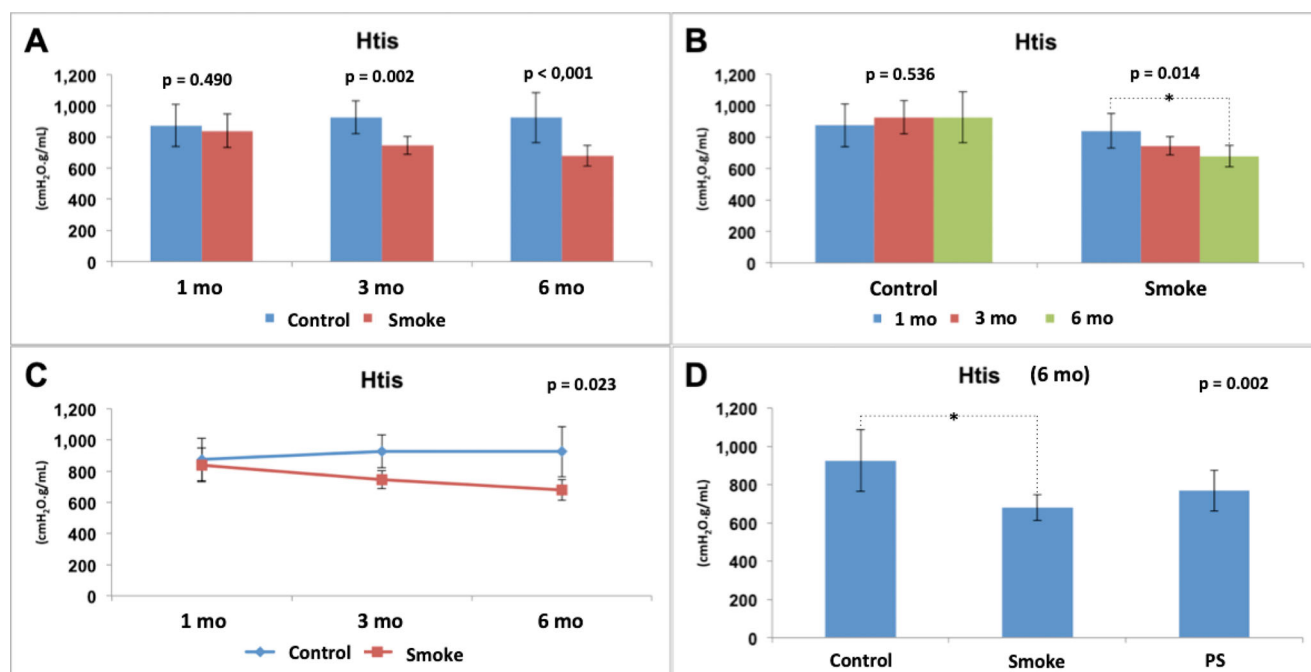


**Figure 5.** Assessment of lung tissue resistance (Gtis). Statistical analyses were performed with double factor analysis of variance test (ANOVA) in A, B and C; and one-way ANOVA test in D. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month. \*Statistically significant difference present in the Bonferroni post-test.

results also showed that for this parameter (Gtis), control and smoking are time-dependent ( $p = 0.001$ ) (Figure 5(C)). After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 5(D)), there was a significant difference among the groups ( $p < 0.001$ ), and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that a difference was observed for C6  $\times$  S6 ( $p < 0.001$ ) and C6  $\times$  PS ( $p = 0.013$ ) but not for S6  $\times$  PS ( $p = 0.977$ ), indicating that the 3-month pause of exposure to cigarette smoke that

occurred in the PS group did not result in any improvement in the analyzed parameter (Gtis) compared to that in the S6 group.

The assessment of lung tissue elastance (Htis) normalized by weight showed a reduction in the values in the groups with exposure to cigarette smoke compared to the control groups with 3 and 6 months of follow-up (Figure 6(A)) [C1  $\times$  S1 ( $p = 0.490$ ), C3  $\times$  S3 ( $p = 0.002$ ), C6  $\times$  S6 ( $p < 0.001$ )]. There was no significant difference between the



**Figure 6.** Assessment of lung tissue elastance (Htis). Statistical analyses were performed with double factor analysis of variance test (ANOVA) in A, B and C; and one-way ANOVA test in D. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month. \*Statistically significant difference present in the Bonferroni post-test.

control groups over time (Figure 6(B)) [ $C1 \times C3 \times C6$  ( $p = 0.536$ )]. However, there was a significant reduction among the groups with exposure to cigarette smoke over time (Figure 6(B)) [ $S1 \times S3 \times S6$  ( $p = 0.014$ )], and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that a difference occurred between S1 and S6 ( $p = 0.012$ ). The results also showed that, for this parameter (Htis), control and smoking are time dependent ( $p = 0.023$ ) (Figure 6(C)). After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 6(D)), there was a significant difference among the groups ( $p = 0.002$ ), and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that a difference occurred only between C6 and S6 ( $p = 0.002$ ) and not between C6 and PS ( $p = 0.138$ ) or S6 and PS ( $p = 0.654$ ).

