



**CEPPE**

Centro de Pós-Graduação,  
Pesquisa e Extensão

**MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**JOYCE PINHO BEZERRA**

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO CRÔNICA DE ALTAS  
DOSES DE CAFEÍNA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR  
LIGADURA E NA DENSIDADE E REPARO ÓSSEO EM  
TÍBIAS DE RATOS: ESTUDO HISTOMÉTRICO**

Guarulhos

2008

**JOYCE PINHO BEZERRA**

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO CRÔNICA DE ALTAS  
DOSES DE CAFEÍNA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR  
LIGADURA E NA DENSIDADE E REPARO ÓSSEO EM  
TÍBIAS DE RATOS: ESTUDO HISTOMÉTRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para  
obtenção do título de Mestre em Odontologia  
Área de Concentração: Periodontia  
Orientador (a): Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos  
Co-orientador (a): Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos

2008

Bezerra, Joyce Pinho

B574i

Influência da ingestão crônica de altas doses de cafeína na periodontite induzida por ligadura e na densidade e reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico / Bezerra, Joyce Pinho. Guarulhos, SP, 2008.

47 f. ; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2008.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Ferreira Bastos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poliana Mendes Duarte

Bibliografia: p. 44-46

1. Periodontia. 2. Densidade óssea. 3. Café. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22<sup>st</sup> 617.632



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "INFLUÊNCIA DA INGESTÃO CRÔNICA DE ALTAS DOSES DE CAFÉINA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA E NA DENSIDADE E REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE RATOS: ESTUDO HISTOMÉTRICO", em sessão pública realizada em 11 de Dezembro de 2008, considerou a candidata Joyce Pinho Bezerra aprovada com louvor.

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos *Marta Ferreira Bastos*

2. Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo *Ricardo*

3. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo *Figueiredo*

Dedico esse momento especial aos meus pais, Bezerra e Regina,  
que não mediram esforços para que essa conquista se tornasse  
possível e que são os meus grandes orientadores na vida;  
e à minha avó Lózinha que é minha companheira de  
fé e de muitos sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Hoje, tenho a certeza que, a despeito de todo meu empenho e dedicação, os resultados e o aprendizado que obtive com a produção deste trabalho jamais seriam possíveis sem o incentivo e a solidariedade que recebi de muitas pessoas em diferentes momentos. Não daria, neste espaço, para citar o nome de todas elas e as circunstâncias em que todas colaboraram, mas é imprescindível citar algumas.

Antes e acima de qualquer pessoa agradeço à Deus por tantas oportunidades e caminhos, e pela coragem para acreditar e seguir a Sua Vontade.

Aos meus pais, Bezerra e Regina, pela minha educação, por serem fonte de amor, incentivo, apoio (em todas as fases da minha vida), ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência dos meus próprios valores.

Aos meus irmãos mais novos, Matheus e Lucas, por me estimularem a querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao professor Ms. Roberto Ferrari, primeiro orientador, exemplo de profissionalismo e caráter, grande responsável pelo início dessa longa caminhada.

À secretária municipal de saúde de São Miguel do Tapuio, enfermeira Antônia Soares, amiga e exemplo, cuja compreensão possibilitou que eu continuasse sonhando e batalhando pelos meus ideais.

À UnG, na pessoa da professora Dra. Magda Feres, que conduz estes estudos com ética, competência, transparência e humildade, agradeço pela oportunidade e por ter me aceitado como aluna.

À minha orientadora neste trabalho, professora Dra. Marta Ferreira Bastos, por me ensinar a encarar os desafios, por acreditar na minha capacidade e não me deixar desistir, por me passar ensinamentos que extrapolam o universo acadêmico.

À minha co-orientadora professora Dra. Poliana Mendes Duarte por me fazer entender a verdadeira essência do que é ser mestre e pelo carinhoso sorriso que ela dá toda vez que me vê.

Aos demais professores de periodontia e de dentística, que me ensinaram com prazer e dedicação parte do que sei e, o que é mais importante, despertaram em mim o interesse pela pesquisa.

Aos amigos de turma que me aceitaram como sou (exceto o Eduardo e o Marcelinho) sempre fazendo críticas construtivas e passando exemplos de: determinação (Juliana), equilíbrio (Kelly), coragem (Vanessa), companheirismo (Geisla), fortaleza (Josefa), solidariedade (Marcelão), tranqüilidade (Datte), auto-conhecimento (Eduardo) e bom humor (Marcelinho). Nunca esquecerei nenhum de vocês.

À Josefa por me fazer sentir tão perto de casa mesmo a quilômetros de distância e ser meu porto seguro em um território absolutamente desconhecido até então.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios de histologia (Paulo Rogério) e geo-ciências (Rossana), clínicas (Adriana e Cíntia) e do biotério, alunos de iniciação científica e todos que contribuíram direta ou indiretamente para a devida realização de todas as etapas desse estudo.

Aos meus amigos e familiares piauienses que entenderam a minha ausência e torceram para que eu sempre viajasse em paz.

Meu sincero e carinhoso, muito obrigada.

“Decolar, mesmo que com medo de avião. Navegar, mesmo que a rota tenha que ser traçada no meio da viagem. Arriscar, mesmo que a única coisa a apostar seja a sua própria coragem. Liberdade é saber que o céu não é o limite. Foi sabendo disso que o homem chegou à Lua. Liberdade é saber que não existem garantias. Você vai ser mais feliz se arriscar mais, se entender que errar nada mais é do que estar a um passo do acerto, mesmo que a dois do próximo erro. Não importa. O caminho se faz na caminhada”.

(Autor desconhecido)



## RESUMO

Embora alguns estudos tenham demonstrado a influência negativa da cafeína sobre o metabolismo ósseo, os resultados ainda são controversos. Além disto, a literatura não apresenta relatos sobre o efeito desta substância no tecido ósseo periodontal. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de altas doses de cafeína na periodontite induzida por ligadura e no reparo e densidade óssea em tíbias de ratos. Vinte e quatro ratos Wistar foram divididos em dois grupos: **sem cafeína**, nos quais os animais não ingeriram cafeína e **cafeína**, no qual os animais ingeriram diariamente 10mg de cafeína/100g de peso corpóreo diluída na água de beber durante 56 dias. Duas semanas após o início da ingestão da cafeína, um dos primeiros molares mandibulares foi aleatoriamente escolhido para receber a ligadura, enquanto que o dente contralateral permaneceu sem a mesma. Quarenta e oito dias após o início da ingestão de cafeína, que correspondeu a 34 dias após a colocação da ligadura, os animais foram submetidos à confecção de um defeito cirúrgico de tamanho crítico (3mm de diâmetro) na tíbia direita de ambos os grupos, enquanto que a tíbia contralateral permaneceu sem defeito. Oito dias após a criação do defeito ósseo, que correspondeu a 56 dias após o início da administração de cafeína, os animais foram mortos e os espécimes processados para obtenção de seções histológicas descalcificadas da mandíbula e tíbias. A área do ligamento periodontal e/ou perda óssea na região de furca do primeiro molar, a porcentagem do osso neoformado na tíbia direita e a densidade óssea da tíbia esquerda foram avaliadas histometricamente. Os resultados demonstraram que a ingestão crônica de altas doses de cafeína não apresentou efeito direto na perda óssea alveolar nos molares sem ligadura ( $p>0,05$ ); porém, foi capaz de aumentar a área de perda óssea dos dentes que receberam ligadura ( $p<0,01$ ). O grupo que ingeriu cafeína também apresentou um menor reparo ósseo quando comparado aos animais do grupo sem cafeína ( $p< 0,001$ ), entretanto nenhuma alteração da densidade óssea foi observada ( $p>0,05$ ). Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a ingestão diária de altas doses de cafeína pode aumentar a perda óssea induzida por ligadura e causar distúrbios no reparo ósseo, embora não altere a densidade óssea em tíbias de ratos.

Palavras-chave: periodontite induzida por ligadura, reparo ósseo, cafeína, densidade óssea, fatores de risco.

## ABSTRACT

Although some studies have reported a negative influence of caffeine on bone metabolism, in addition, the findings are still controversy and there is no information about its effect on periodontal bone tissues. The objectives of this study were to evaluate the effects of high doses of caffeine on ligature-induced periodontitis and on bone healing and density in the tibia of rats. Twenty-four Wistar rats were assigned to one of the following groups: **non-caffeine** group, animals without caffeine ingestion and **caffeine** group that ingested 10mg/100g body weight/day of caffeine via drinking water for 56 days. Two weeks after the beginning of caffeine intake, one of the first mandibular molar was randomly assigned to receive a ligature, while the contralateral tooth was left unligated. Forty-eight days after the beginning of caffeine intake, corresponding to 34 days after ligature placement, a critical-size surgical defect (3mm of diameter) was created in the right tibia of both groups, while the contralateral tibia was left without defect. Eight days later the creation of the bone defect, corresponding to 56 days after the beginning of caffeine intake, the animals were sacrificed and the specimens processed in order to obtain histological decalcified sections of the jaw and the tibia. The area of periodontal ligament and/or bone loss in the furcation region of the first molars, the percentage of new bone formation in the right tibia and the bone density in the left tibia were histometrically determined. Caffeine intake did not present a direct effect on the alveolar bone loss in unligated teeth ( $p>0.05$ ); however, it produced a greater area of bone loss in the ligated teeth ( $p<0.05$ ). The caffeine group presented a significantly lower area of new bone formation, when compared to the non-caffeine group ( $p<0.001$ ). On the other hand, no alterations were observed in the bone density of the caffeine group ( $p>0.05$ ). In conclusion, the present study demonstrated that daily intake of high doses of caffeine may increase the ligature-induced bone loss and may cause disturbed bone healing, but does not alter bone density.

