UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ROGER RODRIGO FERNANDES

**Efeito da administração *in vitro* de cafeína em diferentes concentrações no
metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas
osteoporóticas**

RIBEIRÃO PRETO

2017

ROGER RODRIGO FERNANDES

**Efeito da administração *in vitro* de cafeína em diferentes concentrações no
metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas
osteoporóticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Karina Fittipaldi
Bombonato Prado

RIBEIRÃO PRETO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Fernandes, Roger Rodrigo.

Efeito da administração *in vitro* de cafeína em diferentes concentrações no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas osteoporóticas. Ribeirão Preto - 2017.

74 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Bombonato-Prado, Karina Fittipaldi.

1. Cafeína. 2. Osteoporose pós-menopausa. 3. Ovariectomia. 4. Células cultivadas. 5. Osteoblastos

Fernandes, R. R. **Efeito da administração *in vitro* de cafeína em diferentes concentrações no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas osteoporóticas.** 2017. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica; Biologia Molecular e LAB 3D BIO do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Aos meus pais **José Olívio Fernandes** (*in memoriam*) e **Nadir Martins Fernandes**, que mesmo com poucos recursos me deram a base para seguir e não esmorecer frente aos percalços da vida.

A minha esposa **Fernanda Grilo de Azevedo Fernandes**, que sempre acreditou que eu seria capaz de realizar esta pesquisa, pela paciência desde o início até o final deste trabalho, sempre com uma palavra de carinho, incentivo e até mesmo puxões de orelha, por dar sentido à minha vida, me tornando uma pessoa melhor a cada dia e por me dar o maior presente que eu poderia merecer, o de ser pai. Espero ansioso pela chegada de nosso pequeno **Lorenzo**! Por estar sempre ao meu lado nesta caminhada, enfrentando as dificuldades que passaram e as que virão, só tenho que dizer muito obrigado por tudo!

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, por ter acreditado e confiado em mim para realização desta pesquisa, pela ajuda diária ao longo de tantos anos, pela grande troca de conhecimento profissional, por me apoiar e sempre ajudar para que eu possa crescer profissionalmente, por ser uma pessoa generosa a qual antes de orientadora tenho o prazer de chamá-la de amiga e que essa amizade perdure e aumente até o término de nossa existência, muito obrigado.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/FORP-USP.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/FORP-USP.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, pelo incentivo e cobranças, mas principalmente pelas conversas, sempre me direcionando e mostrando o caminho correto a seguir.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pela amizade construída ao longo do tempo e por estar sempre presente na minha trajetória de vida, me ensinando desde 2001 as técnicas de cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, que se refere a mim como “meu irmão branco”, sendo a recíproca verdadeira, pela amizade de longa data e pelos ensinamentos diários, sempre com uma informação nova ou um inquirimento a ser feito e discutido.

A Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, pessoa de uma generosidade inigualável com quem sempre tenho algo novo a aprender, seja em ensinamentos profissionais ou de vida, que para mim são muito importantes; poder compartilhar de sua amizade não tem preço.

A Profa. Dra. Selma Siéssere pela amizade, preocupação e inestimado apoio com a metodologia de ovariectomia utilizada neste trabalho.

A Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo, pelos conselhos, incentivo, sempre com uma palavra amiga, dando ânimo para continuidade deste estudo.

A todos professores pertencentes ao programa de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Ao especialista de laboratório e acima de tudo amigo Luiz Gustavo de Sousa, pelo auxílio, dedicação, preocupação, ensinamentos e imprescindível ajuda durante a realização desta pesquisa junto às cirurgias, manejo e cuidados com os animais utilizados, seu apoio foi de fundamental importância para realização deste trabalho.

A técnica de laboratório Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, pela preciosa ajuda com as análises microtomográficas, companheira do curso de pós-graduação e amiga de longa data.

A técnica de laboratório e colega do curso de mestrado Milla Sprone Tavares Ricoldi, pela ajuda, disposição e valiosa explicação junto às análises de expressão gênica.

A Ana Luisa Riul Sório, pelo auxílio durante a realização dos experimentos, sempre ajudando e querendo aprender, uma grande profissional e amiga.

A Paula Katherine Vargas Sanchez, pelo convívio alegre durante a realização desta pesquisa e ajuda com os programas estatísticos.

Ao Alann Thaffarell Portilho de Souza, pessoa sempre disposta a ajudar no que for preciso, um grande companheiro no laboratório, tenho o prazer de compartilhar da sua amizade.

A Fabíola Singaretti de Oliveira e Emanuela Prado Ferraz, pela companhia diária e todos os momentos alegres vividos durante a realização deste trabalho.

A Larissa Sverzut Bellesini, pelo auxílio com os cálculos usados no trabalho; mesmo distante, uma grande amiga que posso contar.

À Imaculada Jainaira Miguel, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda essencial, sempre pronta para sanar qualquer dúvida relacionada ao programa, e foram muitas.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células: Gileade Pereira Freitas, Helena Bacha Lopes, Marcelo Francischini, Mayara Sgarbi Semeghini, Rodrigo Paolo Flores Abuna, Denise Weffort, Gustavo Oliveira, Yvana Murto, Maria Carolina Coelho, pela amizade, colaboração, companhia e auxílio durante todo o trabalho e por todos os alegres momentos vividos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A mudança é a lei da vida. E aqueles que apenas olham para o passado ou para o presente irão com certeza perder o futuro.”

John F. Kennedy

RESUMO

FERNANDES, Roger Rodrigo. **Efeito da administração *in vitro* de cafeína em diferentes concentrações no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas osteoporóticas**. 2017. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A causa mais comum da osteoporose é o declínio do hormônio sexual feminino, o estrógeno, que ocorre após a menopausa. Esse hormônio regula a produção de citocinas que influenciam a proliferação dos osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea. Os efeitos da cafeína no metabolismo ósseo são controversos e podem estar associados ao aumento significativo de doenças periodontais, fraturas, aumento do cálcio urinário e redução da densidade mineral óssea, por exercer efeitos inibidores sobre as funções dos osteoblastos. O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de cafeína no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas osteoporóticas. Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, ratas Wistar foram divididas em dois grupos experimentais: controle (C) e submetidas à ovariectomia (OVX). Após 60 dias da cirurgia, as ratas foram sacrificadas para coleta dos fêmures e das células mesenquimais da medula óssea, que foram induzidas à diferenciação em osteoblastos com meio osteogênico com três concentrações de cafeína (1, 3 e 5 mM – grupos OVX₁, OVX₃ e OVX₅) e cultivadas em placas de 24 poços (n = 5) para avaliação da proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) bioquímica e *in situ*, detecção e quantificação de nódulos mineralizados e análise da expressão de genes relacionados à atividade osteoblástica através de PCR em tempo real. Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por meio do software estatístico GraphPad Prism, com nível de significância fixado em 5%. A proliferação celular foi menor nos grupos osteoporóticos com adição de cafeína, tendo a menor queda o grupo com adição de 1mM. O método bioquímico de ALP não foi significativo nos períodos analisados, entretanto, aos 10 e 14 dias, a atividade aumentou quando a concentração de cafeína era maior. Já na atividade de ALP *in situ*, o grupo OVX₁ foi o que apresentou melhor resultado nos períodos avaliados (p < 0,05), com pico aos 14 dias. A quantificação de matriz mineralizada foi maior no grupo OVX comparado ao grupo C; entre as concentrações, a maior quantificação dos nódulos de cálcio se deu no grupo com 1mM de cafeína. Os resultados obtidos no PCR mostraram que o gene para fosfatase alcalina teve maior expressão no grupo OVX, seguido do grupo OVX₁ aos 7 e 10 dias; a expressão gênica de osteocalcina foi maior para o grupo OVX₁ aos 10 e 14 dias e esse grupo apresentou a maior expressão em todos os períodos para os genes Runx2 e RankL. No caso do Bmp4, o grupo OVX₃ foi o mais expresso aos 10 e 14 dias. Os genes osteoprotegerina e osteopontina variaram sua expressão de acordo com o período e grupo avaliado. A expressão de osterix foi similar entre os grupos aos 7 e 10 dias, enquanto a expressão de Bsp, aos 7 e 14 dias, mostrou semelhança entre os grupos controle e OVX₁. Frente aos resultados obtidos, sugere-se que a concentração de 1mM de cafeína pareceu ser a menos prejudicial ao metabolismo das células osteoblásticas neste modelo experimental de osteoporose.

Palavras-Chave: Cafeína. Osteoporose pós-menopausa. Ovariectomia. Células cultivadas. Osteoblastos.

