

INFLUÊNCIA DO CONSUMO DIÁRIO DE ALTAS DOSES CAFEÍNA NA DENSIDADE ÓSSEA ALVEOLAR DE RATOS: UM ESTUDO HISTOMÉTRICO

EFFECT OF INTAKE OF HIGH DOSES OF CAFFEINE ON ALVEOLAR BONE DENSITY IN RATS: A HISTOMETRIC STUDY

Bezerra JP*, Bastos MF**, da Silva LRF***, Duarte PM****

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de uma análise histométrica, o efeito do consumo crônico de altas doses de cafeína na densidade óssea alveolar de ratos. Vinte e quatro ratos Wistar foram aleatoriamente divididos em um dos grupos experimentais: teste (n=12): administração diária de água com cafeína (10mg/100g corpórea/dia) durante 56 dias; controle (n=12): administração diária de água sem cafeína durante 56 dias. Cinquenta e seis dias após o início da ingestão de cafeína, os animais foram mortos e as mandíbulas removidas para obtenção de cortes histológicos descalcificados. A densidade óssea inter-radicular do primeiro molar inferior foi analisada por meio de histometria. A densidade óssea para o grupo que ingeriu cafeína ($81 \pm 5,8\%$) foi estatisticamente inferior ao grupo controle ($83,4 \pm 6,7\%$) ($p < 0,05$). Em conclusão, o presente estudo em ratos demonstrou que a ingestão diária de altas doses de cafeína pode exercer uma influência negativa na densidade óssea alveolar.

PALAVRAS-CHAVE: Osso alveolar. Cafeína. Histometria.

ABSTRACT: The objective present study was to evaluate, by histometric analysis, the effect of high doses of caffeine on alveolar bone density in rats. Twenty-four Wistar rats were divided into one of the following groups: Test (n=12): rats with 10mg/100g body weight/day of caffeine via drinking water for 56 days. Control (n=12): rats without caffeine ingestion. Fifty-six days after the beginning of caffeine ingestion, the animals were killed and the specimens processed in order to obtain decalcified sections. The bone density in the furcation area of the first molars was evaluated histometrically. Bone density was lower for caffeine group ($81 \pm 5.8\%$) when compared to non-caffeine group ($83.4 \pm 6.7\%$) ($p < 0.05$). In conclusion, the present study demonstrated that daily intake of high doses of caffeine may have a negative influence on alveolar bone density.

KEYWORDS: Alveolar bone. Caffeine. Histometry.

INTRODUÇÃO

Tem sido demonstrado que diversos fatores como o consumo de tabaco, baixo peso corpóreo, deficiência de estrógeno, alcoolismo e consumo inadequado de cálcio podem influenciar a densidade do tecido ósseo e aumentar a incidência de osteoporose nos ossos esqueléticos e orais¹⁻⁶. Neste contexto, a influência dos fatores sistêmicos no osso alveolar tem sido recentemente investigada devido sua grande importância na odontologia, principalmente nas reabilitações protéticas, implantodontia e periodontia.

A cafeína é uma das substâncias psicoativas mais consumidas em nossa sociedade, sendo o componente principal do café e de alguns chás. A mesma tem sido ainda incorporada também em outros alimentos como sorvete, iogurte, suco de laranja e medicamentos. Embora controverso, o consumo exagerado de cafeína tem sido considerado um possível fator de risco para

diminuição da densidade óssea e provável aumento de fratura em casos osteoporose^{7,8}. O mecanismo celular e molecular pelo qual a cafeína altera o metabolismo ósseo ainda não está bem esclarecido⁹. Heaney e Recker¹⁰ demonstraram um efeito deletério no metabolismo de cálcio em mulheres na pré-menopausa que ingeriam cafeína diariamente. Glajchen et al.¹¹ não encontraram alterações ósseas após análise histométrica na tíbia de ratos que receberam cafeína, mas demonstraram aumento do processo de remodelação óssea pelo aumento nos níveis de osteocalcina nestes animais. Mais tarde, Wink et al.¹² relataram que a ingestão de cafeína resulta na interrupção da atividade mitocondrial de osteoblastos e osteoclastos de ratos neonatos. Recentemente, Tsuang et al.¹³ demonstraram que a cafeína *in vitro* apresenta um efeito deletério para a viabilidade de osteoblastos, induzindo apoptose destas células.