Key words: ligature-induced periodontitis, bone healing, caffeine, bone density, risk factors

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1 Doenças periodontais: definição e etiologia</b>	1
<b>1.2 Fatores de risco</b>	2
<b>1.3 Tecido ósseo</b>	3
<b>1.4 Cafeína</b>	4
1.4.1. Efeito da cafeína sobre o metabolismo ósseo	4
1.4.1.1. Estudos em animais	4
1.4.1.2. Estudos em humanos	5
1.4.1.3. Estudos <i>in vitro</i>	8
1.4.2. Cafeína como fator de risco para a doença periodontal e reparo ósseo	9
1.4.3. Justificativa	10
<b>2 PROPOSIÇÃO</b>	11
<b>3 ARTIGO 1</b>	12
<b>4 ARTIGO 2</b>	25
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	42
<b>6 CONCLUSÃO</b>	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	44
<b>ANEXO</b>	47

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças periodontais: definição e etiologia

Doenças periodontais são patologias infecciosas que desencadeiam um processo inflamatório nos tecidos de proteção (tecido gengival) e sustentação (osso, cimento e ligamento) do elemento dental (LINDHE, 1997).

A doença restrita ao tecido gengival é denominada gengivite, que pode ser transitória ou persistente, e pode ou não progredir para os tecidos de sustentação do dente. Estudos sobre gengivite experimental demonstraram que o acúmulo de biofilme bacteriano nas superfícies dos dentes resulta no desenvolvimento de um processo inflamatório circundante à gengiva (LÖE et al, 1965).

A periodontite, por sua vez, é um processo infeccioso que leva à destruição dos tecidos de proteção e suporte dos dentes e resulta, muitas vezes, na perda do elemento dental; considerada a principal causa de perda dental em indivíduos adultos. Em uma fase inicial, o tecido gengival responde ao acúmulo de biofilme com um processo inflamatório agudo que resulta em perda de colágeno perivascular. Subseqüentemente, esta lesão inicial progride e observa-se uma densa infiltração de linfócitos e outras células mononucleares, alteração funcional dos fibroblastos e contínua perda de tecido de proteção dental. A lesão estabelecida se distingue das fases anteriores pela predominância de plasmócitos e ausência de perda óssea. Essa lesão estabelecida pode permanecer estável por anos ou décadas, ou ainda pode progredir para uma lesão mais destrutiva. Os fatores que causam a progressão ainda não estão bem esclarecidos. A lesão avançada tem como principais características: a perda óssea alveolar, do ligamento periodontal e uma destruição mais evidente da arquitetura tecidual. Os principais sinais clínicos decorrentes deste processo inflamatório compreendem a profundidade de sondagem, sangramento marginal ou à sondagem, recessão gengival, supuração e mobilidade (PAGE et al., 1976).

A etiologia infecciosa, bem como as espécies bacterianas relacionadas à saúde periodontal ou às diferentes formas de doenças periodontais já foram amplamente estudadas por meio de diferentes técnicas microbiológicas. Neste contexto, tem sido sugerido que a composição do biofilme apresente um papel importante no início e na progressão das doenças periodontais (HAFAJEE & SOCRANSKY, 1994).

Associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de indivíduos com periodontite ou saúde periodontal foram analisadas por Socransky et al., em 1998. Os autores descreveram cinco complexos bacterianos principais no ambiente subgengival, além de ter sido proposta uma possível seqüência de colonização dessas espécies. Os três primeiros complexos são compostos por espécies compatíveis com saúde periodontal e demonstraram grande associação entre si. São eles: complexo roxo, que inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*; complexo amarelo, composto por um grupo de estreptococos (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus gordonii*); e complexo verde, formado pelas espécies *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a e b. Os complexos laranja e vermelho são formados por espécies consideradas patogênicas. O grupo laranja parece preceder a colonização pelo vermelho e foi dividido em dois subgrupos: um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. O último complexo a colonizar o biofilme subgengival, denominado vermelho, foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem e sangramento à sondagem e é composto pelas espécies *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* sorotipos 1 e 2) foram agrupadas em um novo complexo, denominado azul (SOCRANSKY & HAJAJEE, 2002).

## 1.2 Fatores de risco

Embora o biofilme bacteriano específico seja responsável pelo estabelecimento e progressão das doenças periodontais, estudos clínicos e em animais têm demonstrado que fatores sistêmicos como: diabetes melitos, o consumo de cigarros, estresse e osteoporose podem desempenhar um importante papel na exacerbação da resposta do hospedeiro frente ao desafio bacteriano (GROSSI et al., 1995). Por este motivo, a influência destes fatores na doença periodontal tem sido amplamente investigada (ALBANDAR, 2002; RYAN et al., 2003; JOHNSON & HILL, 2004; LERNER, 2006).

Resumidamente, o estabelecimento e progressão da infecção periodontal podem ser modificados por diversas condições locais ou sistêmicas. Condições de risco sistêmicas têm sido identificadas por meio de vários estudos epidemiológicos que utilizam análises estatísticas para corrigir fatores de confundimento ou associar co-fatores de risco. Os fatores de risco reconhecidos atualmente são: diabetes melitos, especialmente em indivíduos com controle glicêmico deficiente, e fumo. Existem ainda os chamados determinantes de risco associados à doença periodontal dentre eles, o gênero, no qual homens apresentam mais doença; idade, com maior ocorrência da doença em idosos e fatores genéticos, como polimorfismos de mediadores inflamatórios (GENCO et al., 1996). Outros estudos apontam fatores como indicadores de risco, como o “stress”, consumo de bebidas alcoólicas e osteopenia e osteoporose (ALBANDAR, 2002; LERNER, 2006).

### **1.3 Tecido ósseo**

O tecido ósseo é altamente especializado e dinâmico, constituído por células específicas, matriz mineralizada e não mineralizada, e espaços que incluem a medula óssea, canais vasculares, canalículos e trabéculas. O osso é um tecido vivo em constante remodelação, não somente durante a fase de crescimento do esqueleto, mas também em toda a vida adulta. Durante o desenvolvimento, o esqueleto é esculpido de maneira a ganhar forma e tamanho pela remoção de osso de um sítio e deposição em outro, processo esse chamado de modelação. Uma vez que o esqueleto atinge a maturidade, o processo continua, porém, neste instante, substituindo no mesmo sítio um osso antigo por um mais recente. Esse processo denomina-se remodelação (LERNER, 2006).

Os osteoblastos são células especializadas derivadas do mesênquima que tem a função de deposição e manutenção do tecido ósseo. São responsáveis pela produção de proteínas da matriz óssea, formas de fosfatase alcalina e receptores do hormônio da paratireóide. As proteínas da matriz óssea incluem colágeno tipo I e outras que, em maior ou menor quantidade, apenas são expressas no tecido ósseo. A osteocalcina é considerada a mais específica proteína não colágena do osso. A sua expressão em adultos é restrita ao osso, dentina e cimento. Os osteócitos são células mais diferenciadas da linhagem dos osteoblastos e podem permanecer na matriz óssea por longos períodos. Embora sua função não esteja ainda completamente esclarecida, diversas evidências apontam que estas células possuem um papel crítico na manutenção da massa óssea (HUGHES et al., 2006).

Osteoclastos maduros são células geralmente grandes (50 a 100µm de diâmetro), multinucleadas, com muitas mitocôndrias e numerosos lisossomos. O componente mineral da matriz é dissolvido por ácidos dentro dos sítios de reabsorção que se formam através de projeções da membrana dos osteoclastos. Os componentes da matriz degradada são endocitados para o interior do osteoclasto e liberados para o exterior através da membrana do lado oposto ao que está ocorrendo a reabsorção (MANOLAGAS, 2000).

A base para o processo de remodelação é a atividade de formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção pelos osteoclastos. Em condições fisiológicas essas duas atividades agem simultaneamente, ou seja, a quantidade de osso formada pelos osteoblastos é a mesma reabsorvida pelos osteoclastos. Em condições patológicas, por sua vez, esse desequilíbrio pode gerar a perda de massa óssea por uma produção ineficiente ou pelo excesso de reabsorção (LERNER, 2006). Dentre as substâncias investigadas como fator de risco para osteopenia e osteoporose está a cafeína, que pode apresentar efeitos negativos ou deletérios sobre o metabolismo ósseo (KIEL et al., 1990; KAMAGATA-KIYOURA et al., 1999).

## **1.4 Cafeína**

A cafeína (1, 3, 7 trimetilxantina) é uma das substâncias farmacologicamente ativa mais consumida pela população e pode estar presente na dieta de diversas formas, como por exemplo: café, chás, refrigerantes, energéticos e medicamentos. São encontrados indícios que a cafeína pode ter efeitos de estimulação sobre sistema nervoso central e musculatura cardíaca, efeito diurético e relaxamento da musculatura lisa (GLAJCHEN et al., 1988). Tem sido observado ainda que a cafeína apresenta capacidade de estimular a perda óssea, diminuindo a sua densidade mineral e aumentando o risco de fraturas (HERNANDEZ-AVILA et al., 1991; BARRETT-CONNOR et al., 1994; MEYER et al., 1997; RAPURI et al., 2001; HUANG et al., 2002; OHTA et al., 2002; TUCKER et al., 2006).

### *1.4.1. Efeito da cafeína sobre o metabolismo ósseo*

#### *1.4.1.1 Estudos em animais*

Yeh et al. (1986) avaliaram o efeito da cafeína sobre o metabolismo do cálcio. Foram administradas, diariamente, duas concentrações de cafeína (2,5mg e 10mg/100g de peso) pela via subcutânea durante 3 semanas. Os autores observaram um aumento da excreção fecal e

urinária de cálcio no grupo que recebeu cafeína quando comparado ao grupo controle. Embora a excreção tenha sido aumentada pela cafeína, os autores também relataram que os níveis de cálcio permaneciam normais no organismo devido a um efeito compensatório do aumento da absorção intestinal.

Evidências sobre o efeito da cafeína no metabolismo ósseo foram demonstradas por Glajchen et al., em 1988. Os autores realizaram um estudo histomorfométrico e também análises de marcadores séricos de metabolismo ósseo (osteocalcina e paratormônio), em ratos que receberam durante 8 semanas duas doses de cafeína (2,5 e 10mg/100g de peso). Os autores observaram que, embora a administração crônica de cafeína tenha aumentado ligeiramente o remodelamento ósseo, evidenciado pelo aumento da osteocalcina no sangue; as análises histomorfométricas demonstraram que o tecido ósseo não foi alterado pela administração das diferentes doses de cafeína.