Abstract

ABSTRACT

FERNANDES, Roger Rodrigo. ***In vitro* evaluation of different caffeine concentrations in the metabolism of bone marrow osteoblastic cells from osteoporotic female rats.** 2017. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The most common cause of osteoporosis is the decrease of estrogen after menopause. This hormone regulates the production of cytokines that influence osteoclast proliferation, increasing bone resorption. The effects of caffeine in bone metabolism are controversial and may be associated to periodontal disease, bone fractures, increase of urinary calcium levels and reduction of mineral bone density due to inhibition of osteoblast activities. Thus, the goal of this investigation was to evaluate the *in vitro* effect of different caffeine concentrations in the metabolism of bone marrow osteoblastic cells from osteoporotic rats (OVX). After Ethical Committee approval, wistar female rats were divided in two experimental groups: control (C) and submitted to ovariectomy (OVX). After 60 days of surgery, femurs were removed to isolate bone marrow mesenchymal cells, which were induced to osteoblastic differentiation in osteogenic medium along with three different concentrations of caffeine (1, 3 and 5 mM –OVX₁, OVX₃ e OVX₅ respectively) and posteriorly seeded in 24-well plates (n = 5) to evaluate cell proliferation, alkaline phosphatase activity and its *in situ* detection, detection and quantification of mineralized nodules as well as assess quantitative expression of genes associated to osteoblastic activity by means of real time PCR. All the experiments were performed in triplicate and analyzed by means of the statistical software GraphPad Prism for p<0.05. Cell proliferation was diminished in the all osteoporotic groups that received caffeine, with group OVX₁ being the less affected. Biochemical assay of ALP activity did not show differences among the groups in the periods analyzed; nevertheless there was a tendency to a higher activity proportional to the higher concentration of caffeine. The *in situ* detection of ALP showed better results in group OVX₁ after 14 days of culture. Mineralized matrix quantification was higher in OVX groups when compared to control group; among the concentrations, the higher quantification of calcium nodules was in group OVX₁. The results obtained with PCR showed that the gene for ALP had its highest expression in OVX group, followed by OVX₁ at 7 and 10 days; expression of osteocalcin was higher in OVX₁ after 10 and 14 days and this same group presented higher expression in all periods for genes Runx2 e Rankl. Analysis of Bmp4 gene showed that it was expressed in group OVX₃ after 10 and 14 days. The genes that code for osteoprotegerin and osteopontin had different expression values in accordance to the period and group evaluated. The expression of osterix was similar between the groups after 7 and 10 days, whereas the expression of Bsp was similar between control and OVX₁ groups after 7 and 14 days. The results suggest that the concentration of 1mM of caffeine is the most beneficial to the metabolism of osteoblastic cells in a model of osteoporosis.

Key words: Caffeine. Postmenopausal osteoporosis. Ovariectomy. Cell culture. Osteoblasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Animais utilizados	28
3.1.1	Protocolo de indução da osteoporose (OVX)	28
3.1.2	Grupo controle (sham) (C).....	31
3.2	Eutanásia dos animais e coleta de material	32
3.2.1	Cultura de células mesenquimais da medula óssea de ratas	32
3.3	Análise microtomográfica (micro-CT)	34
3.4	Administração <i>in vitro</i> da cafeína	34
3.5	Ensaio bioquímicos	34
3.5.1	Proliferação celular	34
3.5.2	Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina (ALP) ..	35
3.5.3	Detecção de fosfatase alcalina <i>in situ</i> por meio de <i>Fast Red</i>	36
3.5.4	Detecção e quantificação de matriz mineralizada	36
3.5.5	Análise da expressão gênica por reação em cadeia de polimerase em tempo real (<i>Real-time PCR</i>)	37
3.6	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Análise microtomográfica (micro-CT)	41
4.2	Proliferação celular	43
4.3	Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	44
4.4	Detecção de fosfatase alcalina <i>in situ</i> por meio de <i>Fast Red</i>	44
4.5	Detecção e quantificação de matriz mineralizada	46
4.6	Análise da expressão gênica por reação em cadeia de polimerase em tempo real (<i>Real-time PCR</i>)	47
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença metabólica comum caracterizada por perda de massa óssea e enfraquecimento de sua microarquitetura, levando à fragilidade e aumento do risco de fratura (Yamada et al., 2016). Estima-se que um a cada oito homens acima de 50 anos de idade terá uma fratura osteoporótica durante a vida e que 20-30% dessas fraturas ocorrem no quadril, aumentando a mortalidade desse grupo (Giusti e Bianchi, 2014).

Existem vários fatores de risco para a osteoporose como o sedentarismo, uso de medicamentos, baixo consumo de cálcio e vitamina D, alcoolismo, idade avançada, tabagismo e baixo peso corporal (Downey e Siegel, 2006; Sandhu e Hampson, 2011). No entanto, essa doença é classicamente reconhecida como um problema de saúde pública em mulheres, uma vez que a causa mais comum da osteoporose é a diminuição nos níveis de estrógeno. Este problema atinge uma em cada quatro mulheres na menopausa e, após os 65 anos, uma em cada três (Oliveira, 2002). Essas mulheres chegam a perder de 40 a 50% da massa óssea até o final da vida (Amadei et al., 2006).

Hormônios sexuais, como o estrógeno, desempenham papéis importantes tanto no crescimento como na manutenção da massa óssea (Horowitz, 1993). A deficiência de estrógeno resulta no aumento do processo de remodelação óssea, uma vez que interfere na atividade de outros hormônios e citocinas (Li et al., 2014).

Quando presente no organismo em níveis normais, o estrógeno pode reduzir o processo de reabsorção óssea por meio da regulação dos níveis séricos de alguns hormônios. Como exemplo, é conhecido que o estrógeno estimula a síntese de calcitonina, o que inibe diretamente a diferenciação dos osteoclastos e sua atividade, reduzindo o número dessas células e a concentração sérica de íons cálcio. Além disso, o estrógeno diminui a concentração de paratormônio no sangue, influenciando a homeostase de cálcio e fósforo (Gesty-Palmer e Luttrell, 2011).

A redução dos níveis de estrógeno pode alterar os níveis séricos de osteocalcina em mulheres na pós-menopausa (Li et al., 2014). A osteocalcina é secretada pelos osteoblastos e não é apenas um indicador *in vivo* da taxa de formação óssea, mas também um regulador positivo da mineralização desse tecido (Price, Parthemore e Deftos, 1980).

O estrógeno também regula a produção de citocinas que influenciam a atividade dos osteoclastos (Compston, 2001). Esse hormônio inibe a reabsorção óssea através da supressão da secreção de citocinas osteolíticas, tais como as interleucinas IL-1 e IL-6 por células da medula óssea e osteoblastos (Manolagas, 1995; Li et al., 2014). Essas interleucinas são reguladores positivos da atividade de osteoclastos e da reabsorção óssea (Edwards e Williams, 2010). As citocinas podem se cruzar para promover sinergicamente osteoclastogênese e reabsorção óssea. Por exemplo, IL-1, incluindo suas subunidades IL-1 α e IL-1 β , podem induzir os osteoblastos a secretarem IL-6, o que aumenta a reabsorção óssea (Kwan-Tat et al., 2004). O estrógeno e as interleucinas 1 β e 6 também regulam a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), promovendo a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos e estimulando a reabsorção óssea (Hayashi et al., 2005).

A relação entre deficiência hormonal, osteoporose e hábitos alimentares é bem estabelecida na literatura. Entretanto, a ingestão de cafeína e seus efeitos no metabolismo ósseo permanecem em debate.

O hábito de tomar café é muito comum nas Américas e na Europa, continentes com grande incidência de osteoporose (Costa et al., 2016). A cafeína, um dos principais constituintes do café, também está presente em chocolates, medicamentos e bebidas como chás, energéticos e refrigerantes (Conlisk e Galuska, 2000; Bastos et al., 2014). Esta substância tem uma variedade de respostas celulares e farmacológicas, produzindo efeitos biológicos antioxidantes, angiogênicos, antibióticos, anti-hipertensivos e anti-inflamatórios dependendo de sua concentração e dosagem (Sakamoto et al., 2001; Macedo, Brentegani e Lacerda, 2015).

Os efeitos tóxicos da cafeína no sistema nervoso central incluem agitação, rubor, calafrios, irritabilidade, alteração de consciência, rigidez muscular, convulsões, perda de apetite e fraqueza. Já os efeitos da cafeína no metabolismo do tecido ósseo têm sido estudados por vários grupos de pesquisa, mostrando resultados conflitantes (Muraro et al., 2016). Tassinari et al. (1991) mostraram que a cafeína tem efeito direto nos osteoblastos *in vitro* ao afetar a formação da matriz extracelular e reduzir sua mineralização.

Estudos em humanos observaram um aumento significativo de fraturas em pacientes que consumiam de 2 a 8 xícaras de café/dia (Lee et al., 2014) e aumento da excreção de cálcio na urina de mulheres que ingeriram, em média, 99,9mg

caféina/dia (Conlisk e Galuska, 2000). Além disso, o consumo contínuo de caféina (200-300mg/dia) exerceu efeitos negativos sobre a massa óssea de mulheres na pós-menopausa (Rapuri et al., 2001; Ilich et al., 2002). No entanto, nenhum efeito desfavorável relacionado à caféina foi observado em mulheres jovens, com ingestão regular de cálcio e níveis normais de estrógeno (Conlisk e Galuska, 2000).

Pesquisadores mostraram que a caféina provoca maior incidência de doenças periodontais (Bezerra et al., 2013), bem como o atraso no processo de reparação óssea em animais por exercer efeitos inibidores sobre as funções dos osteoblastos, visto que o estrógeno e a caféina regulam, inversamente, a expressão de fatores chave do metabolismo ósseo (Bastos et al., 2014). Estudos em ratas osteoporóticas mostraram que injeções intraperitoneais de 30mg/kg/dia de caféina em solução aquosa de 1,5% tem um efeito deletério adicional (Macedo, Brentegani e Lacerda, 2015).