Therefore, exposure to cigarette smoke generated alterations in the respiratory mechanics with a reduction in Gtis and Htis from the 3rd month and with progressive and dependent effects over time. In addition, the expected improvement in the PS group associated with a 3-month break from exposure to cigarette smoke was not evident.

### Alveolar enlargement

The assessment of the distal lung parenchyma by calculating the mean linear intercept (Lm) in the smoking and control groups at 1 (C1 and S1), 3 (C3 and S3) and 6 months (C6, S6 and PS) of follow-up is shown in Figure 7.

We found a significant increase in Lm in the groups exposed to cigarette smoke compared to the control groups at all studied times (Figure 7(A)) [ $C1 \times S1$  ( $p = 0.001$ ),  $C3 \times S3$  ( $p = 0.021$ ),  $C6 \times S6$  ( $p = 0.001$ )]. There was no significant difference among the control groups over time (Figure 7(B)) [ $C1 \times C3 \times C6$  ( $p = 0.482$ )]. Moreover, there was no significant

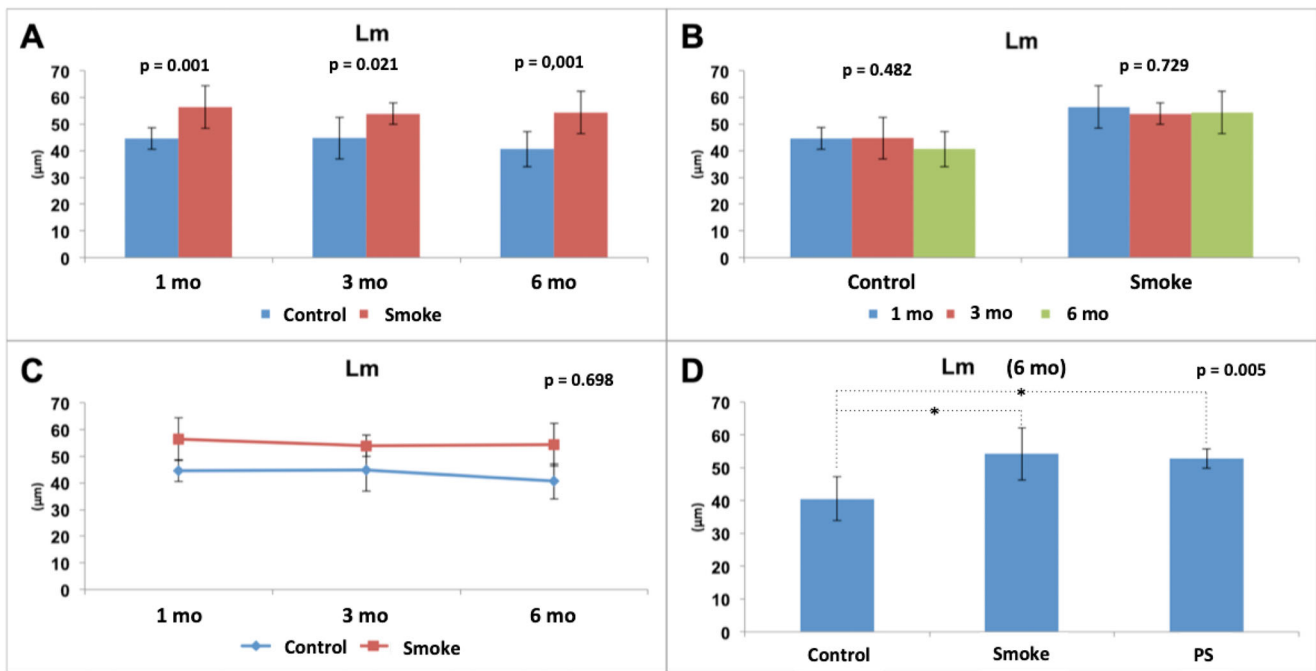
difference among the groups with exposure to cigarette smoke over time (Figure 7(B)) [ $S1 \times S3 \times S6$  ( $p = 0.729$ )]. The results also showed that for this parameter (Lm), control and smoking are independent of time ( $p = 0.698$ ) (Figure 7(C)). After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 7(D)), there was a significant difference among the groups ( $p = 0.005$ ), and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that a difference occurred between C6 and S6 ( $p = 0.006$ ) and C6 and PS ( $p = 0.042$ ) but not between S6 and PS ( $p > 0.999$ ), indicating that the 3-month pause of exposure to cigarette smoke that occurred in the PS group did not result in any improvement in the analyzed parameter (Lm) compared to that of the S6 group.