Em outro estudo realizado em ratos durante seis semanas, foi avaliado o efeito da ingestão de diferentes doses de cafeína (3, 25 e 100mg/kg por dia) nas concentrações de fluoretos, cálcio e fósforo, por meio de exames de urina, sangue e fezes. Também foi relatado um aumento na excreção urinária de cálcio. No entanto, este efeito não foi suficiente para influenciar significativamente o equilíbrio do cálcio no organismo (CHEN & WHITFORD, 1999).

Mais recentemente, Huang et al., em 2002, avaliaram a possibilidade de exercícios físicos antagonizarem os efeitos deletérios da cafeína sobre o metabolismo ósseo. A cafeína foi administrada aos ratos na água de beber na concentração de 10mg/100g de peso por 10 semanas e os animais foram divididos em quatro grupos: sem cafeína e sem exercício, sem cafeína e com exercício, com cafeína e com exercício e, com cafeína e sem exercício. Os autores demonstraram que o tratamento com altas doses de cafeína provocou alterações no tecido ósseo, incluindo a baixa densidade mineral e um efeito prejudicial na quantidade de cálcio contida no osso. O programa de exercício utilizado neste estudo não interferiu nos efeitos negativos causados pela cafeína.

#### *1.4.1.2 Estudos em humanos*

Em humanos, a ingestão de cafeína tem sido associada à baixa densidade mineral óssea e maior risco de fraturas.

Hernandes-Avila et al. (1991) avaliaram as possíveis associações entre fraturas de antebraço e quadril e o consumo moderado de álcool e cafeína por meio de um questionário



sobre dieta aplicado a mulheres americanas de meia idade (34-59 anos). Os autores observaram que a ingestão de cafeína apresentou uma relação positiva com o risco de fratura de quadril, mas não com fratura de antebraço e concluíram que a ingestão de cafeína e o consumo moderado de álcool aumentam o risco de fraturas em mulheres nessa faixa etária.

Resultados contrários aos encontrados por Hernandez-Avila et al. (1991) foram descritos por Lloyd et al., em 1997. Neste estudo, foi avaliado o efeito da ingestão de cafeína na densidade óssea dos quadris e do esqueleto de 138 mulheres saudáveis, no estado pós-menopausa, com faixa etária de 55 a 70 anos de idade e que nunca haviam sido submetidas à terapia de reposição hormonal ou que a tivesse usado no último ano. As mulheres foram divididas em três grupos: baixa (0 a 2 copos de café cafeinado), moderada (3 a 4 copos) ou alta ( $\geq 5$  copos) ingestão de cafeína. A ingestão de cafeína variou entre 0 e 1400 mg/dia e não foi observada associação com a baixa densidade óssea corpórea ou do quadril e nenhuma alteração nos valores de densidade óssea foi encontrada. Assim, os autores sugerem que a ingestão de cafeína não é um fator de risco para perda óssea em mulheres saudáveis na pós-menopausa.

Massey e Whiting (1993) realizaram uma revisão de literatura sobre o papel da ingestão de cafeína na excreção de cálcio e, portanto, no metabolismo ósseo. Os autores relataram que em pelo menos 3 horas após a ingestão de cafeína, ocorre um aumento na excreção de cálcio, magnésio, sódio e cloreto. Ao comparar dados epidemiológicos em animais e em humanos, os autores sugerem que, para mulheres jovens que consomem uma boa quantidade de cálcio, moderadas doses de cafeína podem ter um pequeno ou nenhum efeito danoso; uma vez que o aumento da excreção urinária e fecal de cálcio pode ser compensado por um aumento na absorção intestinal. Porém, mulheres idosas não conseguem manter o equilíbrio entre excreção de cálcio e ingestão de cafeína, principalmente quando o consumo de cálcio é abaixo do recomendado. Assim, o desequilíbrio no metabolismo de cálcio pode atuar como fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose.

Mais recentemente, Conlisk e Galuska (2000) realizaram um estudo transversal para observar a relação entre a ingestão de cafeína e a densidade óssea em mulheres jovens. Neste estudo foram avaliadas 177 mulheres brancas e saudáveis, na faixa etária entre 19 e 26 anos. Por meio de um questionário, foram obtidas informações sobre o consumo de café, café descafeinado, chás, refrigerantes à base de cola, chocolates e medicamentos durante os 12 meses prévios. A densidade óssea foi obtida por meio de análises radiográficas da espinha lombar e pescoço. Depois de ajustes estatísticos para variáveis de confundimento como altura,

massa corpórea, ingestão de álcool, cálcio, proteínas e tabaco, os autores concluíram que a ingestão de cafeína não é um fator de risco importante para diminuição da densidade óssea em mulheres jovens.

Rapuri et al. (2001) estudaram o papel da cafeína como fator de risco para perda óssea. Os autores observaram a influência da ingestão de altas ( $>300\text{mg}/\text{dia}$ ) e baixas ( $\leq 300\text{mg}/\text{dia}$ ) doses de cafeína na perda óssea em mulheres idosas (65-77anos) em um estudo longitudinal realizado durante três anos. As mulheres que consumiam altas doses de cafeína apresentaram uma taxa significativamente maior de perda óssea quando comparadas às mulheres que consumiam baixas doses do produto. Os autores concluíram que uma ingestão de cafeína superior a 300 mg/dia pode causar perda óssea.

Resultados contraditórios aos anteriores foram descritos por Ilich et al. (2002) que relacionaram o consumo de bebidas alcoólicas, cafeína e a condição de ex-fumante com a densidade óssea em mulheres idosas. Foram avaliadas, por questionários, 136 mulheres caucasianas saudáveis com a média de idade de  $68,6 \pm 7,1$  anos que não faziam uso de medicamentos que pudessem afetar o tecido ósseo, inclusive o estrogênio. A ingestão de cálcio também foi medida por meio de questionários. As frequências de ingestão de cafeína e álcool e a quantidade de cigarros foram associadas a exames de densidade óssea em várias regiões do esqueleto. O consumo de altos níveis de cafeína (200-300mg/dia) não apresentou uma associação com a densidade óssea na maioria dos locais do esqueleto. Os autores concluíram que o consumo de pouca ou moderada quantidade de álcool está associado à baixa densidade mineral óssea, enquanto que a ingestão de cafeína e a história de tabagismo não estão relacionadas e ainda podem ser atenuadas pela ingestão de altas concentrações de cálcio.

Ausência de efeito da cafeína sobre o tecido ósseo também foi relatado por Rico et al. (2002) que avaliaram os efeitos da cafeína, vitamina D e outros nutrientes na massa óssea de 93 mulheres na pós-menopausa não-tabagistas, saudáveis ( $57,3 \pm 7,1$  de idade), que não receberam terapia de reposição hormonal e não praticavam nenhuma atividade física. As mulheres foram agrupadas conforme o consumo de cafeína ( $<100\text{mg}/\text{dia}$  e  $>100\text{mg}/\text{dia}$ ), vitamina D, cálcio e proteínas e, em seguida foram submetidas a uma ultra-sonografia óssea quantitativa. A única variável que alterou de forma significativa a quantidade de tecido ósseo nas mulheres foi o consumo de vitamina D. Os autores atribuíram a ausência de efeito da cafeína e das outras substâncias testadas sobre a densidade óssea, aos baixos níveis de consumo dos mesmos e ao bom padrão nutricional das mulheres envolvidas no estudo.

Embora os efeitos da cafeína no tecido ósseo ainda permaneçam controversos, o consumo desta substância tem sido considerado um fator de risco para diminuição da densidade óssea (BARRET-CONNOR et al., 1994), para o aumento de risco de fraturas (HERNANDEZ-AVILA et al., 1991), e também pode influenciar negativamente a retenção de cálcio (CUMMINGS et al., 1995; MEYER et al., 1997).

#### 1.4.1.3 Estudos *in vitro*

Estudos recentes têm investigado os mecanismos celulares e moleculares sobre o papel da cafeína no tecido ósseo. Tsuang et al. (2006) investigaram a influência do efeito de concentrações de cafeína no comportamento de osteoblastos provenientes de ratos neonatos e mantidos em cultura com cafeína durante 14 dias. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa na viabilidade de osteoblastos, na formação de colônias e na formação de nódulos/núcleos de mineralização, demonstrando que a cafeína apresenta a capacidade de induzir apoptose destas células *in vitro*.

O efeito deletério da cafeína no metabolismo ósseo também foi demonstrado em outros estudos *in vitro*, acredita-se que a interação desta substância com receptores de vitamina D (RVD) possa ser um possível mecanismo. A vitamina D possui um papel crítico na regulação do metabolismo ósseo e sua ação se deve à interação da mesma com receptores específicos que são encontrados em células osteoblásticas. Rapuri et al. (2007) testaram o efeito da cafeína na expressão do RVD e observaram a ação da vitamina D no osso. Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes doses de cafeína (0,2; 0,5; 1 e 10mM) na expressão do RVD em osteoblastos humanos, e na atividade de fosfatase alcalina, que é reconhecidamente um marcador de atividade osteoblástica. Foram observadas diminuição dose-dependente da expressão de RVD e inibição da atividade de fosfatase alcalina, que não foi revertida pela vitamina D. Os autores sugeriram que a cafeína afeta o metabolismo ósseo por interferir na expressão do RVD e na ação da vitamina D nas células osteoblásticas de humanos.

Focking et al., em 2005, sugeriram que o efeito da cafeína sobre tecido ósseo pode estar associado ao receptor de glucocorticóide (RG), considerado um dos principais fatores na indução de osteoporose. Os autores observaram um aumento nos níveis de RNA mensageiro para RG em osteoblastos humanos mantidos em cultura com diferentes concentrações de cafeína. Este resultado sugere que o mecanismo molecular pelo qual a cafeína atua como um

fator de risco para osteoporose pode ser via expressão gênica de RG em células osteoblásticas humanas.