Huang et al. (2002) e Tsuang et al. (2006) observaram que o uso da caféina (10mg/100g de peso corporal e 0,1 – 100mM de caféina, respectivamente) diminuiu a viabilidade dos osteoblastos originários da calvária de ratos, a formação de colônias positivas para fosfatase alcalina (ALP), assim como a formação de nódulos mineralizados. Bezerra et al. (2013) demonstraram que a deficiência de estrógeno associada à ingestão crônica de altas doses de caféina (10mg/100g peso corporal) comprometeram a cicatrização do defeito cirúrgico realizado em tíbias destes animais.

Apesar disso, alguns pesquisadores sugerem que bebidas cafeinadas podem oferecer benefícios à saúde, em parte, devido à presença do composto polifenol, um antioxidante natural que desempenha propriedades anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas (Gardner, Ruxton e Leeds, 2007; Ruxton, 2009). Lloyd et al. (1997) investigaram o efeito da ingestão de caféina diária e qualidade óssea em 138 mulheres saudáveis na pós-menopausa; elas foram divididas em três grupos de acordo com a quantidade de caféina ingerida (de zero a oito ou mais xícaras por dia) e não observaram quaisquer alterações ósseas nesta população do estudo. Outros investigadores também mostraram que a administração diária de 20mg de caféina por 4 semanas provocou aumento da densidade mineral óssea da tíbia de ratas ovariectomizadas (Folwarczna et al., 2013).

Sendo assim, a hipótese deste trabalho é a de que a caféina, utilizada nas concentrações de 1mM, 3mM e 5mM, possa influenciar a atividade funcional de

osteoblastos originários da medula óssea de ratas osteoporóticas, dependendo da concentração administrada *in vitro*. Este estudo pode trazer novas informações sobre a resposta celular na presença de cafeína em uma situação de osteoporose, auxiliando no direcionamento da ingestão correta desta substância por mulheres na pós-menopausa que apresentem algum nível de osteoporose.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de cafeína no metabolismo celular de osteoblastos diferenciados a partir de células mesenquimais da medula óssea de ratas osteoporóticas (modelo experimental confirmado por meio de parâmetros específicos estabelecidos por análise microtomográfica e apresentados na seção Resultados).

2.2 Objetivos específicos

Os parâmetros a serem analisados foram:

- proliferação celular;
- quantificação da atividade de fosfatase alcalina por meio de ensaio bioquímico;
- detecção *in situ* da atividade de fosfatase alcalina por meio da técnica de *Fast Red*;
- detecção e quantificação de nódulos mineralizados por meio de coloração com vermelho de alizarina;
- expressão quantitativa de genes associados ao metabolismo ósseo por meio de PCR em tempo real.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Utilizados

Antes do início dos experimentos o projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - 2015.1.876.58.1) (Anexo A).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo necessárias 18 ratas *Wistar*, divididas entre os grupos controle (sham) e ovariectomizado, com peso médio de 200g. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos em número de três animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre 23°C e 24°C e timer programado para doze horas de iluminação diária no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. As ratas receberam ração e água “*ad libitum*” e a limpeza das caixas com troca de maravalha foi realizada três vezes por semana.

3.1.1 Protocolo de indução da osteoporose (OVX)

Para a indução da osteoporose, os animais foram ovariectomizados bilateralmente. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo de Kalu (1991), conforme os passos a seguir:

1. Pesagem e anestesia: após obtenção do peso de cada animal, a anestesia foi realizada, via intramuscular, com a solução anestésica de xilazina (Dopaser, Hertape Calier S.A., Juatuba, MG, Brasil) e cetamina (Ketamina Agener, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na proporção de 10mg/Kg de xilazina e 75mg/Kg de cetamina, que atuam como sedativo e relaxante muscular e, anestésico geral, respectivamente.
2. Tricotomia e assepsia: realizadas nas regiões laterais do abdômen, utilizando álcool iodado como antisséptico nos locais da incisão.
3. Incisão: as incisões cutâneas foram bilaterais a fim de divulsionar o tecido muscular subjacente e expor os ovários para a excisão dos mesmos.

4. Sutura: realizada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho.

Durante a cirurgia, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% foi colocada sobre os olhos dos animais, prevenindo o ressecamento das córneas.

No pós-operatório, cada animal recebeu, via intramuscular, uma dose de 24.000UI/Kg do antibiótico penicilina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e outra dose de 1,1mg/Kg de anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina (Banamine Pet Injetável, Schering-Plough Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os animais operados permaneceram na caixa de polietileno, em observação constante, durante 60 dias.

Figura 1 - Ovariectomia realizada nas ratas do grupo induzido à osteoporose (OVX) ilustrando a incisão cirúrgica (A), exposição e remoção do ovário, respectivamente (B e C) e aspecto final após sutura (D).

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos.

Para a realização deste exame, foi introduzida, com o auxílio de um pipetador automático acoplado a uma ponteira pequena, uma dose de solução salina (cerca de 1mL) no interior da vagina da rata e rapidamente aspirada, tendo seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica (Figura 2).

Figura 2 - À esquerda, coleta do fluido vaginal de rata ovariectomizada. À direita, imagem do fluido vaginal colocado em lâmina para posterior análise microscópica.

De acordo com Hoar e Hickman (1975) e Marcondes, Bianchi e Tanno (2002) este procedimento possibilita investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo das ratas, que dura de 4 a 5 dias e é composto por 4 fases, que se caracterizam por um tipo celular predominante, bem como pelos níveis de hormônios sexuais presentes no animal:

- Fase metaestro: são observados leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes; aumento da secreção de estrógeno e primeiro pico de progesterona.
- Fase diestro: observam-se basicamente leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas; final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno.
- Fase proestro: o número de células epiteliais nucleadas aumenta enquanto os leucócitos praticamente desaparecem; pico de secreção de estrógeno e segundo pico de progesterona.

- Fase estro: são visualizadas, basicamente, células epiteliais queratinizadas da camada córnea; nível de estrógeno retorna aos valores basais.

Os animais ovariectomizados permaneceram na fase diestro (Figura 3), enquanto os animais do grupo controle não sofreram qualquer alteração no seu ciclo estral.

Figura 3 - Fotomicrografia do fluido vaginal não corado, com predominância de leucócitos, caracterizando a fase diestro do ciclo estral.

3.1.2 Grupo controle (*sham*) (C)

Os animais do grupo controle foram submetidos apenas ao estresse da cirurgia, tendo os ovários expostos ao ambiente e reposicionados, em seguida, no interior do abdômen. Como os animais do grupo OVX, estes receberam os mesmos cuidados pré e pós-cirúrgicos, incluindo as medicações, sendo observados, rotineiramente, por 60 dias.

Figura 4 - Rata do grupo controle. Cirurgia do grupo "sham" com exposição do ovário para posterior reposicionamento no interior do abdômen.

3.2 Eutanásia dos animais e coleta do material

Após 60 dias da cirurgia, as ratas foram eutanasiadas com dose anestésica na proporção de 10mg/Kg de xilazina e 75mg/Kg de cetamina seguida de decapitação e os fêmures removidos para posterior obtenção de células mesenquimais da medula óssea, realizando o cultivo celular, como descrito a seguir.

3.2.1 Cultura de células mesenquimais da medula óssea de ratas

O procedimento para obtenção de células-tronco mesenquimais da medula óssea foi realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP como descrito por Maniatopoulos, Sodek e Melcher (1988). Os fêmures removidos foram transportados ao laboratório em meio de transporte α - MEM (*Minimum Essential Medium – Alpha Medium* – Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 3 μ g/mL de fungizona (Gibco) e 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia (clorexidina a 2,5% e álcool 70° por 1 minuto cada). Posteriormente, realizou-se a remoção de tecidos moles restantes nos fêmures com uma lâmina de bisturi intercalada com a colocação dos mesmos em meio de transporte por 15 minutos (três vezes). As epífises foram removidas e a medula óssea extraída do fêmur por meio de irrigação da diáfise utilizando meio de cultura.

As células foram mantidas em frascos de 75cm² (Corning, Corning, NY, EUA) com meio não-osteogênico, contendo α -MEM (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco). Após atingirem subconfluência, as células foram liberadas enzimaticamente dos frascos de cultura pela adição de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1mM (Gibco), 1,3mg/mL de collagenase tipo II (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura para interromper a ação enzimática. Depois da centrifugação a 2000rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado celular, as células foram homogeneizadas em meio total suplementado para diferenciação osteogênica (MTS), contendo α -MEM (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Sigma), dexametasona 10⁻⁷M (Sigma), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma), 7mM de β -glicerofosfato (Sigma), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco). Uma alíquota de 100 μ L desta solução foi adicionada ao mesmo volume de corante azul de tripan 0,1% (Sigma) para contagem celular por meio de um contador de células automático (*Countess automated cell countertm*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As culturas celulares foram divididas em cinco grupos experimentais conforme tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais utilizados na pesquisa

Animais	Grupo experimental	Concentração de cafeína
Controle (C)	C	Sem adição de cafeína
Osteoporótico (OVX)	OVX	Sem adição de cafeína
	OVX ₁	1mM
	OVX ₃	3mM
	OVX ₅	5mM

As células foram cultivadas em MTS, na densidade de 2 x 10⁴ células por poço, em placas de cultura celular de 24 poços (Corning) (n=5) e incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar atmosférico. Durante o tempo de cultivo, as células foram observadas em microscópio de luz invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemanha) com troca dos meios de cultura a cada 3 ou 4 dias.