Therefore, exposure to cigarette smoke caused alterations in the lung parenchyma from the 1st month; however, there was no evidence of a progressive effect over the months. In addition, the expected improvement in the PS group associated with a 3-month break from exposure to cigarette smoke was not evident.

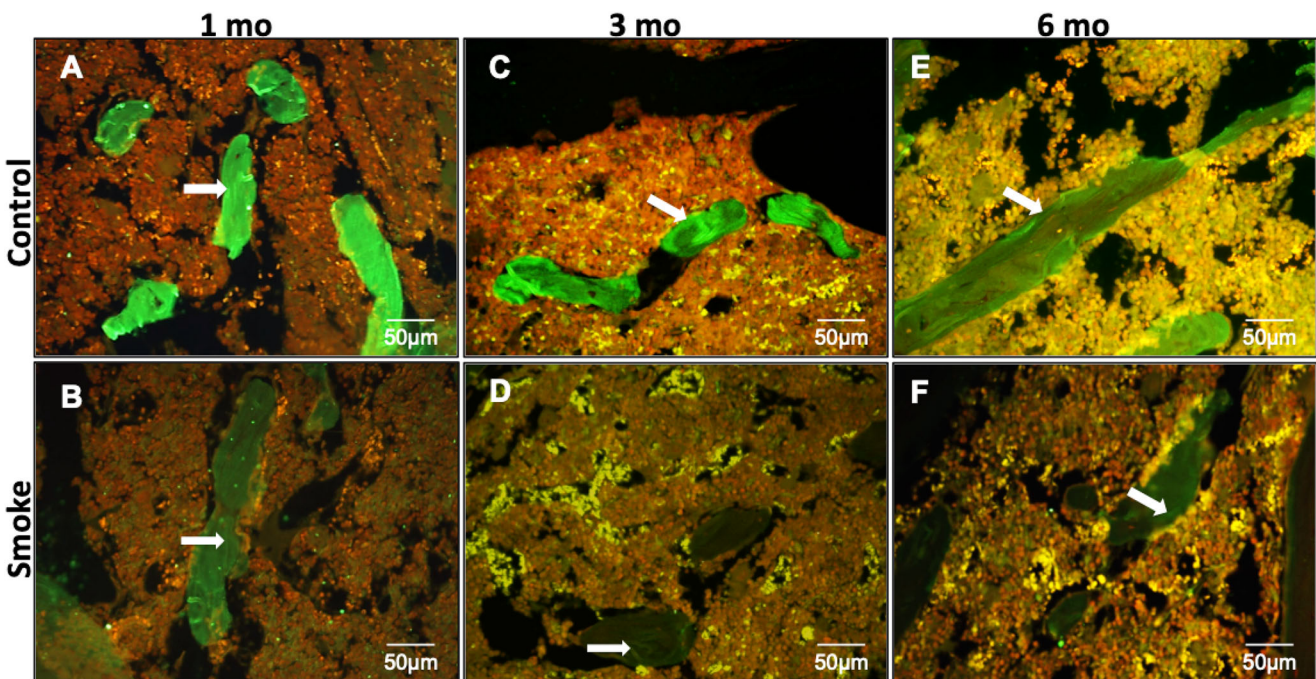
### Abnormal microscopic features of type I collagen in early stages of COPD

Immunofluorescence staining for type I collagen (Figure 8(A)) shows a uniform labeling pattern for collagen, identified by the intense bright green fluorescence in the trabecular bone of C1 group, in contrast to a marked decrease of fluorescence in the S1 group (Figure 8(B)). Likewise, the histological pattern and reduction immunostaining was found in the C3 and S3 groups (Figure 8(C and D)).

In Figure 8(E and F) we identified a slight decrease in the expression of collagen in C6 group when compared with C1 and C3 groups. However, the decrease in the expression



**Figure 7.** Histological assessment of the mean linear intercept (Lm). Statistical analyses were performed with double factor analysis of variance test (ANOVA) in A, B and C; and one-way ANOVA test in D. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month. \*Statistically significant difference present in the Bonferroni post-test.



**Figure 8.** Immunofluorescence staining for type I collagen shows a uniform labeling pattern for collagen identified by the intense bright green fluorescence in the trabecular bone (arrows) of control groups with a slight decrease in 6 months compared with 1 and 3 months (A, C and E) and a marked decrease of fluorescence in smoke groups (B, D and F). mo: month.

of type I collagen in the S6 group was more evident when compared with the C6 group.

Our histomorphometric results confirm our morphological findings and show a reduction in type I collagen in the groups exposed to cigarette smoke compared to the control groups at all times of follow-up (Figure 9(A)) [C1  $\times$  S1 ( $p = 0.003$ ), C3  $\times$  S3 ( $p < 0.001$ ), C6  $\times$  S6 ( $p = 0.003$ )]. There was no significant difference among the control groups over time (Figure 9(B)) [C1  $\times$  C3  $\times$  C6 ( $p = 0.204$ )].