#### 1.4.2 Cafeína como fator de risco para a doença periodontal e reparo ósseo

Embora existam algumas evidências da influência negativa da cafeína no tecido ósseo, não são encontradas na literatura informações sobre o efeito de seu consumo crônico na doença periodontal, patologia esta que possui como principal consequência a perda de osso alveolar. Apenas dois estudos podem ser indiretamente relacionados com a perda óssea em casos de infecção periodontal.

Kamagata-Kiyoura et al., em 1999, avaliaram a possível interação entre cafeína e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que tem sido encontrada em níveis elevados em sítios com doenças periodontais, em cultura de osteoblastos provenientes de ratos. Os resultados demonstraram que a associação de PGE<sub>2</sub> e cafeína inibiu a proliferação osteoblástica, enquanto ambos agentes separadamente também tiveram efeito inibitório nestas células quando em altas concentrações. Assim, os autores levantaram pela primeira vez a hipótese de que a cafeína pode acelerar a perda óssea periodontal, constituindo um fator de risco para a progressão dessa doença.

Sakamoto et al. (2001) verificaram os efeitos do consumo do café com altas e baixas doses de cafeína no metabolismo ósseo por meio da avaliação dos níveis de marcadores bioquímicos presentes na urina (cálcio, fósforo, creatinina, osteocalcina) e análises histomorfométricas em ratos. Concomitantemente, os autores também investigaram os níveis de citocinas relacionadas à reabsorção óssea, TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e IL-6 (interleucina-6), na presença de cafeína e após 2 horas de uma estimulação por LPS (lipopolissacarídeos). Com a ingestão da cafeína, foi observado apenas um aumento na excreção de fósforo. Os autores não observaram alterações histomorfométricas na presença de cafeína e o nível das citocinas não foi alterado pela ação dessa substância com ou sem o estímulo por LPS.

Evidências científicas sobre o efeito da cafeína no reparo ósseo são ainda mais escassas. O reparo do tecido ósseo apresenta grande importância em medicina e odontologia no que diz respeito à neoformação óssea em casos de fratura, alvéolos pós-extração dental e osseointegração de implantes ortopédicos e dentais.

O isolamento das variáveis de confundimento como peso, estilo de vida, doenças sistêmicas, nível de “stress” permanece como um grande desafio para os estudos clínicos que visam avaliar a influência de um fator específico sobre o metabolismo ósseo ou doença periodontal. Desta forma, os estudos em animais podem oferecer a vantagem de avaliar a influência de um fator isolado de forma controlada, sem a interferência de outros possíveis fatores de risco.

#### 1.4.3 Justificativa:

Baseado nas evidências do alto consumo de produtos contendo cafeína pela população, nos indícios do efeito deletério dessa substância no tecido ósseo, no fato da periodontite culminar na perda óssea e na escassez de estudos sobre a relação entre doença periodontal e essa substância, parece importante avaliar o impacto do consumo crônico de cafeína no tecido ósseo periodontal. Além disso, considerando as controvérsias existentes sobre a influência da cafeína na densidade óssea e na ausência de estudos sobre o efeito da mesma no reparo ósseo, processo importante em diversas situações médicas e odontológicas, torna-se também relevante verificar o papel da cafeína na densidade e no reparo.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo avaliar, por meio de análise histométrica, a influência da ingestão crônica de altas doses de cafeína sobre a:

- 1- Perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.
- 2- Densidade e o reparo ósseo em um defeito crítico confeccionado em tíbias de ratos.

**3 ARTIGO 1****ADMINISTRATION OF HIGH DOSES OF CAFFEINE INCREASES ALVEOLAR BONE LOSS IN LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS IN RATS.**

Aceito para publicação no *Journal of Peridontology* (doi: 10.1902/jop.2008.080204)

**ADMINISTRATION OF HIGH DOSES OF CAFFEINE INCREASES ALVEOLAR BONE LOSS IN LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS IN RATS.**

Joyce Pinho Bezerra, DDS, MS program<sup>1</sup>

Luiz Ricardo Ferreira da Silva, DDS student\*

Vanessa Adélia de Alvarenga Lemos, BSc student <sup>2</sup>

Poliana Mendes Duarte, DDS, MS, PhD Assistant Professor\*

Marta Ferreira Bastos, BMSc, MS, PhD Assistant Professor\*

**Corresponding author:** Marta Ferreira Bastos

Rua Dr. Nilo Peçanha, n. 81 - Prédio U - 6º Andar - Centro – Guarulhos

CEP: 07.023-070 – SP/ Phone: ++ 55 11 64641769 - Fax: ++ 55 11 64641758

E-mail: mfbastos@prof.ung.br (e-mail to be published)

**Financial Support:** no support

**Conflict of interest:** There is no conflict of interest.

**Number of figures:** 3

**Word count:** 1995

**Short running title:** Caffeine and ligature-induced periodontitis

**Sentence summary:** The present study demonstrated that chronic intake of high doses of caffeine may increase ligature-induced periodontitis.

---

<sup>1</sup> Department of Periodontics, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Biosciences Laboratories, Biological Science Division, Guarulhos University, Guarulhos, São Paulo, Brazil.



## ABSTRACT

**Background data:** Although some studies have reported a negative influence of caffeine on bone metabolism, there is no information about its effect on periodontal tissues.

**Objective:** The aim this study was to evaluate the effect of high doses of caffeine on ligature-induced periodontitis in rats.

**Methods:** Twenty-two Wistar rats were assigned to one of the following groups: **Non-caffeine group** (n=12): animals without caffeine ingestion; **Caffeine group** (n=10): 10mg/100g body weight/day of caffeine via drinking water for 56 days. Two weeks after the beginning of caffeine intake, one of the mandibular molar was randomly assigned to receive a ligature, while the contralateral tooth was left unligated. Forty-two days later, the animals were sacrificed and the specimens processed in order to obtain decalcified sections. The area of periodontal ligament and/or bone loss in the furcation region of the first molars was histometrically determined.

**Results:** Caffeine intake did not present a direct effect on the alveolar bone loss in unligated teeth. On the other hand, a greater area of bone loss was observed in the ligated teeth of the animals that ingested caffeine when compared to control animals ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In conclusion, the present study demonstrated that daily intake of high doses of caffeine may enhance the ligature-induced periodontitis.

**Key Words:** alveolar bone, caffeine, periodontitis, rat.

## INTRODUCTION

Periodontitis is an infectious disease characterized by the inflammation of the periodontal supporting tissues, resulting in attachment loss and alveolar bone resorption<sup>1</sup>. Pathogenic bacteria are well established as the etiological agents of the periodontal diseases<sup>2</sup>; however previous studies have demonstrated that systemic and environmental risk factors, such as smoking, diabetes and osteoporosis may modulate periodontal disease progression and severity<sup>3-6</sup>.

Caffeine, 1, 3, 7-trimethylxanthine, is one of the most commonly ingested psychoactive compound in the world, being the major component in beverages, foods and medications. The hypothesis that caffeine may have an influence on bone metabolism was tested in a series of laboratory, animal and clinical studies<sup>7-12</sup>. In general, these studies have demonstrated some negative effect of caffeine on bone metabolism when applying evaluations such as bone cell viability, histomorphometry and bone mineral index<sup>7-12</sup>.

Although some systemic factors have been recognized as a risk for periodontal diseases, no study to date has evaluated the influence of caffeine consumption on alveolar bone loss. Since caffeine could exert a negative influence on bone tissues and, the loss of alveolar bone is one of the most important hallmarks in periodontitis, it was hypothesized that caffeine could be an aggravating factor in periodontal bone loss. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of high doses of caffeine on ligature-induced periodontitis in rats.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

The University of Guarulhos Institutional Animal Care and Use Committee previously approved this protocol. Twenty-two male Wistar rats, obtained from the Butantan Institute (São Paulo, Brazil), were included in this study. The rats were 90 days of age and weighed approximately 330 ±33g at the beginning of the study. During the acclimatization (5 days) and experimental period (56 days), each animal was housed alone in plastic cages with access to food<sup>3</sup> and drinking water *ad libitum* in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University.

### *Experimental design*

The animals were randomly assigned to one of the following two groups: **Non-caffeine group** (n=12); animals without caffeine ingestion; (n=10); **Caffeine group** ingestion of

---

<sup>3</sup> Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil

10mg/100g body weight/day of caffeine<sup>4</sup> was administered via drinking water for 56 days. The caffeine intake was determined by adjusting its concentration in the water on the first, third and fifth day of each week throughout the experimental period. To ensure complete consumption of the established dose, the volume of caffeine-supplemented water offered was determined by the amount of water consumed on the previous day.

### ***Ligature placement***

Two weeks after the beginning of caffeine intake, general anesthesia was obtained by intraperitoneal administration of xylazin (10 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg). One of the mandibular first molars of each animal was randomly assigned to receive a cotton ligature in a cervical position in order to induce experimental periodontitis (Figure 1). The contralateral tooth was left unligated to be used as a control.

### ***Histologic and histometric procedures***

Forty-two days after the ligature placement, the animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation. Subsequently, the jaws were removed and fixed in 10% buffered formalin for 48 hours. The specimens were decalcified in a solution containing 10% ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA), dehydrated in an ascending series of ethanol solution and embedded in paraffin. Serial sections (5 µm) were obtained in a mesiodistal direction and stained with hematoxylin and eosin solutions. After excluding the first and last sections in which the furcation area was evident, ten equally distant sections of each molar were chosen for histometric evaluation. The images of the first molar were photographed and the area of periodontal ligament and/or bone loss in the furcation of both first molars was histometrically determined by the same trained, calibrated and blinded examiner using an image system<sup>5</sup>.

### ***Statistical analyses***

In order to test the hypothesis that caffeine had no influence on interradicular bone loss, an intergroup analysis was performed by Student's *t*-test. In addition, the paired Student's *t*-test was used for intragroup comparisons between ligated and unligated teeth. The significance level established for all analyses was 1% ( $p < 0.01$ ).