3.3 Análise microtomográfica (micro-CT)

Após a eutanásia dos animais, os fêmures foram removidos e fixados em uma solução de formaldeído a 10% tamponado (pH=7) para análise tomográfica. Para a aquisição das imagens, adotou-se uma resolução espacial de 9.9 μ m com o microtomógrafo SkyScan 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), com ajuste de 60kV de voltagem e corrente de 165 μ A.

O passo seguinte foi a reconstrução tridimensional das imagens e a determinação do volume de interesse (VOI), sendo este correspondente à região trabecular da distal do fêmur estendendo-se por 3mm. Para tal, foi adotada escala de cinza “threshold” de 255 (máximo) e 95 (mínimo) para avaliação do tecido ósseo trabecular. Os seguintes parâmetros estruturais foram avaliados: volume ósseo (mm³), percentual do volume de tecido ósseo (%), superfície óssea (mm²), densidade de superfície óssea (1/mm), número trabecular (1/mm), densidade de conectividade (1/mm³), separação trabecular (mm) e espessura trabecular (mm).

Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (Parfitt et al., 1987). Os programas DataViewer versão 1.4.1 (SkyScan Ltda.) e CT Analyser versão 1.11.8.0 (SkyScan Ltda.) foram utilizados para análise.

3.4 Administração *in vitro* da cafeína

Neste estudo foi utilizada a cafeína em pó, adquirida da empresa Sigma, adicionada aos meios de cultura, nas concentrações de 1, 3 e 5mM para os grupos OVX₁, OVX₃ e OVX₅ seguindo o protocolo de Kamagata-Kiyoura et al. (1999).

3.5 Ensaios bioquímicos

3.5.1 Proliferação celular

Aos 7, 10 e 14 dias de cultura, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTS

+ MTT a 10% por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passado esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e, em seguida, adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150µL foram transferidas para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) em comprimento de onda de 570nm.

3.5.2 Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Após 10 e 14 dias de cultura celular, o meio de cultura foi removido das placas e os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C para remoção das células não aderidas e do meio de cultura sobressalente. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1mL da solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e deixados à temperatura ambiente (TA) por 30 minutos antes de iniciar os ensaios:

a) Proteína total: a dosagem de proteína foi realizada seguindo o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para isso, 500µL da amostra contida em cada poço da placa de cultura foram transferidos ao respectivo tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 500µL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em TA por 20 minutos. Após este período, 250µL da solução de *Folin & Ciocalteu's phenol reagent* (Sigma) foram adicionados aos tubos, que após agitação, ficaram em TA por 30 minutos para desenvolvimento da coloração azul. Passado o tempo, a absorbância de cada tubo foi determinada em um espectrofotômetro (Bio-Tek), em comprimento de onda de 680nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma). Os resultados foram utilizados para normalização da atividade de fosfatase alcalina.

b) Atividade de ALP: foi determinada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando o kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio para os grupos testes, padrão e branco. Em todos os tubos foram adicionados 50µL de substrato e 500µL de solução tampão; somente no tubo padrão foram acrescentados 50µL da solução padrão. Posteriormente, todos

os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C, para a realização do experimento. Foram acrescentados 50µL das amostras aos respectivos tubos testes em uma etapa realizada em intervalo máximo de 10 minutos. Decorrido o tempo, 2mL do reagente de cor foram adicionados a todos os tubos de ensaio e, em seguida, determinou-se a absorbância em espectrofotômetro (Bio-Tek), no comprimento de onda de 590nm. Os dados da atividade de ALP foram normalizados pelo conteúdo de proteína total.

3.5.3 Detecção de fosfatase alcalina *in situ* por meio de Fast Red

A detecção da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 7, 10 e 14 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20mL de água deionizada para posterior adição de 7mg do reagente *Fast Red* (Sigma). Foram desprezados 2mL desta solução e acrescidos 8mg de *Naphthol* (Sigma) diluídos em 2mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa seca à TA para posterior documentação fotográfica. Com o auxílio do software Image J, as imagens coloridas foram convertidas em imagens binárias, seguindo uma escala de cinza e os pixels contados, gerando um gráfico com os resultados.

3.5.4 Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A detecção de matriz mineralizada foi avaliada ao final dos 17 e 21 dias de experimento. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C, adicionados 2mL de formalina 10% para fixação e mantidos a 4°C por 24 horas. A formalina foi removida e os poços desidratados à TA em séries crescentes de álcoois (30°, 50°, 70° e 100°) por 1 hora para cada graduação alcoólica. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina a 2% pH 4,2 (Sigma) por 10 minutos e as áreas de mineralização ricas em cálcio evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 280µL de ácido acético a 10% (Labsynth,

Lab Ltda, Diadema, SP, Brasil) foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada com o auxílio de uma ponteira, a solução transferida para tubos *ependorf* de 1,5mL, aquecida a 85°C por 10 minutos e resfriadas em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405nm.

3.5.5 Análise da expressão gênica por reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real-time PCR)

Ao final de 7, 10 e 14 dias de experimento o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado o reagente Trizol LS (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) à TA, sob agitação por pipetagem. As amostras foram transferidas para tubos *ependorf* e armazenadas em freezer a -20°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1µL de amostra no aparelho *NanoVue* (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320nm) e a integridade de cada amostra foi avaliada utilizando um chip, capaz de verificar amostras de RNA na concentração de 25 a 500ng/µL, no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyser* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras do RNA total foram aliquotadas e aquecidas a 70°C por 2 minutos e, em seguida, mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. A matriz do gel, aplicada nos capilares do chip, contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador e ao RNA resulta na emissão de fluorescência, que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico 18S e 28S e a verificação da integridade do RNA total a partir da atribuição de um número de integridade do RNA (RIN) que varia de 1 a 10. Foram consideradas amostras viáveis para realização do *Real-time PCR* aquelas que apresentaram valores de RIN superiores a 8.

Depois de constatada a integridade do RNA, o passo seguinte foi a confecção da fita complementar de DNA (cDNA) a partir de 1µg de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Fort City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações de *Real-time PCR*, foram utilizadas sondas *TaqMan* (Applied Biosystems) para os genes-alvo em equipamento *StepOne Plus* (Life Technologies). As reações foram realizadas em quadruplicata utilizando 5µL de *TaqMan Gene Expression Master Mix*, 0,5µL de sonda *TaqMan* para os genes de interesse (Tabela 2) e 4,5µL de cDNA (11,25ng), para um volume final de 10µL/reação. As reações de amplificação consistem em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar, determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene para a enzima *Actb* (β -Actina). Os níveis de expressão do controle endógeno foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene-alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda *TaqMan* utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pela β -Actina.

Tabela 2: Sondas TaqMan utilizadas nos ensaios de Real time PCR

Gene-alvo	Nome do Gene	Identificação do Ensaio
<i>Actb</i>	β -Actina	Rn4352931
<i>Bmp4</i>	Proteína morfogenética óssea 4	Rn00432087_m1
<i>Opg</i>	Osteoprotegerina	Rn00563499_m1
<i>RankL</i>	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B	Rn00589289_m1
<i>Runx2</i>	Fator de transcrição relacionado ao gene runt 2	Rn01512298_m1
<i>Alpl</i>	Fosfatase alcalina fígado/osso/rim	Rn01516028_m1
<i>iBsp</i>	Sialoproteína óssea	Rn00561414_m1
<i>Bglap</i>	Proteína óssea gama carboxi-glutâmica (osteocalcina/Oc)	Rn00566386_g1
<i>Spp1</i>	Fosfoproteína secretada 1 (osteopontina/Opn)	Rn01449972_m1
<i>Sp7</i>	Fator de transcrição Sp7 (osterix/Osx)	Rn01761789_m1

3.6 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Mann-Whitney quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada por meio do *software GraphPad Prism*.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise microtomográfica (micro-CT)

O resultado da análise microtomográfica mostrou relevante diferença na microarquitetura óssea dos fêmures, o que caracteriza uma condição de osteoporose nas ratas submetidas à ovariectomia, indicando o sucesso da técnica aplicada.

Figura 5 – Análise microtomográfica bidimensional ilustrando as diferenças na microarquitetura óssea entre os fêmures de ratas controle (à esquerda) e osteoporótica (à direita) após 60 dias de ovariectomia.

Todos os parâmetros morfométricos analisados mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e osteoporótico, exceto a espessura trabecular, que apresentou dados similares, conforme os gráficos a seguir.

Figura 6 – Parâmetros analisados por meio de micro-CT dos fêmures de ratas controle e ovariectomizada por 60 dias. Teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

4.2 Proliferação celular

Ao final de 7 dias, a proliferação celular foi similar nos grupos controle (C) e osteoporótico (OVX), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, enquanto que as células do grupo com 1mM de cafeína (OVX₁) apresentaram menor proliferação quando comparado ao grupo OVX, com $p < 0,05$. No entanto, a queda na proliferação celular no grupo OVX₁ foi menor quando comparada aos grupos com maiores concentrações de cafeína (OVX₃ e OVX₅).