However, there was a significant reduction among the groups with exposure to cigarette smoke over time (Figure 9(B)) [S1  $\times$  S3  $\times$  S6 ( $p = 0.019$ )], and Dunn's post-test for multiple comparisons showed that a difference was detected between S1 and S6 ( $p = 0.023$ ) but not between S1 and S3 ( $p = 0.123$ ) or S3 and S6 ( $p > 0.999$ ).

After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 10), there was a significant difference between the groups ( $p < 0.001$ ), and the Bonferroni post-test

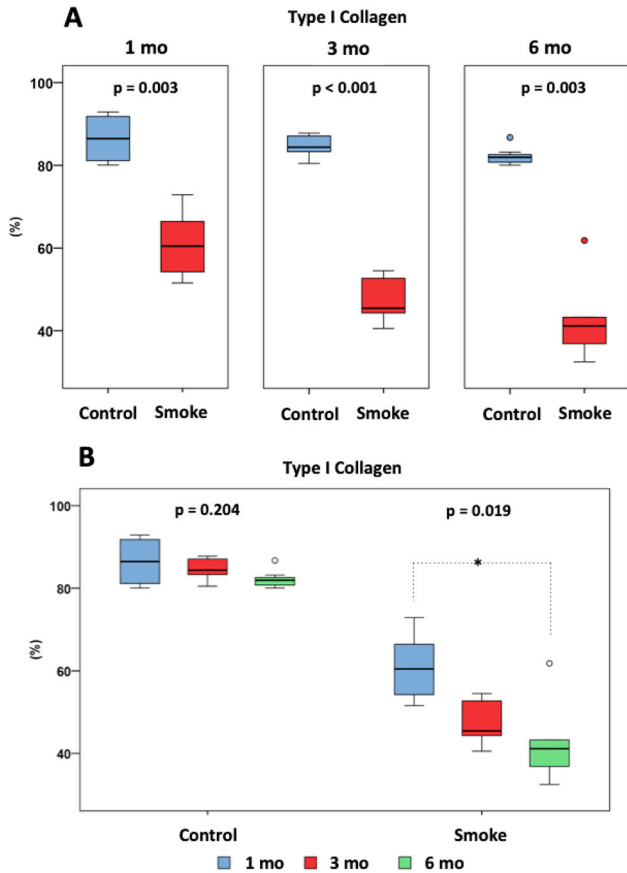
for multiple comparisons showed that a difference occurred between C6 and S6 ( $p < 0.001$ ) and C6 and PS ( $p < 0.001$ ) but not between S6 and PS ( $p = 0.668$ ).

Therefore, exposure to cigarette smoke generated alterations in the composition of the bone fibrillar matrix from the 1st month with a progressive effect over time regarding the reduction of type I collagen. In addition, the expected

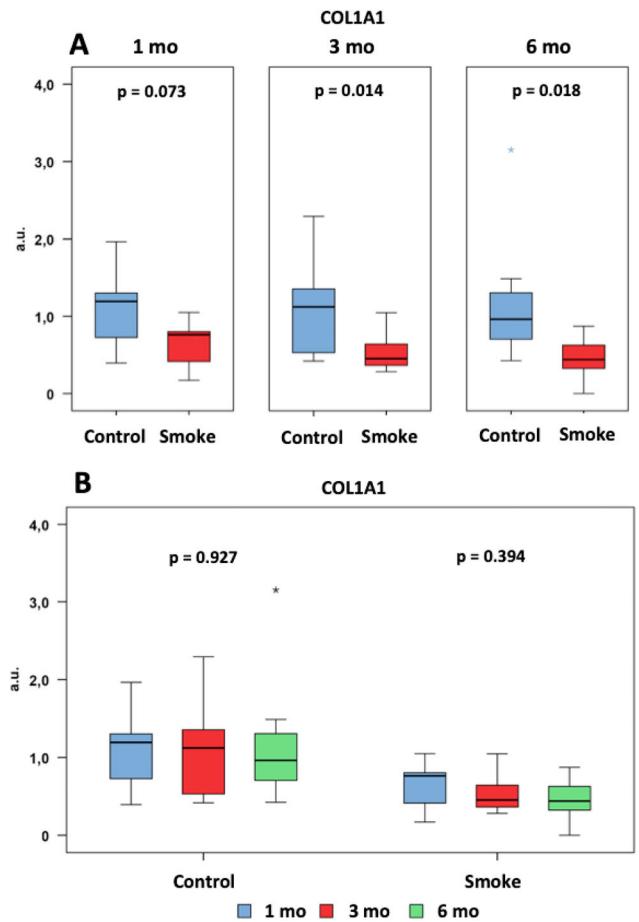
improvement in the PS group associated with a 3-month break from exposure to cigarette smoke was not evident.