---

<sup>4</sup> Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>5</sup> Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA

## RESULTS

All animals gained weight during the study. The mean body weight did not show statistically significant differences between caffeine and non-caffeine groups on day 56 ( $p=0.27$ ). The final mean body weight was  $412.8 \pm 47.6$  g and  $387.8 \pm 53.3$  g for control and test groups, respectively. A significant difference in the bone loss of the furcation area between unligated and ligated teeth was observed for the two experimental groups ( $p < 0.0001$  for non-caffeine group and,  $p=0.0006$  for caffeine group), showing that the cotton ligatures around the teeth were able to induce bone loss. Caffeine intake did not present a significant effect on the alveolar bone loss in unligated teeth ( $p=0.1756$ ). The periodontal ligament areas observed in unligated teeth were  $0.15 \pm 0.05$  mm<sup>2</sup> and  $0.18 \pm 0.06$  mm<sup>2</sup> for the non-caffeine and caffeine groups, respectively. On the other hand, a greater area of bone loss was observed in the ligated teeth of the animals that ingested caffeine when compared to control animals ( $p=0.0025$ ). The bone loss areas in the ligated teeth were  $0.68 \pm 0.38$  mm<sup>2</sup> and  $1.49 \pm 0.85$  mm<sup>2</sup> for the non-caffeine and caffeine groups, respectively (Figure 2). Figures 3A to 3D illustrate the histological findings. Figures 3A and 3C show the periodontal ligament and absence of interradicular bone loss in the furcation area of unligated teeth from non-caffeine and caffeine groups, respectively. Figures 3B and 3D illustrate the interradicular bone loss induced by ligature in non-caffeine and caffeine groups, respectively; and an increased bone loss in the test group when compared to control group.

## DISCUSSION

It is well recognized that host risk factors such as genetics, age, gender, lifestyle habits, and certain systemic diseases can contribute to the pathogenesis of periodontal diseases, increasing soft tissue and alveolar bone destruction<sup>3-6</sup>. Some investigations<sup>7-12</sup> have been performed to assess the impact of caffeine and/or coffee consumption on bone metabolism by clinical trials and experimental models. Although these studies<sup>7-12</sup> have already reported a negative influence of caffeine on bone metabolism, the results of the present study contribute to the original information regarding the effect of daily intake of high doses of caffeine on ligature-induced periodontitis.

Data suggest that caffeine ingestion increase ligature-induced periodontitis, even though caffeine was not able to induce alveolar bone loss in the absence of cotton ligature. To date, there are no clinical and animal studies that evaluate the relationship between caffeine intake and periodontitis, hampering a more direct comparison with the present results. Several studies have demonstrated that bone resorption in periodontitis is mediated by increased

levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-1, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand<sup>13-14</sup> and prostaglandin (PG) E<sub>2</sub><sup>15</sup>, which are released from macrophages and other cells stimulated by pathogens. Sakamoto et al.<sup>16</sup> evaluated the effect of coffee ingestion on TNF- $\alpha$  and IL-6 production after lipopolysaccharide (LPS) stimulation in rats. The authors demonstrated that serum levels of these cytokines were markedly increased at 2 hours after injection of LPS; however, coffee consumption had no effect on the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 with or without LPS injection. It is important to highlight that Sakamoto et al.<sup>16</sup> administered a lower dose of caffeine, when compared to our study, and performed an acute LPS stimulation; while in the present study there was a chronic stimulus of the ligature. In support of our results, Kamagata-Kiyoura et al.<sup>17</sup> demonstrated that the association of high or low concentration of caffeine and PGE<sub>2</sub> strongly inhibited the proliferation of osteoblast-like cells in vitro. Interestingly, high concentrations of both caffeine and PGE<sub>2</sub> alone had also an inhibitory effect on the proliferation of these cells.

The effects of caffeine on bone metabolism are not fully understood. Similarly to Kamagata-Kiyoura et al. (1999)<sup>17</sup>, other in vitro studies have also demonstrated that caffeine inhibits the proliferation of osteoblast-like cells and has deleterious effects on the viability of osteoblast, increasing the rate of apoptosis of these cells<sup>11</sup>. In addition, since caffeine decreased the vitamin D receptor (VDR) expression in osteoblast-like cell lines, it could be a potential agent to interfere on molecular mechanisms of bone loss<sup>12</sup>. In rats, high doses of caffeine have been related to increased bone turnover by evaluating the serum osteocalcin levels<sup>18</sup> and, have been associated with reduction in the bone mineral content<sup>8,10</sup>. Epidemiological studies have demonstrated that caffeine consumption has no association with bone loss in younger women<sup>19</sup>, but could exert a negative influence on bone density in elderly women<sup>7, 9</sup>. This phenomenon could be explained by the fact that chronic ingestion of caffeine increases the levels of urinary calcium excretion<sup>20-21</sup> and the intestinal calcium absorption efficiency decreases with age, leading to calcium imbalance in elderly subjects<sup>22-23</sup>.

In the present study, the adjustment of caffeine dosage and its daily administration in drinking water were performed in order to closely simulate chronic caffeine consumption in humans<sup>21</sup>. The high dose of caffeine used in this study is in agreement with other studies that have evaluated the effect of caffeine on bone tissue<sup>10,18</sup>. According to these previous investigations<sup>10, 18</sup>, the total amount of caffeine that was administered daily in our study (10mg/100g body weight) was equivalent to 1360mg/70 kg<sup>0.75</sup> in humans, when the conversion is based on the metabolic body weight (kg<sup>0.75</sup>). Since the average caffeine amount

in coffee is 85 mg/cup, the dosage used was equivalent to the consumption of 16 cups of coffee per day.

Clinical studies<sup>24-25</sup> evaluating the effects of caffeine on bone metabolism have faced various confounding factors. First, it is problematic to determine the daily caffeine intake levels, due to the variation of caffeine content in the commercial products (e.g., coffees, teas and colas) and the inaccurate patient self-report about caffeine consumption. In addition, there is co-occurrence of confounding variables, such as consumption of cigarettes, alcohol and osteoporosis with caffeine intake among the population. It is recognized, for example, that cigarette smokers tend to consume more caffeine than non-smokers<sup>22-23</sup>. Therefore, in a periodontal clinical study, the relationship between caffeine ingestion and periodontitis may be difficult to evaluate because coffee consumption is associated with other risk factors for periodontal disease, mainly smoking habits. Although a variety of statistical analytic techniques have been used to identify and overcome the influence of these factors, in animal studies such confounders may be more precisely controlled.

In conclusion, the present study demonstrated, in rats, that daily intake of high doses of caffeine increases ligature-induced periodontitis. Therefore, caffeine may be a critical factor to periodontal tissue breakdown, possibly accelerating the bone loss of periodontitis patients.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

The authors greatly appreciated the assistance of the laboratory technicians from Biological Sciences Division at Guarulhos University: Paulo César Simões Silva, for helping with the histological procedures and, Rogério Tadeu Barreira, for technical support with animal care. There is no conflict of interest related to this study.

**REFERENCES**

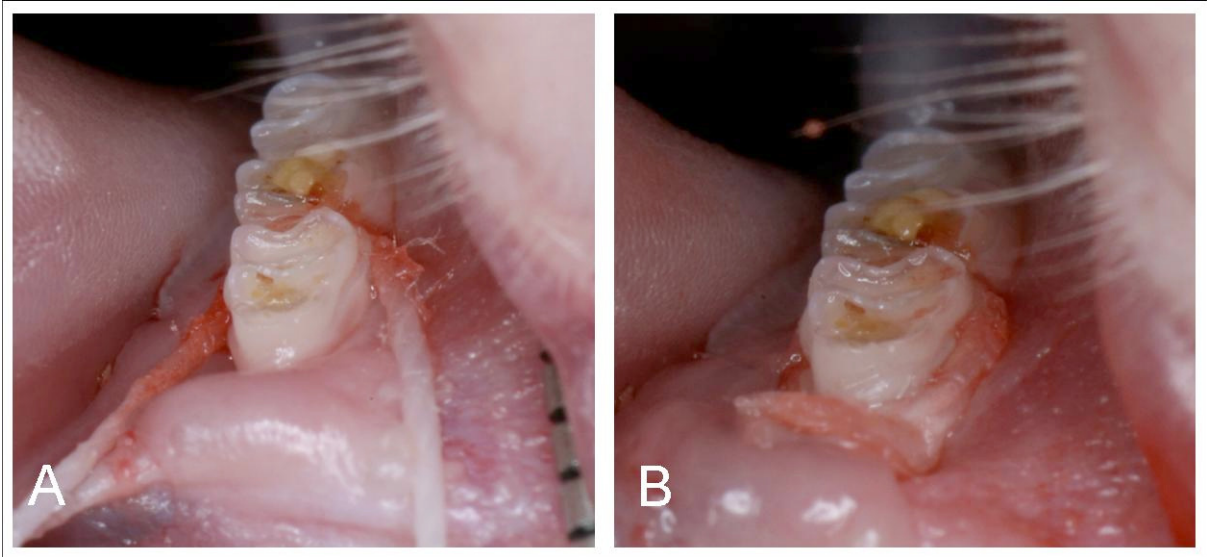
- 1- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34: 235-249.
- 2- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5:78-111.
- 3- Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; 29: 177-206.
- 4- Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004; 75:196-209.
- 5- Ryan ME, Carnu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc* 2003; 134 Spec No: 34S-40S.
- 6- Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006; 85:596-607.
- 7- Cooper C, Atkinson EJ, Wahner HW et al. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 7: 465-471.
- 8- Chen X, Whitford GM. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 33-39.
- 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.
- 10- 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: 293-299.
- 11- 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.
- 12- Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 368-371.
- 13- Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 370-376.

- 14- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401.
- 15- Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 1986; 21: 101-112.
- 16- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 2001; 28: 332-336.
- 17- 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: 283-288.
- 18- Glajchen N, Ismail F, Epstein S, Jowell PS, Fallon 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: 277-280.
- 19- Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med* 2000; 31:562-8.
- 20- Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr*. 1993; 123:1611-1614.
- 21- 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: 273-280.
- 22- Avioli LV, McDonald JE, Lee SW. The influence of age on the intestinal absorption of <sup>47</sup>-Ca absorption in post-menopausal osteoporosis. *J Clin Invest* 1965; 44 (12): 1960-1967.
- 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: E769-774.
- 24- 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: 407-418.
- 25- Talcott GW, Poston WS 2nd, Haddock CK. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and caffeine in a retired military population. *Mil Med* 1998; 163:133-138.