No período experimental de 10 dias, observou-se que o grupo OVX apresentou maior proliferação celular quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). A proliferação do grupo com 1mM de cafeína continuou maior que os grupos com 3mM e 5mM. Aos 14 dias houve uma similaridade nos resultados entre os grupos C, OVX e OVX₁, com maior queda na proliferação das células do grupo OVX₅, com diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 7 - Proliferação celular de células osteoblásticas provenientes da medula óssea de ratas controle (C) e com osteoporose (OVX) cultivadas em diferentes concentrações de cafeína (1, 3 e 5mM) aos 7, 10 e 14 dias de cultura celular, avaliada por meio de ensaio colorimétrico (MTT). Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Aos 10 e 14 dias, os resultados foram semelhantes, sem apresentar diferenças estatísticas entre os grupos. No entanto, foi possível observar neste ensaio que o grupo com maior atividade de ALP foi o OVX₅, seguido pelos grupos OVX₃ e controle. O grupo com a concentração de 1mM de cafeína foi o que apresentou menor atividade de fosfatase alcalina.

Figura 8 – Atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas obtidas da medula óssea de ratas controle e osteoporótica com adição de 1mM, 3mM e 5mM de cafeína aos 10 e 14 dias de cultura celular, normalizada pelo conteúdo de proteína total. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.4 Detecção de fosfatase alcalina *in situ* por meio de Fast Red

Nos períodos de 7 e 10 dias de cultura, a detecção de fosfatase alcalina *in situ* no grupo controle foi maior que no grupo osteoporótico sem cafeína ($p < 0,05$). Embora a presença de ALP tenha sido maior no grupo OVX quando comparado ao grupo com adição de 1mM de cafeína ($p < 0,05$), este foi o que apresentou maior quantidade da proteína *in situ* em relação aos grupos com as demais concentrações de cafeína, sendo bastante visível a sua queda em OVX₃ e OVX₅ em relação ao grupo osteoporótico ($p < 0,05$).

Aos 14 dias o grupo OVX₁ apresentou maior detecção de ALP *in situ* que os demais grupos, no entanto a diferença estatística só ocorreu na comparação do grupo com a concentração de 5mM ao grupo OVX ($p < 0,05$).

Figura 9 – Detecção de fosfatase alcalina *in situ* (Fast Red) aos 7, 10 e 14 dias de cultura celular de ratas controle e osteoporótica com adição de 1mM, 3mM e 5mM de cafeína.

Figura 10 – Detecção de fosfatase alcalina *in situ* de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controle e osteoporótica com adição de 1mM, 3mM e 5mM de cafeína aos 7, 10 e 14 dias de cultura celular, utilizando o método de *Fast Red*. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.5 Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A avaliação quantitativa dos nódulos de cálcio mostrou um aumento na mineralização das células do grupo osteoporótico em comparação ao grupo controle aos 17 e 21 dias, sem diferença estatística. O grupo OVX₁ apresentou maior mineralização que os grupos com 3mM e 5mM de cafeína nos dois períodos experimentais. Estes grupos apresentaram pouca mineralização das células, como pode ser visto na imagem dos poços aos 17 dias (Figura 11).

As células com adição de 1mM de cafeína mostraram mineralização similar às células do grupo controle no período de 21 dias e maior que as demais concentrações.

Figura 11 - Nódulos de mineralização de células osteoblásticas obtidas da medula óssea de ratas controle e com osteoporose nos períodos de 17 e 21 dias de cultura celular com adição de 1mM, 3mM e 5mM de cafeína.

Figura 12 – Quantificação de nódulos de mineralização de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controle e com osteoporose com adição de 1mM, 3mM e 5mM de cafeína aos 17 e 21 dias, por meio da extração de vermelho de alizarina. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

4.6 Análise da expressão gênica por reação em cadeia de polimerase em tempo real (*Real-time PCR*)

Para a análise da expressão gênica por meio de PCR, foi avaliada a integridade do RNA com base nos valores do RIN, que ficaram acima de 9 (Figura 13).

Embora todos os grupos experimentais nos três períodos avaliados tenham mostrado que o RNA estava íntegro, com RIN superior a 9, a quantidade de RNA não foi suficiente para a realização do *Real-time PCR* para os grupos OVX₃ e OVX₅ no período de 7 dias e para o grupo OVX₅ nos períodos de 10 e 14 dias, mesmo o experimento sendo realizado em triplicata.

Figura 13 - Análise da integridade do RNA utilizando chip com gel de agarose.

Analisando a expressão do gene da fosfatase alcalina (*Alp*) observou-se que nos períodos de 7 e 10 dias o grupo osteoporótico apresentou maior expressão que o grupo controle. Aos 7 dias a expressão do grupo OVX₁ mostrou resultado similar ao grupo controle, mas reduziu essa expressão aos 10 dias. Aos 14 dias a expressão dos grupos OVX, OVX₁ e OVX₃ foi semelhante, entretanto com menor expressão que o grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos, exceto para o grupo OVX₃ aos 10 dias, que mostrou uma baixa expressão deste gene em relação aos outros grupos do mesmo período.

Figura 14 - Análise da expressão gênica de *Alpl* em grupos de células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Aos 7 dias, a expressão de osteocalcina (*Oc*) (Figura 15) foi maior no grupo OVX e menor no grupo OVX₁ ($p < 0,05$). Aos 10 e 14 dias de cultura o grupo OVX₁ obteve maior expressão que os demais grupos, mas sem diferença estatística entre os grupos.

Aos 7 dias, o resultado dos grupos controle e OVX foi similar, havendo um destaque na expressão gênica de *Runx2* (Figura 16) no grupo OVX₁, porém sem diferença estatística. Aos 10 e 14 dias a maior expressão desse gene pode ser observada no grupo OVX₁, com diferenças estatisticamente significantes, enquanto a menor expressão ocorreu no grupo osteoporótico sem cafeína ($p < 0,05$).

Figura 15 – Expressão gênica de *Oc* em células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Figura 16 - Expressão do gene *Runx2* em células da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

A expressão da proteína óssea morfogenética 4 (*Bmp4*) no grupo C foi maior que no grupo OVX em todos os períodos ($p < 0,05$ aos 7 dias), enquanto que o grupo OVX₁ apresentou valores maiores que OVX. Aos 10 dias o grupo com maior expressão desse gene foi o OVX₃ ($p < 0,05$). Os grupos C, OVX₁ e OVX₃, aos 14 dias, mostraram resultados similares, todos maiores que o grupo OVX.

Figura 17 - Análise da expressão gênica de *Bmp4* em células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

A expressão do gene *Rankl* foi maior no grupo OVX₁ em todos os períodos experimentais. Aos 7 dias o grupo OVX apresentou menor expressão que os demais, no entanto as diferenças entre os grupos não foram significantes. No décimo dia, os três grupos osteoporóticos apresentaram maior expressão que o grupo controle, também sem significância estatística. No último período experimental, o grupo com menor expressão de *Rankl* foi o OVX, resultado também observado no sétimo dia.

Figura 18 - Expressão do gene *Rankl* em células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

A expressão de osteoprotegerina (*Opg*) (Figura 19) nos grupos OVX e OVX₁ foi menor quando comparada ao grupo controle no sétimo dia. Aos 10 dias, o grupo OVX₁ mostrou maior expressão que o grupo osteoporótico sem cafeína ($p < 0,05$). No período de 14 dias a expressão de *Opg* no grupo OVX₃ se destacou ($p < 0,05$), enquanto que no grupo OVX praticamente não foi expressa.

A osteopontina (*Opn*) (Figura 20) foi mais expressa nos grupos osteoporóticos, nos três períodos experimentais, quando comparado ao grupo controle. Aos 7 dias o grupo OVX apresentou a maior expressão desse gene ($p < 0,05$). No décimo dia de cultivo o grupo com 3mM de cafeína se destacou com a expressão gênica mais elevada, seguida pelos grupos com 1mM de cafeína e pelo grupo sem adição desta substância. No período de 14 dias houve pequena diferença entre os grupos OVX₁ e OVX₃; a expressão de ambos foi maior que os grupos osteoporótico e controle.

Figura 19 - Expressão gênica de *Opg* em células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

Figura 20 – Expressão gênica de *Opn* em células da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

No sétimo dia de cultura não houve diferença significativa entre os grupos na expressão do gene osterix (*Osx*), embora seja possível notar uma expressão levemente maior nos grupos OVX₁ e OVX em relação ao controle. O grupo OVX apresentou expressão similar ao grupo controle aos 10 dias, enquanto a expressão desse gene diminuiu nos grupos com 1mM e 3mM de cafeína no mesmo período experimental. Aos 14 dias o grupo OVX₃ apresentou a maior expressão gênica que os demais grupos, inclusive ao longo do tempo.

Figura 21 - Expressão do gene osterix em células obtidas da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

A expressão do gene da sialoproteína óssea (*Bsp*) aos 7 dias foi similar entre os grupos C e OVX₁, com maior expressão no grupo osteoporótico sem cafeína. Aos 10 dias a maior expressão de *Bsp* se deu no grupo OVX seguido dos grupos OVX₁, C e OVX₃, este com $p < 0,05$. No último período analisado, o grupo OVX₃ apresentou menor expressão em relação aos demais grupos, sem significância estatística.

