

“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 foi 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). Sobre a cafeína na dieta e 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.

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, o objetivo foi descrever a influência do café na osteogênese do reparo ósseo alveolar em ratos Wistar por meio da avaliação de marcadores de Fluorocromo e densidade mineral 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 xilazina (5-13 mg/kg), por via intraperitoneal. Uma vez verificada a sedação e os sinais de anestesia, foi realizada a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e em seguida, foi realizado 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).

Injeção de Fluorocromos

Em ambos os grupos, controle e experimental, 2 µg/kg do peso animal de calceína verde intravenosa foi administrada (Sigma Chemical Co St Louis Mo, EUA) aos 14 dias a partir do dia de extração foi realizado. Em ambos os grupos, 2,5 µg/kg do peso animal de alizarina vermelha intravenosa foi administrada (Sigma Chemical Co St Louis Mo, EUA).

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). Após a desidratação, as peças foram imersas em solução de metilmetacrilato (Classic, Classic Dental Articles, São Paulo, SP, Brasil) em três banhos para fixar as peças. O catalisador utilizado foi o peróxido de benzoíla (1%, Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover, Alemanha). Após a polimerização, os blocos de resina foram cortados no plano sagital com uso de um disco de carborundum montado em baixa rotação. As partes foram lixadas com lixas de diferentes granulações até chegar na espessura de 08 µm.

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 confocal a laser (Leica TCS SP5, Heerbrugg, Switzerland). Foram avaliados a área de osso (µm²) e a taxa de aposição mineral no Software ImageJ (Processing Software and Image Analyses, Ontario, Canada).

Avaliação por meio da Micro CT

Os espécimes de cada grupo foram submetidos a micro tomografia computadorizada em um microtomógrafo (Skyscan 1174) com voltagem de 50 kV, amperagem de 800 mA.

Após obtenção das imagens, as mesmas foram reconstruídas tridimensionalmente e o alvéolo direito em cada espécime foi selecionado como região de interesse. As medidas para obtenção da densidade mineral óssea (DMO) foram obtidas no Software CT-Analyzer (Skyscan, Leuven, Bélgica).

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 GraphPAD Prism v.8 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Fluorocromos:

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

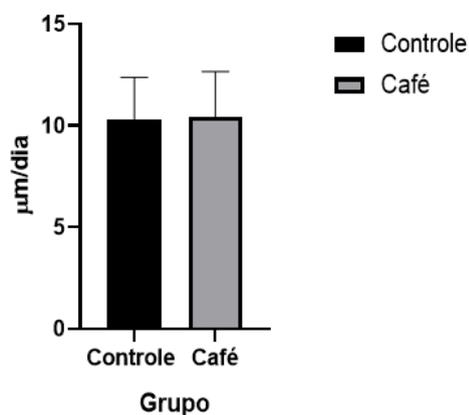
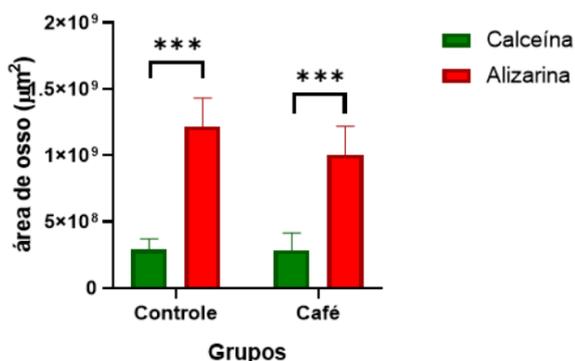


Figura 1. Taxa de aposição mineral óssea em cada grupo. $P=0.7756$ (Teste Mann Whitney).

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.

Micro CT:

As médias da densidade mineral óssea foram obtidas. No grupo que ingeriu café, a média foi de $1,8352 \text{ g/cm}^3$. No grupo que ingeriu água (controle) a média foi de $1,5732 \text{ g/cm}^3$.

A diminuição da alizarina no grupo café mostrou que o impacto do café no metabolismo do cálcio gera essa tendência de diminuir a mineralização no reparo alveolar. No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a taxa de aposição mineral e nem para densidade mineral óssea. Apesar disso, o grupo café apresentou uma tendência de diminuição da alizarina, ou seja, o osso jovem é reduzido.

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

DEMLING RH. **Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. Eplasty.** 2009;9:e9. Epub 2009 Feb 3

YAMANAKA JS. **A high-fat diet can affect bone healing in growing rats. J Bone Miner Metab.** 2018 May;36(3):255-263.

MACEDO RM. **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

RAMALHO-FERREIRA G. **Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis.** J Biomed Opt. 2015 Mar;20(3):038003.

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.