

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

Palavras-Chave: Café, Reparo ósseo alveolar, Fluorescência

Autores:

Kaio dos Santos [FOP-UNICAMP]

Alexandre Rodrigues Freire [FOP-UNICAMP]

Beatriz Carmona Ferreira [FOP-UNICAMP]

Felippe Bevilacqua Prado [FOP-UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Rossi (orientadora) [FOP-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

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). Estudos com ratos mostraram que, de acordo com sua dieta, estes poderiam possuir uma menor carga e rigidez óssea máxima (Yamanaka et al., 2018). Trabalhos anteriores mostraram que ratos em crescimento que tinham em sua dieta a cafeína possuíam diminuição da mineralização da matriz de suas tíbias. A cafeína causou reduções significativas na produção da matriz extracelular, mineralização e atividade da fosfatase alcalina, acompanhada de diminuição na expressão gênica das proteínas da matriz específica da cartilagem, como agrecano, colágeno tipo II e tipo X (Choi et al., 2017). Ainda se faz necessário estudos que avaliem a influência da cafeína na densidade de trabéculas ósseas após a fase do reparo ósseo alveolar. Sobre o reparo alveolar, há um trabalho realizado em 2015 que mostrou que a 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). Contudo, não há estudos que mostram o impacto do consumo de café diário na arquitetura das trabéculas ósseas e sua densidade e como ocorre a osteogênese após o reparo.

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.

No presente trabalho, por meio de marcadores de fluorocromo analisamos o impacto na osteogênese após o reparo, uma vez que os estudos clínicos apresentam resultados conflitantes em relação ao metabolismo do cálcio, já que este mineral está diretamente ligado a mineralização da matriz óssea.

METODOLOGIA:

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.

Amostra

Foram utilizados 8 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. Foram mantidos no biotério da FOP/UNICAMP em gaiola coletiva (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 dois grupos para os experimentos:

- 1) grupo controle (n=4) ;
- 2) grupo café (n=4) .

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. Essa quantidade de café ingerida pelos animais foi decidida com base no estudo de Macedo et al, 2015 que estudou os

efeitos da ingestão de café e cafeína intraperitoneal no processo de reparo ósseo e que se baseou no consumo humano por dia por uma pessoa pesando 60 kg.

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).

Eutanásia

A morte dos animais foi realizada no dia 28, sendo o dia zero o dia da exodontia, 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 e Análise de Fluorescência

Logo após a eutanásia, os ratos de todos os grupos, tiveram sua maxila direita e separadas ao meio. As peças foram fixadas em formol a 10%. As peças foram colocadas na máquina de histotécnico para desidratação (sequência de álcoois), diafanização (com xilol), infiltração e inclusão em Parafina - Paraplast® (Embedding Media, McCormick Scientific, EUA). Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo Lupetec MRP03 (Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório LTDA – ME, São Carlos-SP) em cortes com 5 µm de espessura e montados em lâminas.

Para análise de microscopia de fluorescência no alvéolo do incisivo superior direito as imagens foram obtidas usando combinações apropriadas de excitação e filtros. As imagens das lâminas foram capturadas em microscópio óptico de luz (Leica TCS SP5, Heerbrugg, Switzerland)

Análise estatística

Os dados da taxa de aposição de minerais foram avaliados no teste de Mann Whitney (bicaudal). Os dados da área óssea foram analisados com análise de variância de duas vias (ANOVA). Resultados significativos foram avaliados estatisticamente com o teste de comparações múltiplas de Sidak. Todos os testes apresentaram nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico GraphPADPrismv.8 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a taxa de aposição de minerais (teste de Mann Whitney, $P = 0,7756$) (Figura 1)

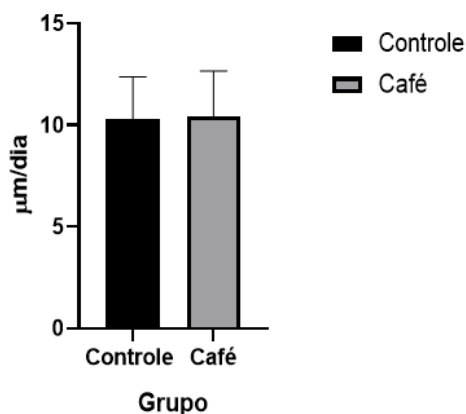


Figura 1. Taxa de aposição mineral óssea em cada grupo. $P=0.7756$ (Teste Mann Whitney).

Os dados foram analisados com ANOVA two-way para comparar as diferenças entre os grupos (controle e café) e fluorocromos (calceína e alizarina). A interação entre os grupos não foi estatisticamente significativa, enquanto a interação entre os fluorocromos foi ($P < 0,0001$). A análise intragrupo mostrou diferença estatisticamente significativa entre os fluorocromos injetados

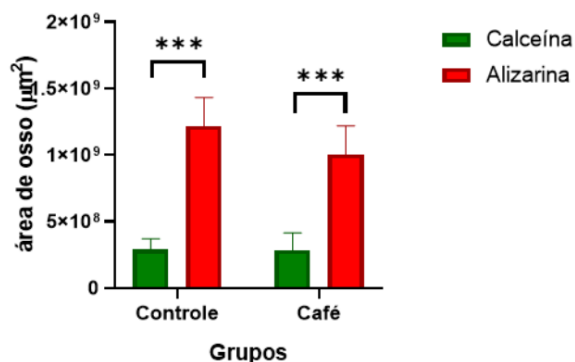


Figura 2. Área de osso alveolar avaliada nos grupos $P < 0.0001$ (ANOVA Two-way)*
Indicam a diferença intra-grupo.

14 dias (calceína) e 28 dias (alizarina) após a exodontia (teste de Tukey $P < 0,0001$) (Figura 2). No grupo do café, houve tendência de diminuição da alizarina.

CONCLUSÕES:

Em conclusão, o efeito da ingestão de café sobre a dinâmica óssea alveolar após a extração dentária foi verificada uma tendência de haver diminuição do osso renovado no grupo que bebeu café.

BIBLIOGRAFIA

Alves MCR, Okamoto T. **Influence of stress on the dental extraction wound healing.**

Histological study in rats. Rev. Odonto. Unesp, São Paulo, 18: 119-130, 1989.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. **Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.** J Bone Miner Res. 2010;25(7):1468–1486. doi:10.1002/jbmr.141

Bresin UMA, Kiliaridis S, Estrito KG. **Efeito da função mastigatória na estrutura óssea interna da mandíbula do rato em crescimento,** Revista Europeia de Ciências Orais, 1999 vol. 107 (pág. 35-44)