Figura 22 - Análise da expressão gênica de *Bsp* em células da medula óssea de ratas controle (C) e osteoporótica (OVX) com adição de 1mM e 3mM (OVX₁ e OVX₃, respectivamente) de cafeína ao meio de cultura osteogênico. Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A osteoporose é uma doença óssea na qual a quantidade de tecido mineralizado diminui e a estrutura trabecular é prejudicada (Sattui e Saag, 2014). O osso cortical torna-se mais fino e poroso e os espaços medulares ficam maiores, como consequência da diminuição da espessura trabecular. Tais condições fragilizam a estrutura óssea, aumentando a ocorrência de fraturas (Nguyen et al., 2007; Yang et al., 2015). Com o intuito de comprovar a eficácia da técnica de ovariectomia para indução do quadro de osteoporose nos animais utilizados nesta investigação, foi realizada a análise microtomográfica dos fêmures das ratas controle e osteoporótica. As imagens obtidas e os valores quantitativos mostraram uma diminuição significativa na densidade de conectividade, na superfície óssea, no volume ósseo, na espessura e número trabecular, bem como o aumento da separação trabecular no tecido ósseo femoral das ratas osteoporóticas quando comparado ao grupo controle, confirmando assim, o quadro de osteoporose necessário para a realização deste estudo.

A osteoporose está associada a múltiplos fatores e a prática de exercícios regulares, redução do tabagismo e do consumo de álcool associados a uma dieta equilibrada podem desempenhar importantes papéis na prevenção desta doença (Hallstrom et al., 2013; Yang et al., 2015). O consumo de café é um hábito comum na dieta de grande parte da população mundial e tem seus benefícios, como prevenção de diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares; entretanto, ele pode ter efeitos prejudiciais quando tomado em grandes doses (Hallstrom et al., 2013; Choi et al., 2014). Reconhecendo a cafeína como principal constituinte dessa bebida, concentrações de 1, 3 e 5mM dessa substância foram utilizadas neste estudo e adicionadas ao meio de cultura com o intuito de verificar efeitos benéficos e/ou deletérios da cafeína em relação ao metabolismo das células osteoblásticas da medula óssea.

As concentrações de cafeína utilizadas foram estabelecidas com base na literatura. Su et al. (2013) utilizaram concentrações de 0,1 a 1mM de cafeína em culturas de linhagem de células tronco da medula óssea de camundongo (M2-10B4) e concluíram que a cafeína em baixas concentrações (0,1-0,3mM) apresentou efeito osteogênico; entretanto, quando essas concentrações foram elevadas, foi observado um efeito inibitório. Zhou et al. (2010) também utilizaram concentrações de 0,1 a

1mM, no entanto notaram perda de massa óssea à medida que aumentaram as concentrações, desregulando alguns efeitos importantes na osteogênese. No estudo de Rapuri, Gallagher e Nawaz (2007) foram utilizadas concentrações de 0,2 a 10mM de cafeína adicionadas ao meio de cultura com vitamina D3; os resultados sugeriram que a cafeína apresentou um efeito inibitório na expressão da vitamina D3, afetando indiretamente as células osteoblásticas.

Na presente investigação, os resultados obtidos pelo método colorimétrico de MTT mostraram que quanto maior a concentração de cafeína adicionada ao meio osteogênico, menor a proliferação celular nas culturas dos grupos osteoporóticos. Segundo Tsuang et al. (2006) a cafeína pode aumentar a taxa de apoptose das células osteoblásticas e apresentar potencial efeito deletério na viabilidade celular. No entanto, em estudo *in vitro* de Liu et al. (2011), a viabilidade das células da medula óssea não foi afetada pelo tratamento com 0,005-0,1mM de cafeína por 24 horas; a cafeína também não induziu citotoxicidade em células MC3T3-E1 nas concentrações de 0,001-1mM nesse mesmo estudo. Estes resultados corroboram com os dados obtidos nesta investigação para a concentração de 1mM, sugerindo que a citotoxicidade provocada pela cafeína ocorre quando a mesma está em altas concentrações.

O metabolismo das células osteoblásticas foi afetado pela presença da cafeína, principalmente em relação à atividade de proteínas como a fosfatase alcalina, que mostrou resultados similares nos dois períodos avaliados, apontando que na osteoporose existe uma tendência à diminuição da atividade desta proteína e um aumento quando adicionada cafeína ao meio de cultura; apesar disso, as diferenças não foram estatisticamente significantes. Uma atividade elevada de fosfatase alcalina em animais osteoporóticos está relacionada ao aumento do processo de remodelação óssea, ou seja, da frequência de ativação entre os processos de formação e reabsorção óssea (Egrise et al., 1992). Em mulheres na pós-menopausa, os marcadores de formação óssea mostram-se aumentados; mudanças em curto prazo nestes marcadores podem significar fatores de pré-disposição a alterações na densidade mineral óssea (Lumachi et al., 2009).

O aumento da atividade nos grupos tratados não foi condizente com o método colorimétrico para detecção *in situ* da ALP, que mostrou uma diminuição da marcação à medida que houve aumento da concentração de cafeína. Sugere-se que tal fato possa ter ocorrido devido à normalização do ensaio bioquímico de ALP ser

realizada pelo conteúdo de proteína total, ao passo que no ensaio de *Fast Red*, o gráfico representa uma condição absoluta, sem normalização.

A mineralização no grupo OVX foi maior que no grupo controle quando avaliados os nódulos de cálcio por meio de vermelho de alizarina. Busse et al. (2009) também notaram um aumento na taxa de mineralização de pacientes osteoporóticos quando comparado ao estudo com pacientes saudáveis. Alguns autores como Yu et al. (2012) sugerem que este achado se deva a uma tentativa do organismo em depositar maiores quantidades de matriz óssea para uma possível reparação frente à condição de osteoporose. Porém, não se pode afirmar que a matriz formada possua a qualidade e densidade desejada, mas sim uma formação frágil e friável. A maior taxa de mineralização no grupo com 1mM de cafeína, em relação aos outros grupos, pode indicar que esta dose seja menos prejudicial ao tecido ósseo. Um dos efeitos das altas doses de cafeína no organismo é a capacidade de aumentar a excreção de cálcio urinário, podendo também reduzir a absorção de cálcio endógeno, o que poderia interferir no processo de mineralização do tecido ósseo (Heaney, 2002).

O processo de remodelação óssea também pode ser compreendido ao analisar a expressão de genes relacionados à formação e reabsorção de tecidos mineralizados, assim como à diferenciação osteoblástica. Neste estudo, o efeito da cafeína foi avaliado ao analisar a expressão dos genes e constatar a baixa quantificação dos mesmos nos grupos OVX com 3 e 5mM de cafeína no período de 7 dias e no grupo OVX com adição de 5mM de cafeína aos 10 e 14 dias de cultura. Os genes desses grupos tiveram sua integridade avaliada e mostraram resultados muito satisfatórios, com RIN maior que 9 em todas as amostras. Esta intercorrência pode estar relacionada à redução da quantidade de células viáveis durante a cultura celular com adição das referidas doses.

Os níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina refletem as alterações na formação óssea de forma mais sensível e específica. Zhao et al. (2015), em estudo realizado com mulheres osteoporóticas aponta que, clinicamente, a osteoporose pode ser classificada em tipo 1 (osteoporose pós-menopausa) e tipo 2 (osteoporose senil). A osteoporose tipo 1 está associada às alterações endócrinas provocadas pela menopausa e são acompanhadas de níveis elevados dos índices metabólicos ósseos. Contrariamente, a osteoporose tipo 2, resultante do processo de envelhecimento, é acompanhada de níveis reduzidos desses índices. Isso pode

explicar o porquê da expressão relativa de *Alpl* e *Oc* serem maiores no grupo OVX quando comparado ao grupo controle, corroborando as afirmações feitas por Yu et al. (2012) de que as atividades metabólica e funcional das células pode estar aumentada na osteoporose com o intuito de reequilibrar o processo de remodelação.

Durante o processo de osteogênese, genes como o *Runx2* são expressos em alguns estágios deste processo. O *Runx2* é um ativador de transcrição essencial na diferenciação osteoblástica e morfogênese do esqueleto. Zhou et al. (2010) mostraram que a cafeína reduziu significativamente a expressão deste gene em uma situação de osteoporose. No presente estudo, a expressão deste gene no grupo OVX com 1mM de cafeína, nos três períodos analisados, foi maior que nos demais grupos, incluindo o grupo controle.

De acordo com Merciris et al. (2007), a sobre-expressão de *Runx2* afeta a diferenciação osteoblástica e induz a perda óssea, inibindo o efeito anabólico do paratormônio (PTH) no tecido ósseo. Por outro lado, estudo como o de Reis et al. (2015) mostram que as células osteoblásticas isoladas de ratos recém-nascidos cujas mães haviam ingerido cafeína durante a gestação, apresentaram aumento da expressão de vários marcadores osteogênicos, inclusive do *Runx2*, com consequente aumento da formação de nódulos mineralizados, assim como observado nos resultados obtidos neste estudo. Ainda outros estudos como o de Su et al. (2013) mostraram que concentrações de até 0,1mM aumentaram a expressão do *Runx2*, sugerindo um efeito benéfico na diferenciação de uma linhagem de células osteoblásticas da medula óssea (M2-10B4).