Após levantamento bibliográfico, foi observado que não existe na literatura informações sobre a influência do

* Joyce Pinho Bezerra, Mestre em Odontologia, Aluna de doutorado em Odontologia, Universidade Guarulhos; e-mail: joyce_bezerracd@hotmail.com

** Marta Ferreira Bastos, Professora Assistente do Curso de Pós-Graduação da UnG, Mestre e Doutora em Ciências Biológicas; e-mail: mfbastos@prof.ung.br

*** Luis Ricardo Ferreira da Silva, Cirurgião-dentista, Universidade Guarulhos; e-mail: ricopl22@hotmail.com

**** Poliana Mendes Duarte, Professora Adjunta do Curso de Pós-Graduação da UnG, Mestre e Doutora em Clínica Odontológica - Área de Concentração em Periodontia; e-mail: poliduarte@yahoo.com

consumo crônico de altas doses de cafeína no osso alveolar. A identificação e o isolamento dos fatores de confundimento permanece como um grande desafio para os estudos clínicos que visam avaliar a influência de um fator específico no metabolismo ósseo. Desta forma, os estudos em animais podem oferecer a vantagem de avaliar a influência de um determinado fator isoladamente, sem o efeito de outros possíveis fatores de risco. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de uma análise histométrica, o efeito do consumo diário de altas doses de cafeína na densidade óssea alveolar de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Vinte e quatro (24) ratos machos Wistar ($\pm 300g$) com 90 dias foram incluídos neste estudo. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas plásticas com água e comida *ad libitum*. Antes do início do experimento os animais foram aclimatizados no ambiente do Biotério de Biociências da Universidade Guarulhos por 5 dias. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Estudos Experimentais da Universidade Guarulhos.

Delineamento do estudo

Os animais foram aleatoriamente divididos em um dos seguintes grupos experimentais:

Grupo teste (n=12): consumo diário de cafeína (10 mg/100g de peso corpóreo/dia) diluída em água por 56 dias;

Grupo controle (n=12): consumo diário de água sem cafeína por 56 dias.

Conforme descrito, os animais foram mantidos sozinhos em gaiolas plásticas, o que permitiu um controle efetivo da dose de cafeína ingerida. A concentração de cafeína foi ajustada a cada 2 dias para compensar o volume não ingerido no dia anterior e o peso dos animais no decorrer do experimento.

Preparo histológico e análise histométrica

Após 56 dias, os animais foram mortos na câmara de CO₂. As mandíbulas foram removidas e seccionadas em blocos contendo os molares esquerdos. Os espécimes foram colocados em formol neutro tamponado a 4% por 48 horas. Após o processo de fixação e posterior lavagem em água destilada, os espécimes foram descalcificados em uma solução de EDTA por 45 dias. Em seguida, os mesmos foram desidratados em uma série de solução de álcool etílico (60-100%) sob constante agitação. As peças foram então diafanizadas em xilol, infiltradas com parafina e incluídas em blocos de parafina. Secções de cerca de 6 μ m de espessura foram obtidas desses blocos, coradas por hematoxilina e eosina (H&E) e digitalizadas para posterior avaliação histométrica. A figura 1 representa um corte histológico obtido de um animal do grupo teste.



Figura 1: Corte histológico obtido de um animal do grupo teste.

Por meio de um programa de análise de imagens (Image-Pro®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), as densidades do osso interradicular do primeiro molar inferior esquerdo foram obtidas de 5 imagens previamente selecionadas por corte histológico. O examinador desconhecia o grupo ao qual a imagem pertencia. A densidade óssea foi avaliada com o auxílio de um retículo quadriculado sobre o qual foi feita a contagem dos pontos coincidentes com osso na região a ser avaliada (Figura 2). Os valores foram expressos em porcentagem, considerando a quantidade de pontos totais da região delimitada em relação à quantidade de pontos coincidentes com osso [densidade óssea = (número de pontos coincidentes com osso/ número de pontos totais) x 100].