**FIGURES**

Figure 1: A- Cotton ligature in the interproximal region between the first and second molars.  
B- Cotton ligature in a submarginal position of the mandibular first molar.



□Figure 2: Mean values and standard deviation ( $\text{mm}^2$ ) for the area of periodontal ligament for unligated teeth and area of interradicular bone loss for ligated teeth in both non-caffeine and caffeine groups. The symbol (\*) signifies that, in non-caffeine group, the mean area of bone loss in ligated teeth is significantly higher than that observed for unligated teeth by paired Student's *t* test (non-caffeine intragroup analysis). The symbol (#) demonstrates, in caffeine group, that the mean area of bone loss in ligated teeth is significantly higher than that observed in unligated teeth by paired Student's *t* test (caffeine intragroup analysis). In addition, the different symbols also represent that the mean area of bone loss in ligated teeth from non-caffeine group is significantly different than that observed in ligated teeth from caffeine group by unpaired Student's *t* test (intergroup analysis).

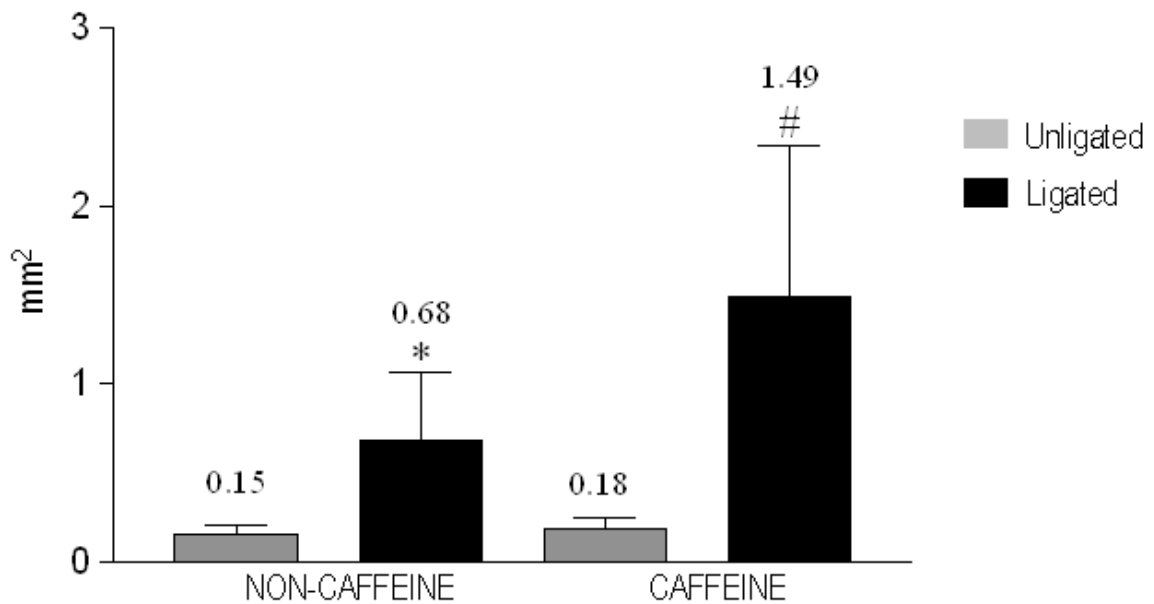
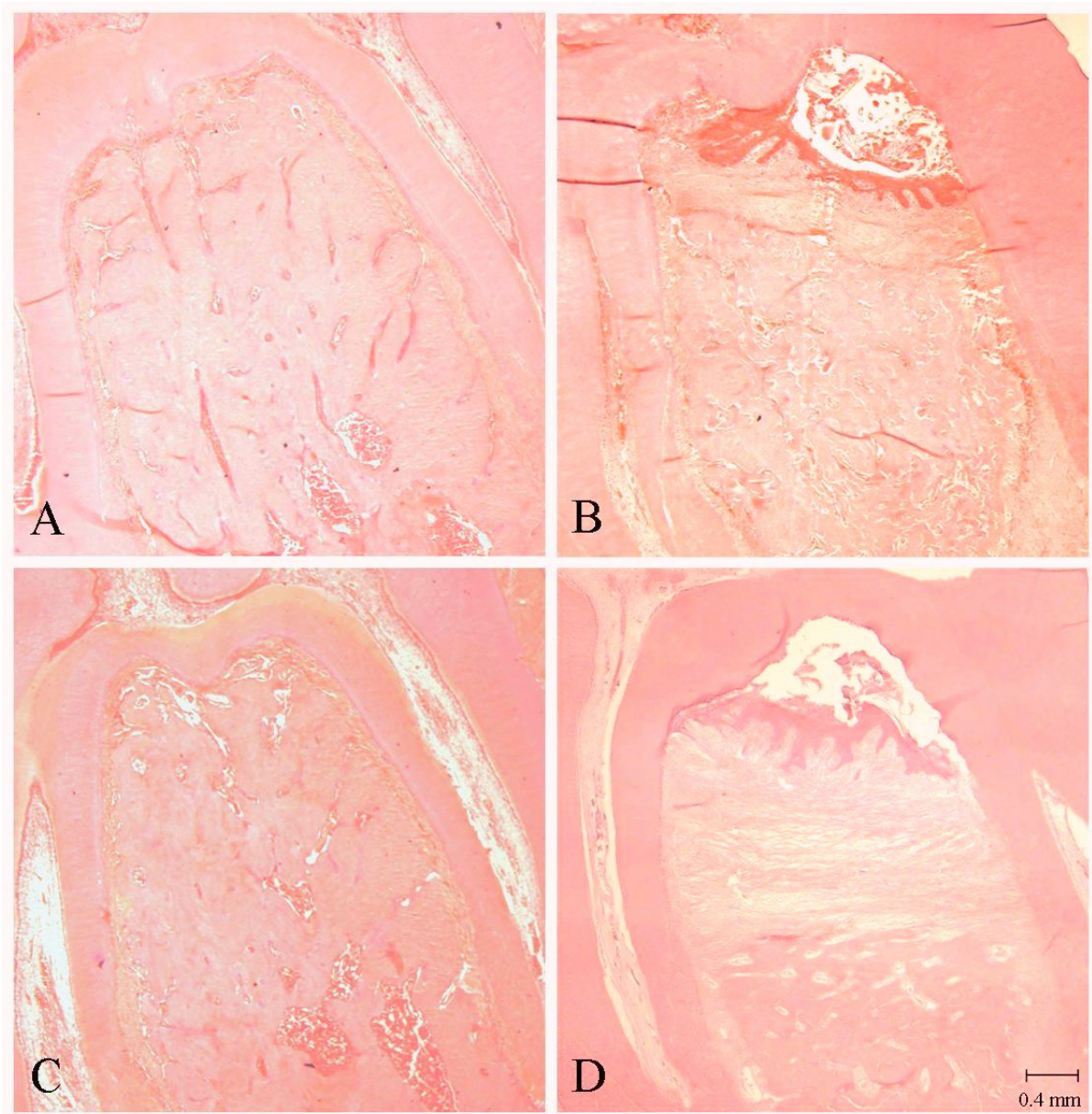


Figure 3: Photomicrographs illustrating periodontal ligament and bone loss in the furcation area of the mandibular molars for control and test groups. (A) Unligated tooth (non-caffeine group), (B) Ligated tooth (non-caffeine group), (C) Unligated tooth (caffeine group), (D) Ligated tooth (caffeine group). The figures 3A and 3C demonstrate the presence of the ligament area and absence of interradicular bone loss of unligated teeth from non-caffeine and caffeine groups, respectively. Figures 3B and 3D clearly show the interradicular bone loss induced by ligature in non-caffeine and caffeine groups, respectively. In addition, it can be observed an increased bone loss in the caffeine group (3D) when compared to non-caffeine group (3B).



**4 ARTIGO 2**

**EFFECT OF CAFFEINE ADMINISTRATION ON BONE DENSITY AND HEALING.  
A HISTOMETRIC STUDY IN RATS**

Submetido para apreciação pelo *Archives of Oral Biology*

**EFFECT OF CAFFEINE ADMINISTRATION ON BONE DENSITY AND HEALING.  
A HISTOMETRIC STUDY IN RATS**

Poliana Mendes Duarte, DDS, MS, PhD Assistant Professor <sup>1</sup>

Marcelo Rocha Marques, DDS, MS, PhD <sup>2</sup>

Joyce Pinho Bezerra, DDS, MS program <sup>1</sup>

Marta Ferreira Bastos, BMSc, MS, PhD Assistant Professor <sup>1</sup>

**Corresponding author:** Poliana Mendes Duarte

Rua Dr. Nilo Peçanha, n. 81 - Prédio U - 6º Andar - Centro – Guarulhos

CEP: 07.023-070 – SP/ Phone: ++ 55 11 64641769 - Fax: ++ 55 11 64641758

E-mail: pduarte@.ung.br (e-mail to be published)

**Financial Support:** no support

**Conflict of interest:** There is no conflict of interest.

**Number of figures:** 4

**Short running title:** Caffeine and bone density healing

**Sentence summary:** The present study demonstrated that chronic intake of high doses of caffeine have no influence on bone density but may negatively affect bone healing.

1- Department of Morphology, Division of Histology, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil.

2- Department of Periodontics, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, São Paulo, Brazil

## SUMMARY

The aim this study was to evaluate the effect of the daily administration of high doses of caffeine on bone healing and density in rats. Twenty-four Wistar rats were assigned to one of the following groups: **Non-caffeine group** (n=12): animals without caffeine ingestion; **Caffeine group** (n=12): 10mg/100g body weight/day of caffeine via drinking water for 56 days. Forty-eight days after the beginning of caffeine intake, a critical-size surgical defect was created in the right tibia of both groups, while the contralateral tibia was left without defect. Eight days later, the animals were sacrificed and the specimens processed in order to obtain decalcified sections. The area of new bone formation in the right tibia and the bone density in the left tibia were histometrically evaluated in the medular bone. At 8 days post-operative, the caffeine group presented a significantly lower area of new bone formation, when compared to the non-caffeine group ( $p<0.001$ ). No alterations were observed in the bone density of the caffeine group, when compared to the non-caffeine group. In conclusion, the present study demonstrated that a high daily caffeine intake may cause disturbed bone healing, but does not alter bone density.