O gene *Bmp4* está envolvido no desenvolvimento cartilaginoso e ósseo, especificamente dentes e membros, além do reparo de fraturas. Este gene, em particular, faz parte de uma superfamília de proteínas, a TGF- β (fator de crescimento transformador beta) e desempenha importante papel na ossificação endocondral, além de estar envolvido no desenvolvimento dos músculos e na mineralização óssea (Miyazaki et al., 2003). A expressão desse gene, neste estudo, foi influenciada pela adição da cafeína, se apresentando maior nos grupos OVX₁ e OVX₃ em relação ao grupo osteoporótico sem adição da mesma. Com base no estudo de Yun et al. (2015), pode haver uma correlação positiva entre a cafeína e as vias de sinalização de BMP e Wnt/ β -catenina na tentativa de promover a osteogênese, não necessariamente aumentando a mineralização óssea.

Vários estudos tem observado que os processos de crescimento, maturidade, proliferação e diferenciação dos osteoclastos são sincronizados e modulados por vários fatores, entre eles, a via de sinalização Rank/Rankl/Opg, que desempenha um papel fundamental na reabsorção óssea, afetando significativamente o metabolismo deste tecido (Rogers e Eastell, 2005; Trouvin e Goëb, 2010).

A proteína *Rankl* é o fator chave para separação e demarcação de osteoclastos, sendo responsável pelo seu recrutamento, fusão e ativação das formas maduras, além de inibir a apoptose destas células. A osteoprotegerina é uma citocina solúvel produzida por osteoblastos ativos, atuando como um “receptor-armadilha” para o *Rankl* e, conseqüentemente, inibindo toda a via de diferenciação dos osteoclastos em estágios iniciais. Neste mecanismo a *Opg* desempenha o papel de inibidor de reabsorção óssea, bem como o de regulador da massa óssea; suprimindo a diferenciação dos osteoclastos, ela bloqueia sua atividade e induz a apoptose destas células (Raisz, 2005; Wolski et al., 2016).

Neste estudo, a expressão do gene *Rankl* foi maior que a do gene *Opg* nos grupos osteoporóticos com adição de cafeína. Este resultado pode sugerir que a cafeína potencializou o processo de reabsorção óssea nesses grupos. Bastos et al. (2014) também identificaram o aumento de *Rankl* em relação a *Opg* em animais osteoporóticos submetidos ao consumo de cafeína, sugerindo que a diferenciação osteoclástica e/ou sua função foram elevadas em animais com deficiência de estrógeno.

A osteopontina também desempenha importante função na regulação da formação óssea. É um constituinte proeminente da matriz óssea e frequentemente usado como um marcador na avaliação da diferenciação osteogênica *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al., 2011; Wei et al., 2016).

A expressão gênica de *Opn* nesta pesquisa apresentou valores maiores aos 10 e 14 dias nos grupos osteoporóticos com cafeína; por se tratar de um marcador tardio, o período de 7 dias mostrou expressão relativa mais baixa. Bastos et al. (2014) não observaram diferenças entre os grupos osteoporóticos com ou sem cafeína na expressão desse gene, talvez por ter avaliado sua expressão somente aos 8 dias de cultura. Já Melhus et al. (2010) observaram aumento nos níveis de *Opn* no calo de fratura tibial em ratas ovariectomizadas após três semanas de reparo. Esses autores sugerem que a osteopontina desempenhe alguma função durante a perda óssea relacionada à deficiência de estrógeno, uma vez que está sob

influência tanto do estrógeno como da vitamina D, podendo agir na atividade osteoclástica e na mineralização da matriz.

A diferenciação osteoblástica é um processo de múltiplos passos onde células mesenquimais se diferenciam em células de linhagem osteoblástica, incluindo osteócitos. Osterix é um fator de transcrição específico do osteoblasto, o qual ativa uma gama de genes durante a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros e osteócitos (Sinha e Zhou, 2013). O papel essencial do *Osx* no processo de formação e homeostase óssea é bem estabelecido. Animais com mutações nesse gene apresentaram falta de neoformação óssea, ausência de reabsorção de cartilagem mineralizada e defeitos na maturação e formação dos osteócitos (Kaback et al., 2008).

Autores como Föger-Samwald et al. (2016) analisaram a expressão relativa de *Osx* em mulheres idosas com fratura osteoporótica no quadril e notaram uma expressão significativamente menor desse gene, o que fornece evidências para a disfunção osteoblástica e aumento da atividade osteoclástica neste grupo de mulheres. No presente estudo, a expressão de osterix nos grupos avaliados não mostrou diferença significativa, independente da adição de cafeína, exceto em dois períodos experimentais. O grupo OVX₃ apresentou o maior valor na expressão deste gene aos 14 dias, enquanto aos 10 dias, esse grupo apresentou a menor expressão, sugerindo que a concentração de 3mM de cafeína possa afetar a formação óssea nesses grupos.

Outra proteína envolvida na regulação da osteogênese é a sialoproteína óssea, um componente importante da matriz óssea extracelular. A exata função da *Bsp* nos tecidos mineralizados não é conhecida, entretanto uma possibilidade é a de que atue como um núcleo para a formação dos primeiros cristais de apatita (An et al., 2016). A expressão relativa desse gene no presente estudo mostrou valores maiores para o grupo OVX seguido do grupo OVX com 1mM de cafeína aos 7 e 10 dias; entretanto na concentração de 3mM, a expressão foi a menor observada aos 10 e 14 dias. Outros estudos observaram que ratas osteoporóticas que receberam ingestão de 10mg de cafeína a cada 100g de peso corporal por dia não apresentaram diferença significativa na expressão de *Bsp* entre os grupos estudados (Bezerra et al., 2013). Por outro lado, Reis et al. (2015) avaliaram filhotes de animais tratados com cafeína durante a gravidez, que consumiram 25, 50 e 100mg/kg de cafeína, notando resultado elevado na expressão de sialoproteína óssea na dose

intermediária, indicando novamente que baixas doses dessa substância possam apresentar efeitos benéficos no metabolismo e atividade funcional de células osteoblásticas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode ser concluído que:

- o modelo de osteoporose escolhido para esta investigação promove alterações no tecido ósseo femoral como comprovado por análise microtomográfica;
- a cafeína administrada *in vitro* nas três concentrações selecionadas afeta o metabolismo de células osteoblásticas em uma condição de osteoporose, evidenciado por ensaios bioquímicos e moleculares;
- a dose selecionada de 1mM de cafeína promoveu menores efeitos deletérios às culturas celulares, sugerindo a possibilidade de ingestão de pequenas doses desta substância por indivíduos que apresentem diagnóstico confirmado de osteoporose.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADEI SU, SILVEIRA VAS, PEREIRA AC, CARVALHO YR, ROCHA RF. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. *J. Bras. Pato. Med. Lab.* 2006 42(1): 5-12.
- AN J, YANG H, ZHANG Q, LIU C, ZHAO J, ZHANG L, CHEN B. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sci.* 2016 15(147): 46-58.
- BASTOS MF, MENEZES DJ, BEZERRA JP, BRAZ CK, FONSECA PF, ARANA-CHAVEZ VE, AZAMBUJA N, DUARTE PM. Impact of caffeine and/or estrogen deficiency on trabecular bone area and healing: a study in rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2014 29(1): 221-231.
- BEZERRA JP, DE SIQUEIRA A, PIRES AG, MARQUES MR, DUARTE PM, BASTOS MF. Effects of estrogen deficiency and/or caffeine intake on alveolar bone loss, density, and healing: a study in rats. *J. Periodontol.* 2013 84(6): 839-849.
- BUSSE B, HAHN M, SOLTAU M, ZUSTIN J, PÜSCHEL K, DUDA GN, AMLING M. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone.* 2009 45(6): 1034-1043.
- CHOI EJ, KIM KH, KOH YJ, LEE JS, LEE DR, PARK SM. Coffee consumption and bone mineral density in korean premenopausal women. *Korean J. Fam. Med.* 2014 35(1): 11-18.
- COMPSTON JE. Sex hormones and bone. *Physiological Reviews.* 2001 81(1): 419-447.
- CONLISK AJ, GALUSKA DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev. Med.* 2000 31(5): 562-568.
- COSTA AL, DA SILVA MA, BRITO LM, NASCIMENTO AC, DO CARMO LACERDA BARBOSA M, BATISTA JE, DE BARROS BEZERRA GF, DE CASTRO VIANA GM, FILHO WE, VIDAL FC, NASCIMENTO MDO D. Osteoporosis in primary care: an opportunity to approach risk factors. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.* 2016 56(2): 111-116.
- DOWNEY P, SIEGEL MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys. Therapy.* 2006 86(1): 77-91.
- EDWARDS CJ, WILLIAMS E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2010 21(8): 1287-1293.

EGRISE D, MARTIN D, NEVE P, VIENNE A, VERHAS M, SCHOUTENS A. Bone blood flow and *in vitro* proliferation of bone marrow and trabecular bone osteoblast-like cells in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 1992 50(4): 336-341.

FÖGER-SAMWALD U, VEKSZLER G, HÖRZ-SCHUCH E, SALEM S, WIPPERICH M, RITSCHL P, MOUSAVI M, PIETSCHMANN P. Molecular mechanisms of osteoporotic hip fractures in elderly women. *Exp Gerontol.* 2016 73: 49-58.