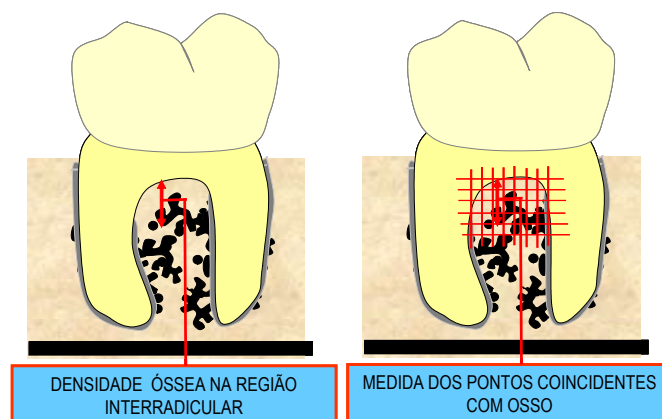


Figura 2: Ilustração da região a ser avaliada e simulação do sistema de contagem de pontos coincidentes com osso por meio da sobreposição de um retículo quadriculado.

Análise estatística

Inicialmente, uma média da densidade óssea das 5 secções avaliadas foi obtida, obtendo-se um resultado final para cada animal e para cada grupo (com e sem ingestão de cafeína). A hipótese de que a administração de cafeína não influencia a densidade óssea alveolar foi testada por meio do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

RESULTADOS

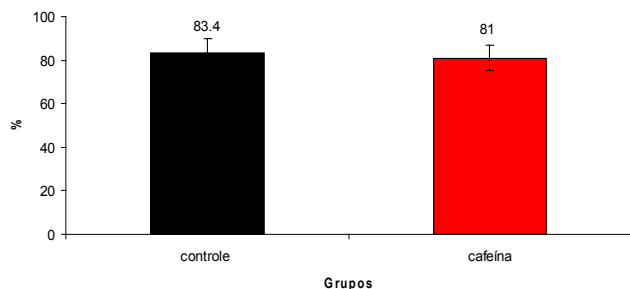
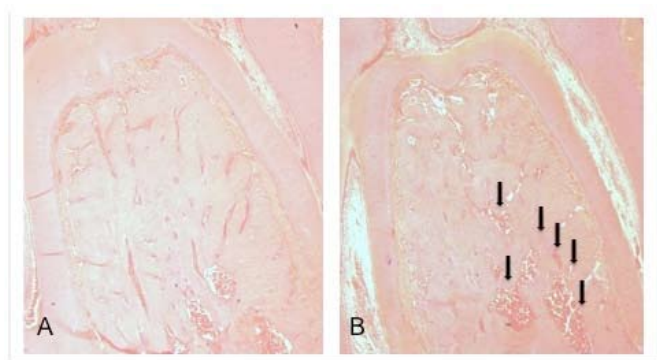


Figura 3: Densidade óssea (%) inter-radicular do grupo teste (com ingestão de cafeína) e controle (sem ingestão de cafeína).

A figura 3 representa a densidade óssea inter-radicular do grupo teste (com ingestão de cafeína) e controle (sem ingestão de cafeína). A densidade óssea para o grupo que ingeriu cafeína ($81,0 \pm 5,8\%$) foi estatisticamente inferior ao grupo controle ($83,4 \pm 6,7\%$) ($p=0,0369$). A figura 4 ilustra os resultados histológicos de um animal do grupo controle (A) e do grupo teste (B), respectivamente. Os espaços medulares apresentaram-se mais amplos no grupo teste quando comparado ao grupo controle, o que resultou em uma densidade menor no grupo que ingeriu cafeína.



Figuras 4: A- Fotomicrografia de um molar inferior esquerdo de um animal do grupo controle, que não ingeriu cafeína.
 B- Fotomicrografia de um molar inferior esquerdo de um animal do grupo teste, que ingeriu cafeína por 56 dias.
 Observe os espaços medulares mais amplos apontados pela seta na figura B (cafeína).

DISCUSSÃO

Algumas investigações científicas utilizando modelos clínicos, em animais e *in vitro* foram previamente realizadas com objetivo de avaliar o impacto do consumo de cafeína e/ou café no metabolismo ósseo, gerando resultados controversos¹³⁻¹⁹. Embora alguns estudos tenham reportado uma influência negativa da cafeína no metabolismo ósseo, o foco do presente estudo foi verificar o efeito da mesma especialmente no osso alveolar, que apresenta grande importância em odontologia.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que a ingestão diária de cafeína pode diminuir a densidade do osso alveolar na região inter-radicular. Até o presente momento, não existem estudos clínicos e em animais que avaliaram a relação entre consumo de cafeína e a densidade óssea alveolar, dificultando uma comparação mais direta com os presentes dados. Os exatos mecanismos pelos quais a cafeína afeta o metabolismo ósseo ainda não estão totalmente esclarecidos, embora algumas hipóteses tenham sido levantadas. Kamagata-Kiyoura et al.²⁰ e Rapuri et al.¹⁹ demonstraram que a cafeína inibe a proliferação de osteoblastos e apresenta efeitos deletérios na viabilidade destas células, aumentando a taxa de apoptose. Além disso, em nível molecular, a cafeína diminuiu a expressão do receptor de vitamina D (VDR) em células-tipo osteoblastos, o que poderia ser um possível mecanismo do efeito deste agente no tecido ósseo. Em ratos, altas doses de cafeína foram relacionadas com o aumento do remodelamento ósseo, avaliado pelos níveis de osteocalcina sérica¹¹. Além disso, a mesma foi associada com a redução de conteúdo mineral ósseo em animais¹⁵⁻¹⁶. Alguns estudos demonstraram que o consumo de cafeína não apresenta nenhuma associação com perda óssea em mulheres jovens²¹, mas pode exercer uma influência negativa na densidade óssea em mulheres idosas¹⁴⁻¹⁶. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de ingestão crônica de cafeína aumentar a excreção de cálcio na urina e, a eficiência de absorção de cálcio intestinal diminuir com idade, conduzindo ao desequilíbrio de cálcio em idosas²²⁻²⁵.

No presente estudo, o ajuste de dosagem de cafeína e sua administração diária na água dos animais foram realizados para simular um consumo crônico de cafeína em humanos. A alta dose de cafeína usada neste trabalho está de acordo com outros estudos que também avaliaram o efeito de cafeína no tecido ósseo^{11,13,18}. O total de cafeína que foi diariamente administrado em nosso estudo ($10\text{mg}/100\text{g}$ peso corpóreo) foi equivalente a $1360\text{mg}/70\text{kg}$,₇₅ em humanos, quando a conversão foi ajustada para o peso corpóreo metabólico (kg ,₇₅). Como a quantidade média de cafeína em um café é $85\text{mg}/\text{xícara}$, a dosagem usada neste estudo foi equivalente ao consumo de 16 xícaras de café por dia.

Estudos clínicos que avaliem os efeitos da cafeína no metabolismo ósseo se deparam com vários fatores de confundimento, que podem ser contornados pelos estudos em animais. Primeiramente, é problemático determinar o nível de ingestão diária de cafeína, devido à variação da sua quantidade nos produtos comerciais (por exemplo, cafés, chás e refrigerantes). Além disso, é necessário que o próprio paciente relate adequadamente os produtos contendo cafeína ingeridos diariamente. Adicionalmente, muitas vezes, o consumo de cafeína ocorre em conjunto com outros fatores de risco para perda óssea como consumo de cigarros, álcool e osteoporose. Um exemplo clássico é a tendência dos fumantes consumirem mais cafeína quando comparados aos não-fumantes²⁶⁻²⁷.

Os achados do presente estudo sobre a influência da cafeína no osso alveolar é bastante relevante do ponto de vista odontológico em relação às doenças periodontais e reabilitações protéticas e por implantes. Futuras investigações utilizando outras doses e frequências de ingestão de cafeína devem ser conduzidas para confirmar e complementar os achados do presente estudo.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a ingestão diária de altas doses de cafeína exerce uma influência negativa na densidade óssea alveolar de ratos.

REFERÊNCIAS

- Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. [Clin Orthop. 2004;\(425\):126-34.](#)
- Heinemann DF. Osteoporosis. An overview of the National Osteoporosis Foundation clinical practice guide. [Geriatrics. 2000;55\(5\):31-6.](#)
- Kribbs PJ, Chesnut CH 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. [J Prosthet Dent. 1989;62\(6\):703-7.](#)
- Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Dunning DG, Patil KD. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. [J Clin Periodontol. 2000;27\(9\):658-64.](#)
- Rapuri PB, Gallacher JC, Balhorn KE, Ryschon KL. Smoking and bone metabolism in elderly women. [Bone. 2000;27\(3\):429-36.](#)
- Lau GC, Luck JV Jr, Marshall GJ, Griffith G: The effect of cigarette smoking on fracture healing: An animal model. *Clin Res.* 1989;37:132.
- Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PWF. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. [Am J Epidemiol. 1990;132:675-84.](#)
- Lloyd T, Rollings N, Egli DF, Kieselhorst K, Chinchilli VM. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. [Am J Clin Nutr. 1997;65:1826-30.](#)
- Barrone JJ, Grice HC. Seventh International Caffeine Workshop, Santorini, Greece 13-17 June 1993. [Food Chem Toxicol 1994;32:65-77.](#)
- Heaney RP, Recker RR. Effect of nitrogen, phosphorous and caffeine on calcium balance in women. [J Lab Clin Med. 1982;99:46-55.](#)
- Glajchen N, Ismail F, Epstein S, Jowell PS, Fallow M. The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. [Calcif Tissue Int. 1988;43:277-80.](#)
- Wink CS, Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. [Anat Ret. 1996;246:30-8.](#)
- Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. [J Orthop Surg. 2006;7:1-7.](#)
- Cooper C, Atkinson EJ, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL, Judd HL, et al. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? [J Bone Miner Res. 1992;7: 465-71.](#)
- Chen X, Whitford GM. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. [Arch Oral Biol. 1999;44:33-9.](#)
- Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. [Am J Clin Nutr. 2001;74:694-700.](#)
- Rico H, Canal ML, Mañas P, Lavado JM, Costa C, Pedrera JD. Effects of caffeine, vitamin D, and other nutrients on quantitative phalangeal bone ultrasound in postmenopausal women. [Nutrition. 2002;18:189-93.](#)
- Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. [Bone. 2002;30:293-9.](#)
- Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)2D3 stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. [J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;103:368-71.](#)
- Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). [J Periodontol. 1999;70:283-8.](#)

21. Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? [Prev Med. 2000;1:562-8.](#)
22. Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. [J Nutr. 1993;123:1611-14.](#)
23. Ambrecht HJ, Zenser TV, Bruns ME, Davis BB. Effect of age on intestinal calcium absorption and adaptation to dietary calcium. [Am J Physiol. 1979;236: 769-74.](#)
24. Avioli LV, McDonald JE, Lee SW. The influence of age on the intestinal absorption of ⁴⁷Ca absorption in post-menopausal osteoporosis. [J Clin Invest. 1965;44\(12\):1960-7.](#)
25. Yeh JK, Aloia JF, Semla HM, Chen SY. Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. [J Nutr. 1986;116:273-80.](#)
26. Klesges RC, Ray JW, Klesges LM. Caffeinated coffee and tea intake and its relationship to cigarette smoking: an analysis of the Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANESII). [J Subst Abuse. 1994;6:407-18.](#)
27. Talcott GW, Poston WS 2nd, Haddock CK. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and caffeine in a retired military population. [Mil Med. 1998;163:133-38.](#)