**Key Words:** caffeine, bone healing, bone density, animal study.

## INTRODUCTION

For many decades, caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) and the related methylxanthines have been one of the most commonly consumed pharmacologically-active compounds, presenting a variety of effects on the biological system (Dews, 1982; Ilich et al., 2002). Due to the increased consumption of caffeine worldwide, its pharmacological or physiological effects have been extensively investigated. However, the benefits and drawbacks of the caffeine ingestion remain unclear (Watson et al., 2002; Reissig et al., 2008).

Some life styles and nutritional habits (i.e. caffeine, total calcium and vitamin D intake, alcohol use, physical activity and smoking) have been identified as factors that could contribute to the loss of bone mineral density (BMD) (Ilich et al., 2002; Rico et al., 2002; Tucker et al., 2006). The effects of caffeine intake on bone tissues have been assessed by some experimental and clinical studies and contradictory results have been found. While some studies have demonstrated that the consumption of caffeine is associated with a reduced BMD and an increased risk of fracture (Heaney, 2002; Tsuang et al., 2006); others have failed to find negative effects of caffeine intake on bone metabolism (Johansson et al., 1992; Barger-Lux and Heaney, 1995).

After a meticulous revision of the literature, it was noted that the impact of caffeine on bone density has been previously explored by some studies (Hasling et al., 1992; Massey et al., 1994; Lloyd et al., 1997; Conlisk and Galuska, 2000; Rapuri et al., 2001; Ilich et al., 2002; Heaney, 2002; Tucker et al., 2006); however, there are no recognized data relating its influence on bone healing. Among various clinical situations, bone density and bone healing may directly affect the risk and repair of fractures, skeletal fragility, orthopedic and dental implants and bone formation after a dental extraction. Therefore, since caffeine is ubiquitous in the modern diet, the aim of this study was to evaluate, by histometric analysis, the effect of the daily intake of high doses of caffeine on bone density and healing in the tibia of rats.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

The University of Guarulhos Institutional Animal Care and Use Committee previously approved this protocol. Twenty-four male Wistar rats, obtained from the Butantan Institute (São Paulo, Brazil), were included in this study. The rats were 90 days of age and weighed approximately  $330 \pm 33$ g at the beginning of the study. During the acclimatization (5 days)

and experimental period (56 days), each animal was housed alone in plastic cages with access to food (Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil) and drinking water *ad libitum* in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University.

### ***Experimental design***

The animals were randomly assigned to one of the following two groups: **Non-caffeine group** (n=12); animals without caffeine ingestion; (n=12); **Caffeine group** ingestion of 10mg/100g body weight/day of caffeine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) via drinking water for 56 days. The caffeine intake was determined by adjusting its concentration in the water on the first, third and fifth day of each week throughout the experimental period. To ensure complete consumption of the established dose, the volume of caffeine-supplemented water offered was determined by the amount of water consumed on the previous day.

### ***Bone healing and density***

Forty-eight (48) days after the beginning of caffeine intake, general anesthesia was obtained by intraperitoneal administration of xylazin (10 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg). The skin was cleansed with iodine surgical soap and an incision of approximately 1 cm in length was made in the upper area of the tibiae. A full thickness flap was reflected and the bone surface of the right tibiae was exposed. Under profuse saline solution irrigation, a unicortical circumferential critical-size defect (3.0 mm x 3.0 mm) was drilled on the metaphyseal area of the tibiae with a 3.0 mm wide trephine bur at a rotary speed not exceeding 1,500 rpm. The bur was introduced in the medullar area to create a drill hole of 3mm in height. The soft tissues were then repositioned and sutured to achieve the primary closure (Poly-vycril 5.0 and Silk 4.0, Ethicon, São Paulo, Brazil). The left tibia remained without surgical defect to be used in the analysis of bone density.

### ***Tissue processing***

Animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation at eight days after the surgical procedures of the bone defect. The caffeine administration was kept until the euthanasia. Both tibia were removed and fixed in 10% buffered formalin for 48 hours. The specimens were decalcified in a solution containing 10% ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA), dehydrated in an ascending series of ethanol solution and embedded in paraffin. Semi-serial sections (5 µm thick) were obtained in a transversal direction of each defect and the corresponding region in the tibia without defect and stained with hematoxylin and eosin solutions.



### ***Histometric procedures***

All histometric evaluations were performed using an image analysis system (Image-Pro<sup>®</sup>; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), by the same trained, calibrated and blinded examiner. The three most central histological sections of each defect and the three corresponding sections in the tibia without defect were chosen for histometric evaluation. The selected sections were saved as digital images and composite digital figures were created by the combination of two small images. This procedure was performed to permit the view of the entire defect and to obtain images at a better level of magnification for histometric assessments. For bone healing analysis, the total area (TA, mm<sup>2</sup>) corresponding to the cortical and medullar regions of the surgical defect was delineated on the composite image. Subsequently, the newly formed bone area (NB, mm<sup>2</sup>) was also delineated within the TA. The value of TA obtained was considered as 100% of the area to be analyzed and the percentage of NB was calculated according to the following formula:  $\text{NB (mm}^2\text{)} \times 100 / \text{TA (mm}^2\text{)}$ . For the analysis of bone density (BD), a standardized quadrilateral area (1 mm<sup>2</sup>) was delimited in the medullar area and a checkered diagram was overlaid on this area, constituting a drawing with 314 intersections. The number of intersections under which the presence of bone tissue was observed was then counted. The 314 intersections were considered as 100% of the area to be analyzed and the BD was calculated according to the following formula:  $\text{BD} \times 100 / 314$ .

### ***Statistical analyses***

The mean percentages of newly-formed bone area and bone density of the three sections were averaged for each animal and across animals in the two experimental groups (non-caffeine or caffeine). In order to test the hypothesis that caffeine had no influence on bone healing and density, an intergroup analysis was performed by the Mann-Whitney test. The significance level established for all analyses was 5% ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

All animals gained weight during the study. No statistically significant difference was observed between the mean body weights of the caffeine and non-caffeine groups on day 56 ( $p=0.27$ ). The final mean body weight was  $411.8 \pm 45.6$  g and  $393.8 \pm 52.3$  g for the control and test groups, respectively. The mean percentage of BD in the tibia without defects did not differ significantly between non-caffeine ( $20.45 \pm 5.27\%$ ) and caffeine groups ( $19.17 \pm$

7.36%) ( $p= 0.9396$ /Figure 1). Figures 2A and 2B illustrate the histological findings of bone density for non-caffeine and caffeine groups, respectively. The medullar areas for control and test groups were very similar. In addition, the caffeine group ( $27.69 \pm 6.38\%$ ) presented a significantly lower percentage of newly-formed bone area in the defect when compared to the non-caffeine group ( $86.80 \pm 1.70\%$ ) ( $p < 0.0001$ ; figure 3). Figures 4A and 4B illustrate the histological findings of bone healing for non-caffeine and caffeine groups, respectively. Figure 4A demonstrates a considerable increase in new well-organized bone growth coming from the walls of the defect in the control group. The control defect is noticeably more filled of new bone when compared to test one. Figure 4B shows newly-formed bone more restricted to areas close to the borders of the surgical defect. In addition, the bone trabeculae were immature and poorly organized and the newly-formed cortical bone was thinner than the pre-existing cortical.

## DISCUSSION

The negative effect of caffeine on bone metabolism was first described in 1982 (Heaney and Recker, 1982) and, thereafter, many other studies have assessed the influence of this substance on bone tissue, focusing on bone density (Hasling et al., 1992; Harris and Dawson-Hughes, 1994; Massey and Wise, 1992; Massey et al.;1994; Lloyd et al., 1997; Conlisk and Galuska, 2000; Rapuri et al., 2001; Ilich et al., 2002; Heaney, 2002; Tucker et al., 2006). Thus, the present study evaluated, in an animal model, the effect of caffeine, not only on bone density, but also on bone healing within a surgically-created critically-size defect. Caffeine was ingested in the drinking water in attempt to simulate a chronic consumption in humans. The dose of caffeine used in this study (10mg/100g body weight) was similar to those used in previous investigations (Yeh et al., 1986; Glajchen et al., 1988) and was equivalent to  $1360\text{mg}/70 \text{ kg}^{0.75}$  in humans, when the conversion is based on the metabolic body weight ( $\text{kg}^{0.75}$ ) (Yeh et al., 1986). Since the average amount of caffeine in a cup of coffee is 85 mg, the dose of caffeine used in our study was believed to be high, equivalent to the consumption of 16 cups of coffee per day.

The results of this study showed that the daily intake of high doses of caffeine during 56 days does not influence the density of the medullar bone of the tibia. This finding is in agreement with some previous animal and clinical investigations in which caffeine or caffeine-containing products (i.e. coffee, tea, cola, etc) have no harmful effects on bone tissues and/or calcium metabolism (Cooper et al., 1992; Lloyd et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Chen and Whitford, 1999; Conlisk and Galuska, 2000; Ilich et al. 2002; Glajchen et al., 1988).