FOLWARCZNA J, PYTLIK M, ZYCH M, CEGIEŁA U, KACZMARCZYK-SEDLAK I, NOWIŃSKA B, SLIWIŃSKI L. Favorable effect of moderate dose caffeine on the skeletal system in ovariectomized rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013 57(10): 1772-1784.

GARDNER EJ, RUXTON CHS, LEEDS AR. Black tea - helpful or harmful? A review of the evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007 61(1): 3-18.

GESTY-PALMER D, LUTTRELL LM. 'Biasing' the parathyroid hormone receptor: a novel anabolic approach to increasing bone mass? *Br. J. Pharmacol.* 2011 164(1): 59-67.

GIUSTI A, BIANCHI G. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clin. Interv. Aging.* 2014 30(10): 105-115.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochemicals.* 2004 329(1): 77-84.

HALLSTROM H, BYBERG L, GLYNN A, LEMMING EW, WOLK A, MICHAËLSSON K. Long-term coffee consumption in relation to fracture risk and bone mineral density in women. *Am. J. Epidemiol.* 2013 178(6): 898–909.

HAYASHI K, FOTOVATI A, ALI SA, ODA K, OIDA H, NAITO M. Prostaglandin EP4 receptor agonist augments fixation of hydroxyapatite-coated implants in a rat model of osteoporosis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2005 87(8): 1150-1156.

HEANEY RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol.* 2002 40(9): 1263-1270.

HOAR W, HICKMAN CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W Hoar & CP Hickman, editors. *General and comparative physiology*. 2^a ed. New Jersey: Prentice-hall; 1975. p. 265.

HOROWITZ, M. C. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science.* 1993 260(5108): 626-627.

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(1): 293-299.

ILICH JZ, BROWNBILL RA, TAMBORINI L, CRNCEVIC-ORLIC Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J. Am. Coll. Nutr.* 2002 21(6): 536-544.

KABACK LA1, SOUNG DO Y, NAIK A, SMITH N, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, DRISSI H. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *J. Cell Physiol.* 2008 214(1): 173-82.

KALU DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Mineral.* 1991 15(3): 171-192.

KAMAGATA-KIYOUURA, 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(3): 283-288.

KWAN TAT S, PADRINES M, THÉOLEYRE S, HEYMANN D, FORTUN Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 15(1): 49-60.

LEE DR, LEE J, ROTA M, LEE J, AHN HS, PARK SM, SHIN D. Coffee consumption and risk of fractures: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Bone.* 2014 63: 20-28.

LI L, CHEN X, LV S, DONG M, ZHANG L, TU J, YANG J, ZHANG L, SONG Y, XU L, ZOU J. Influence of exercise on bone remodeling-related hormones and cytokines in ovariectomized rats: a model of postmenopausal osteoporosis. *PLoS One.* 2014 9(11): 1-10

LIU SH, CHEN C, YANG RS, YEN YP, YANG YT, TSAI C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J. Orthop. Res.* 2011 29(6): 954-960.

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 25(4): 402-408.

LLOYD T, ROLLINGS N, EGGLI DF, KIESELHORST K, CHINCHILLI VM. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1997 65(6): 1826-1830.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chemical.* 1951 193(1): 265-275.

LUMACHI F, ERMANI M, CAMOZZI V, TOMBOLAN V, LUISETTO G. Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009 1173(1): E60-63.

MACEDO RM, BRENTGANI LG, LACERDA SA. Effects of coffee intake and intraperitoneal caffeine on bone repair process--a histologic and histometric study. *Braz. Dent. J.* 2015 26(2): 175-180.

MANIATOPOULOS C, SODEK J, MELCHER AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Research.* 1988 254: 317-330.

MANOLAGAS SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* 1995 17(2): 63S-67S.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz. J. Biology.* 2002 62(4): 609-614.

MELHUS G, BRORSON SH, BAEKKEVOLD ES, ANDERSSON G, JEMTLAND R, OLSTAD OK, REINHOLT FP. Gene expression and distribution of key bone turnover markers in the callus of estrogen-deficient, vitamin D-depleted rats. *Calcif. Tissue Int.* 2010 87(1): 77-89.

MERCIRIS D, MARTY C, COLLET C, DE VERNEJOU MC, GEOFFROY V. Overexpression of the transcriptional factor runx2 in osteoblasts abolishes the anabolic effect of parathyroid hormone *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 2007 170(5): 1676-1685.

MIYAZAKI Y, OSHIMA K, FOGO A, ICHIKAWA I. Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int.* 2003 63(3): 835-844.

MURARO L, LONGO L, GERALDINI F, BORTOT A, PAOLI A, BOSCOLO A. Intralipid in acute caffeine intoxication: a case report. *J. Anesth.* 2016 Jun pp. 1-5 [In press].

NGUYEN ND, AHLBORG HG, CENTER JR, EISMAN JA, NGUYEN TV. Residual lifetime risk of fractures in women and men. *J. Bone Miner. Res.* 2007 22(6): 781-788.

OLIVEIRA LG. Osteoporose: guia para diagnóstico, prevenção e tratamento. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p. 431.

PARFITT AM, DREZNER MK, GLORIEUX FH, KANIS JA, MALLUCHE H, MEUNIER PJ, OTT SM, RECKER RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 1987 2(6): 595-610.

PRICE PA, PARTHEMORE JG, DEFTOS LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J. Clin. Invest.* 1980 66(5): 878-83.

RAISZ LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J. Clin. Investigation*. 2005 115(12): 3318-3325.

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(5): 694-700.

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(3-5): 368-371

REIS AM, RIBEIRO LG, OCARINO NDE M, GOES AM, SERAKIDES R. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 16(1): 10.

ROGERS A, EASTELL R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005 90(11): 6323-6331.

RUXTON C. Health aspects of caffeine: benefits and risks. *Nurs Stand*. 2009 24(9): 41-48.

SAKAMOTO W, NISHIHIRA J, FUJIE K, IIZUKA T, HANDA H, OZAKI M, YUKAWA S. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone*. 2001 28(3): 332-336.

SANDHU SK, HAMPSON G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J. Clin. Pathology*. 2011 64(12): 1042-1050.

SATTUI SE, SAAG KG. Fracture mortality: associations with epidemiology and osteoporosis treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014 10(10): 592–602.

SINHA KM, ZHOU X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell Biochem*. 2013 114(5): 975-984.

SU SJ, CHANG KL, SU SH, YEH YT, SHYU HW, CHEN KM. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2013 64(4): 429-36.

TASSINARI MS, GERSTENFELD LC, STEIN GS, LIAN JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 1991 6(10): 1029-1036.

TROUVIN AP, GOËB V. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin. Interv. Aging*. 2010 19(5): 345-354.

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. Res.* 2006 7: 1-7.

WEI B, HUANG C, ZHAO M, LI P, GAO X, KONG J, NIU Y, HUANG R, QUAN J, WEI J, CHU J. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the bone healing of ovariectomized rats. *Stem Cells Int.* 2016 2016: 9458396

WOLSKI H, DREWS K, BOGACZ A, KAMIŃSKI A, BARLIK M, BARTKOWIAK-WIECZOREK J, KLEJEWSKI A, OŻAROWSKI M, MAJCHRZYCKI M, SEREMAK-MROZIKIEWICZ A. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis. *Ginekol Pol.* 2016 87(5): 347-52.

YAMADA H, OCHI Y, MORI H, NISHIKAWA S, HASHIMOTO Y, NAKANISHI Y, TANAKA M, BRUCE M, DEACON S, KAWABATA K. Effects of 16-month treatment with the cathepsin K inhibitor ONO-5334 on bone markers, mineral density, strength and histomorphometry in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone.* 2016 86: 43-52.

YANG P, ZHANG X-Z, ZHANG K, TANG Z. Associations between frequency of coffee consumption and osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015 8(9): 15958-15966.

YU SJ, LIU HC, LING-LING E, WANG DS, ZHU GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. *Exp. Biol. Med.* 2012 237(4):395-340.

YUN HM, PARK KR, QUANG TH, OH H, HONG JT, KIM YC, KIM EC. 2,4,5-Trimethoxydalbergiquinol promotes osteoblastic differentiation and mineralization via the BMP and Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death Dis.* 2015 6(16): e1819.

ZHANG B, LI Y, ZHOU Q, DING Y. Estrogen deficiency leads to impaired osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cell in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 2011 223(3): 177-186.

ZHAO D, WANG J, LIU Y, LIU X. Expressions and clinical significance of serum bone Gla-protein, bone alkaline phosphatase and C-terminal telopeptide of type I collagen in bone metabolism of patients with osteoporosis. *Pak. J. Med. Sci.* 2015 31(1): 91-94.

ZHOU Y, GUAN XX, ZHU ZL, GUO J, HUANG YC, HOU WW, YU HY. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Br. J. Pharmacol.* 2010 161(7): 1542-1552.

Anexo A: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito da administração in vitro de cafeína em diferentes concentrações no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas ovariectomizadas”, Protocolo nº 2015.1.876.58.1, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 21/10/2015.

Vigência do Projeto	21/10/2015 a 21/10/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	200 gramas / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do <i>Campus</i> USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
 Vice-Coordenador da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP