



“Influência da cafeína na osteogênese do reparo ósseo alveolar em ratos Wistar”

Autores: Kaio dos Santos*¹, Alexandre Rodrigues Freire¹, Felipe Bevilacqua Prado¹, Ana Cláudia Rossi¹

1. Laboratório de Pesquisa em Mecanobiologia, área de Anatomia, Departamento de Biociências, Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

*E-mail: kaiog.md@gmail.com

Palavras-chave: Reparo ósseo alveolar; Cafeína; Osso alveolar; Marcadores de fluorocromo.

INTRODUÇÃO

O osso em um estado de saúde está em constante reabsorção e deposição, de forma equilibrada, a fim de manter a integridade estrutural do tecido. Para isso as células atuam juntas na sinalização para manter o turnover. Com o objetivo de compreensão da cicatrização do osso alveolar já foram feitos estudos pré-clínicos analisando o osso alveolar após a extração em condições clínicas e experimentais. Um modelo clássico é a extração de incisivos superiores em ratos descrevendo a cicatrização alveolar em três fases: formação de coágulo e proliferação celular a partir do tecido conjuntivo; formação de tecido conjuntivo e cicatrização; fase de ossificação (Hassumi et al., 2018).

A cicatrização e reparo dos tecidos possuem fatores que podem afetar positivamente ou negativamente este processo. No caso, o componente alimentar, ou seja, a dieta é o fator a ser estudado e que atua como componente crítico em todos os processos de cicatrização de feridas (Demling., 2009).

A cafeína está muito presente na dieta em diferentes fontes alimentares como café, chocolate e bebidas derivadas de cola, além de serem encontrados em inúmeros medicamentos. Trabalhos anteriores mostraram que ingestão diária de café fervido e a administração de cafeína pura afetaram o processo de reparo ósseo após a extração dentária em ratos, incluindo retardo na produção de tecido de granulação (Macedo et al., 2015). Ainda se faz necessário estudos que avaliem a influência da cafeína na densidade de trabéculas ósseas após a fase do reparo ósseo alveolar e o impacto na microarquitetura das trabéculas ósseas.

Estudos clínicos apresentam resultados conflitantes em relação a cafeína e ao cálcio uma vez que um estudo mostrou uma influência negativa na retenção do cálcio (Massey et al., 1993), no entanto outro trabalho feito demonstrou nenhuma relação entre a ingestão de cafeína e o metabolismo do cálcio (Cooper et al., 1992). Marcadores de fluorocromo já foram utilizados em trabalhos com ratos para detectar e medir atividades osteogênicas (Merzel et al., 2008). Fluorocromos são compostos químicos que possuem a capacidade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz óssea orgânica. Portanto, as marcações de fluorocromo representam a quantidade de precipitação de cálcio, permitindo assim medir a formação óssea

(Ferreira et al., 2015). Com esse marcador podemos avaliar uma possível alteração causada pela cafeína no momento da osteogênese no reparo alveolar se assim ocorrer, já que os trabalhos sobre a influência da cafeína no cálcio são conflitantes.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi descrever a influência do café na osteogênese do reparo ósseo alveolar em ratos Wistar com ingestão de café por meio de marcadores de fluorocromo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi submetido à apreciação e análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP. A Comissão avaliou e aprovou sob protocolo CEUA 5324-1/2019.

Modelo de adaptação à entrada de café

A quantidade de café ingerida pelos animais foi estimada com base no consumo humano diário de 4 xícaras (240 mL) *por* dia para uma pessoa pesando 60 kg (adaptado do trabalho de Macedo et al., 2015). Assim, os ratos passaram a receber a ingestão de café torrado, moído e cozido para a adaptação de 50 mg / mL (1,2 mL de infusão de café / dia), reduzindo a oferta de água, durante os 28 dias a partir do dia zero da exodontia.

Amostra e desenho do estudo

A amostra foi de 16 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com 2 meses de idade (200-250g), provenientes do centro multidisciplinar para investigação biológica na área de ciência em animais de laboratório-CEMIB- UNICAMP. Os ratos foram mantidos no biotério da FOP/UNICAMP em gaiolas coletivas(4 animais/caixa), os ratos do grupo controle, e em gaiolas individuais os ratos do grupo com ingestão de café, com temperatura em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de luz controlado (12/12h) e acesso livre a água e ração até os dois meses de idade, e após esse período o grupo controle continuou tendo acesso livre a água e ração mas o grupo com ingestão de café teve acesso controlado a água e livre para ração. Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em grupos distintos para os experimentos: 1) grupo dentição normal/água (n=4); 2) grupo dentição normal/café (n=4); 3) grupo exodontia/água (n=4); 4) grupo exodontia/café (n=4).

Exodontia

O procedimento foi realizado sob anestesia geral utilizando solução de quetamina (40-87 mg/kg) e relaxante muscular xilasina (5-13 mg/kg), por via intraperitoneal. Uma vez verificada a sedação e os sinais de anestesia, foi realizada a antisepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e em seguida, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (Okamoto e De Russo, 1973). A mucosa gengival foi suturada com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0 – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos).

Administração dos marcadores ósseos e procedimento de Eutanásia

Em ambos os grupos, controle e exodontia, 5mg/Kg de peso corpóreo de calceína verde intravenoso foi administrada (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) aos 14 dias a contar a partir do dia em que foi realizada a exodontia. A calceína foi preparada imediatamente antes do uso. Cada animal recebeu doses de 3 mL de volume do corante. Em ambos os grupos, controle e exodontia, 5mg/Kg de peso corpóreo de vermelho de alizarina intravenoso foi

administrada (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) aos 24 dias a contar a partir do dia em que foi realizada a exodontia. A alizarina foi preparada imediatamente antes do uso. Cada animal recebeu doses de 3 mL de volume do corante. A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos propostos anteriormente tanto para o grupo controle quanto para o experimental por dose excessiva de anestésico. A cabeça foi desarticulada do corpo e dissecada para retirada em bloco e fixada em solução de formol a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24h a 4°C.

Processamento histológico

Logo após a eutanásia, os ratos de todos os grupos, tiveram sua maxila direita removida. As peças foram fixadas em formol a 10%. As peças foram desidratadas em sequência de álcoois em diferentes concentrações. Uma vez verificada a desidratação, foram embebidas em Metilmetacrilato (monômero de resina acrílica) no interior de tubos de ensaio de vidro. Peróxido de benzoíla por adicionado para ativar a polimerização. Uma vez polimerizado, as peças (maxila direita emblocada em resina) foram removidas dos tubos de ensaio. E as lâminas histológicas obtidas por desgaste manual utilizando discos em baixa rotação e lixas de baixa granulação.

Análise de Fluorescência

Para análise de microscopia de fluorescência no alvéolo do incisivo superior direito as imagens serão obtidas usando combinações apropriadas de excitação e filtros. As imagens das lâminas serão capturadas em microscópio óptico de luz (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado à câmera. A análise histomorfométrica será feita de acordo com a visualização da intensidade de marcação do fluorocromo no tecido ósseo utilizando-se as objetivas de 20x e 40x.

RESULTADOS

Em virtude da suspensão das atividades em Laboratório da Universidade em decorrência da Pandemia da doença Covid19, não foi possível ter acesso ao microscópio óptico de luz (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado à câmera. Para análise de microscopia de fluorescência no alvéolo do incisivo superior direito as imagens devem ser obtidas usando combinações apropriadas de excitação e filtros. As imagens das lâminas seriam capturadas em microscópio óptico de luz (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado à câmera. E a partir das imagens capturadas é que seria possível realizar as análises qualitativa e quantitativa (histomorfométrica) para visualização da intensidade de marcação dos fluorocromos no tecido ósseo alveolar utilizando-se as objetivas de 20x e 40x.

A figura 1 mostra um exemplar da peça óssea em lâmina histológica, pós processamento para este fim. Foi possível alcançarmos a etapa de obtenção das lâminas, mas não executar a realização de suas análises. Antecipadamente agradecemos a compreensão e acreditamos que, com o Plano de retorno da Universidade, será possível obtermos as imagens para gerar resultados. O bolsista foi contemplado com nova vigência de bolsa (quota 2020-2021) com a renovação deste mesmo projeto. Então, no próximo ano, nos comprometemos em entregar os resultados da análise de fluorescência, essenciais para a conclusão da pesquisa.



Figura 1. Exemplar da peça óssea (maxila direita) obtida pós processamento. Corte para visualização em microscópio óptico de luz (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado à câmera. O quadrado marca a região do terço médio do alvéolo direito a ser analisada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cooper C, Atkinson EJ, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL, Judd HL, Melton LJ 3rd. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis?. *J Bone Miner Res.* 1992 Apr;7(4):465-71.
2. Demling RH. Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. *Eplasty.* 2009;9:e9. Epub 2009 Feb 3
3. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018 Jun 18;26:e20170326
4. Macedo RM, Brentegani LG, Lacerda SA. Effects of coffee intake and intraperitoneal caffeine on bone repair process--a histologic and histometric study. *Braz Dent J.* 2015 Mar-Apr;26(2):175-80
5. Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr.* 1993 Sep;123(9):1611-4.
6. Merzel J, Salmon CR. Growth and the modeling/remodeling of the alveolar bone of the rat incisor. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Jul;291(7):827-34.