### COL1A1 gene expression analysis

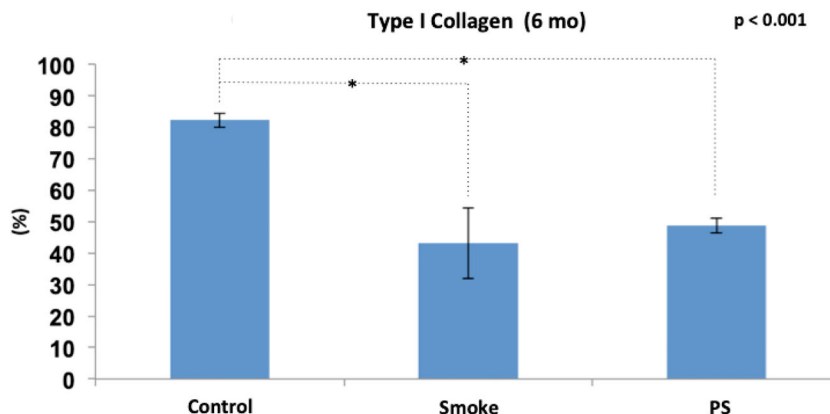
The assessment of COL1A1 gene expression in the smoking and control groups at 1 (C1 and S1), 3 (C3 and S3) and 6 months (C6, S6 and PS) of follow-up is shown in Figures 11 and 12.



**Figure 9.** Immunohistochemical assessment of type I collagen fibers. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney test in A and Kruskal-Wallis test in B. Results are presented as an average percentage of type I collagen in relation to the total area of the trabeculae. The data are shown as median and interquartile range IQ (25 - 75%). (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ ). mo: month. \*Statistically significant difference present in the Dunn post-test.

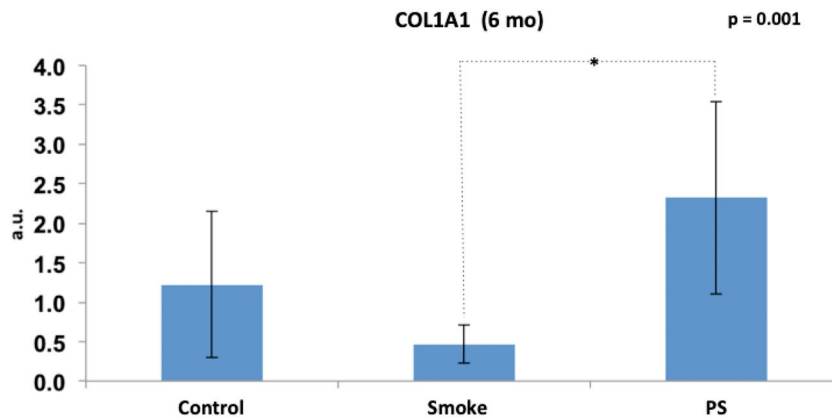


**Figure 11.** Assessment of COL1A1 gene expression. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney test in A and Kruskal-Wallis test in B. The data are shown as median and interquartile range IQ (25 - 75%). (Control: 1 mo,  $n = 10$ ; 3 mo,  $n = 10$ ; 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 1 mo,  $n = 9$ ; 3 mo,  $n = 8$ ; 6 mo,  $n = 10$ ). mo: month. a.u.: arbitrary unit.



**Figure 10.** Immunohistochemical assessment of type I collagen fibers among the groups at 6 months of follow-up (C6, S6 and PS). Statistical analyses were performed with one-way ANOVA test. Results are presented as an average percentage of type I collagen in relation to the total area of the trabeculae. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month. \*Statistically significant difference present in the Bonferroni post-test.





**Figure 12.** Assessment of *COL1A1* gene expression among the groups at 6 months of follow-up (C6, S6 and PS). Statistical analyses were performed with one-way ANOVA test. The data are shown as mean and standard deviation (Control: 6 mo,  $n = 7$ . Smoke: 6 mo,  $n = 10$ . PS:  $n = 4$ ). PS: provisional smoke. mo: month. a.u.: arbitrary unit. \*Statistically significant difference present in the Bonferroni post-test.

We observed a reduction in the gene expression levels in the groups exposed to cigarette smoke compared to the control groups at 3 and 6 months of follow-up (Figure 11(A)) [C1  $\times$  S1 ( $p = 0.073$ ), C3  $\times$  S3 ( $p = 0.014$ ), C6  $\times$  S6 ( $p = 0.018$ )]. There was no significant difference among the control groups over time (Figure 11(B)) [C1  $\times$  C3  $\times$  C6 ( $p = 0.927$ )]. There was also no significant difference among the groups with exposure to cigarette smoke over time (Figure 11(B)) [S1  $\times$  S3  $\times$  S6 ( $p = 0.394$ )].

After addition of the PS group in the analysis of the 6-month groups (Figure 12), there was a significant difference among the groups ( $p = 0.001$ ), and the Bonferroni post-test for multiple comparisons showed that a difference occurred only for S6  $\times$  PS ( $p = 0.001$ ).

Therefore, exposure to cigarette smoke generated a reduction in the gene expression of *COL1A1* from the 3rd month. In addition, the expected improvement in the PS group associated with a 3-month break from exposure to cigarette smoke was shown by the increased gene expression, but no improvement in the type I collagen deposition was shown by immunohistochemistry.

## Discussion

Early in the development of COPD, we observed a worsening in functional and structural lung parameters with concomitant changes in the composition of the bone collagen matrix characterized by a reduction of type I collagen that remained until the end of the protocol.

Although the destruction of the lung parenchyma was identified from the 1st month through the increase in Lm, the reductions in resistance (Gtis) and elastance (Htis) were confirmed only after the 3rd month. [34]. In animal models, the structural changes generally occur earlier than the functional changes [35]. These differences occur due to initial tissue edema and technical difficulties in assessing respiratory mechanics in small animals. Functional changes were detected only with greater structural damage [27,35].

The structural and functional changes in the lung, characterizing COPD development, were maintained throughout the protocol, and the functional parameters progressively

worsened over time. There was no improvement in those parameters in the group in which exposure to cigarette smoke was interrupted for 3 months (PS group). However, smoking cessation does not always ameliorate chronic lung conditions. De Cunto et al. (2018) [36] demonstrated that even after 6 months of smoking cessation, C57Bl6 mice still showed persistent inflammation, progressive parenchymal deterioration as well as airway remodeling. This situation is characterized by a persistent activation of NFkB and a significant up-regulation of proinflammatory cytokines and chemokines gene expression (i.e. IL-6, IL-8, KC and MIP-1).

Once the effectiveness of the experimental model for inducing COPD was demonstrated, we performed the bone tissue analysis. Although fragility of bone tissue in smoking patients has been a recurrent theme in the literature due to loss of bone mass [37], increased risk of fractures [38,39], increased risk of nonconsolidation or delayed fracture consolidation [16,18,40], the physiological mechanisms involved in this process are poorly understood. Smoking generates a systemic inflammatory process characterized by a marked increase in cytokines expression, such as TNF-alpha and IL-17 induced MCP-1, leading the osteoclast differentiation [41]. The dynamic regulation of osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic cytokines is important in maintaining the balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts, which eventually affects bone integrity [42].

Recently, Sasaki et al. (2018) [19] showed deterioration of bone tissue in mice exposed to cigarette smoke (more than 20 weeks of exposure) with the disorganization of total collagen fibers and misalignment of apatite crystals. In our study, we verified a progressive reduction in the proportion of type I collagen over time from the 1st month, as well as in the gene expression of *COL1A1*.

These results corroborate with previous experimental and clinical findings. Rothem et al. (2009) [43] in human osteoblastic cell culture (MG63) showed that nicotine at high concentrations has toxic, antiproliferative and negative regulatory effects on type I collagen gene expression. Likewise, Theiss et al. (2000) [44], using an experimental model of vertebral fusion, showed a reduction in the gene expression of type I collagen in the bone callus of rabbits exposed to a nicotine solution in a 4-week follow-up. Diniz-Fernandes

et al. (2018) [45] studied patients diagnosed with posterior tibial tendinopathy and showed a decrease in the deposition of type I collagen in the tendon that was associated with a reduction in the mechanical resistance of the tissue.

Smoking has been described by their cytotoxic effects in fibroblasts and osteoblasts, worsening these cells activity and the collagen production [16] as we observed in animals that were exposed to cigarette smoke that showed reduction in type I collagen as well as in expression of *COL1A1*. Evidence from *in vitro* studies showed that higher levels of nicotine, main compound of cigarette smoke, induces worsening in osteoblasts function with consequent decreased proliferation and impaired collagen synthesis [46–48]. In this context, the interruption of smoking habit before the elective surgeries have been used to diminish the time required for bone healing as well the complications after surgery [49–51] and, after smoking cessation, lower levels of nicotine is detected in serum and urine of these patients [52].

In our study, the effect of smoking cessation on bone tissue turnover was studied through the provisional smoke (PS) group, in which the mice had a 3-month break in cigarette smoke exposure. Although, we did not observe bone structural improvements related to a 3-month exposure pause, we have already detected an important increase in *COL1A1* gene expression, suggesting initial events in order to increase type I collagen deposition. Most likely, a longer follow-up PS group would identify a structural improvement.

In the humans, after smoking cessation, there is a rapid decline in nicotine and CO levels; in 1 week, the majority of nicotine metabolites are eliminated, and in 2 months, viscosity and blood flow improve in the limbs [38,53], however the improvement in the bone mineral density in postmenopausal women was observed only 1 year after smoking cessation [54].

In our study, we did not observe pulmonary or bone structural improvements related to a 3-month exposure pause, but we did detect an important increase in *COL1A1* gene expression in the PS group related to cessation of exposure. Most likely, a longer follow-up in this group would identify a structural improvement that was preceded by the change in gene expression, which we could detect earlier.

To our knowledge, no previous study has focused on the long-term temporal effects of cigarette smoke on structural changes of the bone matrix. This study will contribute to a better understanding of the extrapulmonary manifestations of COPD as well as to improve the clinical management in bone diseases that are worsened by smoking habit.

## Conclusion

We showed that a worsening in bone collagen matrix is part of the initial physiopathological events during COPD development and the smoking cessation induced an evident recovery of *COL1A1* expression, possibly to attempt at tissue repair.

## Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest.

## ORCID

Jader Joel Machado Junqueira  <http://orcid.org/0000-0002-9848-7288>

## References

1. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic 2013. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship [Internet]. 2013. [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2013/en/](http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/).
2. Talhout R, Schulz T, Florek E, et al. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(2):613–628. DOI:10.3390/ijerph8020613
3. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet*. 2003;362(9387):847–852. DOI:10.1016/S0140-6736(03)14338-3
4. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg*. 2006;391(6):603–613. DOI:10.1007/s00423-006-0111-z
5. Breitling LP. Current genetics and epigenetics of smoking/tobacco-related cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1468–1472. DOI:10.1161/ATVBAHA.112.300157
6. Forey BA, Thornton AJ, Lee PN. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence relating smoking to COPD, chronic bronchitis and emphysema. *BMC Pulm Med*. 2011;11:36. DOI:10.1186/1471-2466-11-36
7. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for The Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Internet]. 2019. <https://goldcopd.org/gold-reports/>.
8. Inoue D, Watanabe R, Okazaki R. COPD and osteoporosis: links, risks, and treatment challenges. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:637–648. DOI:10.2147/COPD.S79638
9. Llinàs L, Peinado VI, Ramon Goñi J, et al. Similar gene expression profiles in smokers and patients with moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(1):32–41. DOI:10.1016/j.pupt.2010.10.010
10. Vrieze A, de Greef MHG, Wijkstra PJ, et al. Low bone mineral density in COPD patients related to worse lung function, low weight and decreased fat-free mass. *Osteoporos Int*. 2007;18(9):1197–1202. DOI:10.1007/s00198-007-0355-7
11. Xiaomei W, Hang X, Lingling L, et al. Bone metabolism status and associated risk factors in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Biochem Biophys*. 2014;70(1):129–134. DOI:10.1007/s12013-014-9868-9
12. Daniell HW. Osteoporosis of the Slender smoker. Vertebral compression fractures and loss of metacarpal cortex in relation to postmenopausal cigarette smoking and lack of obesity. *Arch Intern Med*. 1976;136(3):298–304. DOI:10.1001/archinte.136.3.298
13. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, et al. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003;74(10):1440–1446. DOI:10.1902/jop.2003.74.10.144
14. de Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M, et al. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Orthop Relat Res*. 1983;179:107–115. DOI:10.1097/00003086-198310000-00016
15. Kamer AR, El-Ghorab N, Marzec N, et al. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med*. 2006;17(1):121–127. DOI:10.3892/ijmm.17.1.121
16. Barbosa AP, Lourenço JD, Junqueira JJM, et al. The deleterious effects of smoking in bone mineralization and fibrillar matrix composition. *Life Sci*. 2020;241:117132. DOI:10.1016/j.lfs.2019.117132
17. Chen F, Osterman AL, Mahony K. Smoking and bony union after ulna-shortening osteotomy. *Am J Orthop*. 2001;30(6):486–489.

18. Little CP, Burston BJ, Hopkinson-Woolley J, et al. Failure of surgery for scaphoid non-union is associated with smoking. *J Hand Surg Br.* 2006;31(3):252–255. DOI:10.1016/j.jhsb.2005.12.010
19. Sasaki M, Chubachi S, Kameyama N, et al. Effects of long-term cigarette smoke exposure on bone metabolism, structure, and quality in a mouse model of emphysema. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191611. DOI:10.1371/journal.pone.0191611
20. Tsukamoto M, Mori T, Wang KY, et al. Systemic bone loss, impaired osteogenic activity and type I muscle fiber atrophy in mice with elastase-induced pulmonary emphysema: Establishment of a COPD-related osteoporosis mouse model. *Bone.* 2019; 120:114–124. DOI:10.1016/j.bone.2018.10.017
21. Exposito J-Y, Valcourt U, Cluzel C, et al. The fibrillar collagen family. *IJMS.* 2010;11(2):407–426. DOI:10.3390/ijms11020407
22. Feng X. Chemical and biochemical basis of cell-bone matrix interaction in health and disease. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):189–196. DOI:10.2174/187231309788166398
23. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531–1546. DOI:10.1016/j.addr.2003.08.002
24. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals.* 8th ed. 500 Fifth Street, NW, Lockbox 285, Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
25. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012;39(2):254–264. DOI:10.1183/09031936.00003411
26. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol.* 1992;72(1):168–178. DOI:10.1152/jappl.1992.72.1.168
27. Ito JT, Cervilha DAB, Lourenço JD, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: a temporal analysis using a CS-induced model. *PLoS One.* 2019;14(1):e0209351. DOI:10.1371/journal.pone.0209351
28. Gomes RF, Shen X, Ramchandani R, et al. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol.* 2000; Sep89(3):908–916. DOI:10.1152/jappl.2000.89.3.908
29. Lopes F, Toledo AC, Olivo CR, et al. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol.* 2013;28(2):269–276. DOI:10.14670/HH-28.269
30. Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, et al. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(12):1596–1603. DOI:10.1164/rccm.2202001
31. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, et al. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(4):394–418. DOI:10.1164/rccm.200809-1522ST
32. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, et al. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract.* 2004;200(10):681–691. DOI:10.1016/j.prp.2004.05.007
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. DOI:10.1006/meth.2001.1262
34. Toumpanakis D, Kastis GA, Zacharatos P, et al. Inspiratory resistive breathing induces acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(9):1129–1136. DOI:10.1164/rccm.201001-0116OC
35. Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, et al. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(10):1797–1803. DOI:10.1590/s1807-59322011001000020
36. De Cunto G, Bartalesi B, Cavarra E, et al. Ongoing lung inflammation and disease progression in mice after smoking cessation: beneficial effects of formyl-peptide receptor blockade. *Am J Pathol.* 2018;188(10):2195–2206. DOI:10.1016/j.ajpath.2018.06.010
37. Szulc P, Garnero P, Claustrat B, et al. Increased bone resorption in moderate smokers with low body weight: the Minos study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):666–674. DOI:10.1210/jcem.87.2.8232
38. Hernigou J, Schuind F. Tobacco and bone fractures: A review of the facts and issues that every orthopaedic surgeon should know. *Bone Joint Res.* 2019; Jul 58(6):255–265. DOI:10.1302/2046-3758.86.BJR-2018-0344.R1
39. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(2):155–162. DOI:10.1007/s00198-004-1640-3
40. Hernigou J, Schuind F. Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *Int Orthopaedics (Sicot).* 2013;37(5):883–887. DOI:10.1007/s00264-013-1809-5
41. De Cunto G, Lunghi B, Bartalesi B, et al. Severe reduction in number and function of peripheral T cells does not afford protection toward emphysema and bronchial remodeling induced in mice by cigarette smoke. *Am J Pathol.* 2016;186(7):1814–1824. DOI:10.1016/j.ajpath.2016.03.002
42. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, et al. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* 2018;18(1):e8. DOI:10.4110/in.2018.18.e8
43. Rothem DE, Rothem L, Soudry M, et al. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):555–561. DOI:10.1007/s00774-009-0075-5
44. Theiss SM, Boden SD, Hair G, et al. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000; Oct 1525(20):2588–2594. DOI:10.1097/00007632-200010150-00008
45. Diniz-Fernandes T, Godoy-Santos AL, Santos MC, et al. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy. *Histol Histopathol.* 2018; 33(9):929–936. DOI:10.14670/HH-11-982
46. Lenz LG, Ramp WK, Galvin RJ, et al. Inhibition of cell metabolism by a smokeless tobacco extract: tissue and species specificity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;199(2):211–217. DOI:10.3181/00379727-199-43349
47. Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991; 197(1):36–43. DOI:10.3181/00379727-197-43221
48. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, et al. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone.* 1991; 12(4):283–286. DOI:10.1016/8756-3282(91)90077-V
49. Wagner PD, Mathieu-Costello O, Bebout DE, et al. Protection against pulmonary O<sub>2</sub> toxicity by N-acetylcysteine. *Eur Respir J.* 1989;2(2):116–126.
50. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol.* 1997;38:205–227.
51. Brown LA. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol.* 1994;266(2 Pt 1):L172–L177. DOI:10.1152/ajplung.1994.266.2.L172
52. Carlson BB, Burton DC, Jackson RS, et al. Recidivism rates after smoking cessation before spinal fusion. *Orthopedics.* 2016;39(2):e318–e322. DOI:10.3928/01477447-20160301-03
53. No authors listed. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Tobacco control: reversal of risk after quitting smoking. IARC handbooks of cancer prevention, 2007. [internet]. Available: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Tobacco-Control-Reversal-Of-Risk-After-Quitting-Smoking-2007>.
54. Oncken C, Prestwood K, Kleppinger A, et al. Impact of smoking cessation on bone mineral density in postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt).* 2006;15(10):1141–1150. DOI:10.1089/jwh.2006.15.1141