Glajchen et al. (1988), using a similar experimental design to ours, also failed to find histomorphometric differences in the medullar area of the tibial metaphyseal bone between animals that ingested caffeine and controls. On the other hand, our results are in contrast with other studies that demonstrated that caffeine have deleterious impact on bone tissue such as stimulation of bone loss, changes in the mechanical properties of the bone, decrease in BMD and increase in the risk of fracture (Hernandez-Avila et al., 1991; Barrett-Connor et al., 1994; Meyer et al., 1997; Huang et al., 2002; Ohta et al., 2002; Rapuri et al., 2001; Tucker et al., 2006). Possible explanations for the injurious role of the caffeine on bone, observed in these studies, may be due to the action of this compound on calcium metabolism and on the proliferation of osteoblast-like cells. Caffeine increases urinary calcium excretion by reducing renal reabsorption and, possibly, reducing calcium absorption, leading to negative calcium balance (Bergman et al., 1990; Massey & Whiting, 1993; Ilich et al., 2002). Interestingly, this mechanism seems to be more evident in elderly women and rats, since the augmented calcium excretion leads to a compensatory increase in intestinal absorption in the young (Daniell, 1976; Yano, 1985; Kiel et al., 1990; Copper et al., 1992; Yeh & Aloia, 1986). Therefore, we speculated that the lack of influence of caffeine on bone density, observed in this study, may be attributed to the young age of our rats (90 days of age).

Our study demonstrated, for the first time, that bone healing at 8 day after surgical creation of a critical-size defect was negatively affected by a daily intake of high doses of caffeine. Although the precise mechanisms involved in this finding remain to be investigated, some cellular and molecular consequences of caffeine on bone metabolism have been described and could partially explain our results. Tassinari et al. (1991), in an *in vitro* study, showed that caffeine inhibits the synthesis of the extracellular matrix during differentiation of osteoblasts. In addition, Kamagata-Kiyoura et al. (1999) demonstrated that caffeine has an inhibitory effect on the proliferation of osteoblast-like cells *in vitro*. Tsuang et al. (2006) concluded that caffeine may induce apoptosis and decrease the viability of osteoblasts. Wink et al. (1996) reported that the *in vivo* intake of caffeine during the early neonatal period may retard the structural remodeling of the tibial metaphysis and induce the appearance of osteoblasts with disrupted swollen mitochondria. Focking et al. (2005) showed that caffeine amplifies the expression of the glucocorticoid receptor in osteoblastic cells. It has been reported that glucocorticoids induce the apoptosis of osteoblasts and, therefore, the glucocorticoid receptor is one of the most important factors in the induction of osteoporosis in humans (Conradie et al., 2007). Currently, Rapuri et al. (2007) observed that the caffeine

dose dependently decreases vitamin D receptor expression and alkaline phosphatase enzyme activity in human osteoblasts; constituting a possible mechanism by which caffeine may affect bone metabolism.

It is important to note that the use of the critical-size defect is necessary to evaluate the real impact of any factor that could influence bone healing. According to Lewandrowski et al. (1999), a 3-mm diameter defect that was surgically created in rat tibia did not heal spontaneously in up to 7 weeks post-operative, making this defect appropriate for comparative histological evaluations of the newly-formed bone. In this study, a critical-size defect was used, as confirmed by the newly-formed bone close to the borders of the surgical defect.

The knowledge of factors that could negatively influence bone tissue is essential for the identification of populational groups at risk of bone loss and deficient skeletal repair and regeneration. In this study, it was observed, in rats, that the daily intake of high doses of caffeine had no influence on bone density, but had a harmful effect on bone healing in critical-size defects. Nevertheless, further studies should be considered in order to clinically evaluate the relevance of these findings.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

The authors greatly appreciated the assistance of the lab technicians from Guarulhos University: Paulo César Simões Silva, for help with histological procedures and Rogério Tadeu Barreira, for technical support with animal care. There is no conflict of interest to declare.

## REFERENCES

- Barger-Lux M., Heaney R.P. (1995). Caffeine and the calcium economy revisited. *Osteoporos Int.* 5, 97–102.
- Barrett-Connor E., Chang J.C., Edelstein S.L. (1994) Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. *JAMA.* 271, 280–283.
- Bergman E.A., Massey L.K., Wise K.J., Sherrard D.J. (1990). Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci.* 47, 557-564.
- Chen X., Whitford G.M. (1999). Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. *Arch Oral Biol.* 44, 33-39.
- Conlisk A.J., Galuska D.A. (2000). Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med.* 31, 562-568.
- Conradie M.M., de Wet H., Kotze D.D., Burrin J.M., Hough F.S., Hulley P.A. (2007). Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts in vitro and osteocytes in vivo. *J Endocrinol.* 195, 229-240.
- Cooper C., Atkinson E.J., Wahner H.W., O'Fallon W.M., Riggs B.L., Judd H.L., Melton L.J. (1992). Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res.* 7, 465-471.
- Daniell H.W.(1976). Osteoporosis of the slender smoker. Vertebral compression fractures and loss of metacarpal cortex in relation to postmenopausal cigarette smoking and lack of obesity. *Arch Intern Med.* 136, 298-304.
- Dews P.B.(1982) Caffeine. *Annu Rev Nutr.* 2, 323-341.
- Föcking M., Schmiegelt D., Trapp T. (2005). Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 435-439.
- Heaney R.P. (2002). Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol.* 40, 1263-1270.
- Glajchen N., Ismail F., Epstein S., Jowell P.S., Fallon M. (1988). The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. *Calcif Tissue Int.* 43, 277-280.

Hasling C., Sondergaard K., Charles P., Mosekilde L. (1992). Calcium metabolism in postmenopausal osteoporotic women is determined by dietary calcium and coffee intake. *J Nutr.* 122, 1119–1126.

Harris S.S., Dawson-Hughes B. (1994). Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 60, 573–578.

Heaney R.P., Recker R.R. (1982). Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J Lab Clin Med.* 99, 46-55.

Hernandez-Avila M., Colditz G.A., Stampfer M.J., Rosner B., Speizer F.E., Willett W.C. (1991). Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 54,157–163.

Huang T.H., Yang R.S., Hsieh S.S., Liu S.H. (2002). Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone.* 30, 293-299.

Ilich J.Z., Brownbill R.A., Tamborini L., Crncevic-Orlic Z. (2002). 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.* 21, 536-544.

Johansson C., Mellstrom D., Lerner U., Osterberg T. (1992). Coffee drinking: a minor risk factor for bone loss and fractures. *Age Ageing.* 21, 20–26.

Kamagata-Kiyoura Y., Ohta M., Cheuk G., Yazdani M., Saltzman M.J., Nakamoto T. (1999). Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). *J Periodontol.* 70, 283-288.

Kiel D.P., Felson D.T., Hannan M.T., Anderson J.J., Wilson P.W. (1990).Caffeine and the risk of hip fracture: The Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 132, 675–684.

Lewandrowski K.U., Cattaneo M.V., Gresser J.D., Wise D.L., White R.L., Bonassar L., Trantolo D.J. (1999). Effect of a poly(propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Eng.* 5, 305-316

Lloyd T., Rollings N., Eggl D.F., Kieselhorst K., Chinchilli V.M. (1997). Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 65, 1826–1830.

Lloyd T., Johnson-Rollings N., Eggli D.F., Kieselhorst K., Mauger E.A., Cusatis D.C. (2000). Bone status among postmenopausal women with different habitual caffeine intakes: a longitudinal investigation. *J Am Coll Nutr.* 19, 256-261.

Massey, L.K.; Wise, K.J. (1992). Impact of gender and age on urinary water and mineral excretion responses to acute caffeine doses. *Nutr. Res.* 12, 605-612.

Massey L.K., Whiting S.J. (1993). Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr.* 123, 1611-1614.

Massey L.K., Bergman E.A., Wise K.J., Sherrard D.J. (1994). Interactions between dietary caffeine and calcium on calcium and bone metabolism in older women. *J Am Coll Nutr.* 13, 592-596.

Meyer H.E., Pedersen J.I., Loken E.B., Tverdal A. (1997) Dietary factors and the incidence of hip fracture in middle-aged Norwegians—a prospective study. *Am J Epidemiol.* 145, 117–123.

Ohta M., Ide K., Cheuk G., Cheuk S.L., Yazdani M., Nakamoto T., Thomas K.A. (2002). A caffeine diet can alter the mechanical properties of the bones of young ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab.* 46, 108-113.

Rapuri P.B., Gallagher J.C., Kinyamu H.K., Ryschon K.L. (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr.* 74, 694-700.

Rapuri P.B., Gallagher J.C., Nawaz Z. (2007). Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 103, 368-371.

Reissig C.J., Strain E.C., Griffiths R.R. (2008). Caffeinated energy drinks- A growing problem. *Drug Alcohol Depend.* Sep 20.

Rico H., Canal M.L., Mañas P., Lavado J.M., Costa C., Pedrera J.D. (2002) Effects of caffeine, vitamin D, and other nutrients on quantitative phalangeal bone ultrasound in postmenopausal women. *Nutrition.* Feb. 18, 189-193.

Sakamoto W., Nishihira J., Fujie K., Iizuka T., Handa H., Ozaki M., Yukawa S. (2001). Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone*. 28, 332-336.

Tassinari M.S., Gerstenfeld L.C., Stein G.S., Lian J.B. (1991). Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *Bone Miner Res*. 6, 1029-1036.

Tsuang Y.H., Sun J.S., Chen L.T., Sun S.C., Chen S.C. (2006). Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg*. 7, 1-7.

Tucker K.L., Morita K., Qiao N., Hannan M.T., Cupples L.A., Kiel D.P. (2006). Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr*. 84, 936-942.

Yano K., Heilbrun L.K., Wasnich R.D., Hankin J.H., Vogel J.M. (1985). The relationship between diet and bone mineral content of multiple skeletal sites in elderly Japanese-American men and women living in Hawaii. *Am J Clin Nutr*. 42,877-888.

Yeh J.K., Aloia J.F. (1986). Differential effect of caffeine administration on calcium and vitamin D metabolism in young and adult rats. *J Bone Miner Res*. 1, 251-258.

Watson J., Deary I., Kerr D. (2002). Central and peripheral effects of sustained caffeine use: tolerance is incomplete. *Br J Clin Pharmacol*. 54, 400-406.

Wink C.S., Rossowska M.J., Nakamoto T. (1996) Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat Rec*. 246,30-38.



**FIGURES**

Figure 1: Mean and standard deviation of bone density in the medullar area of the metaphyseal region of the tibia for non-caffeine and caffeine groups. There are no significant differences between groups (Mann-Whitney test,  $p>0.05$ ).

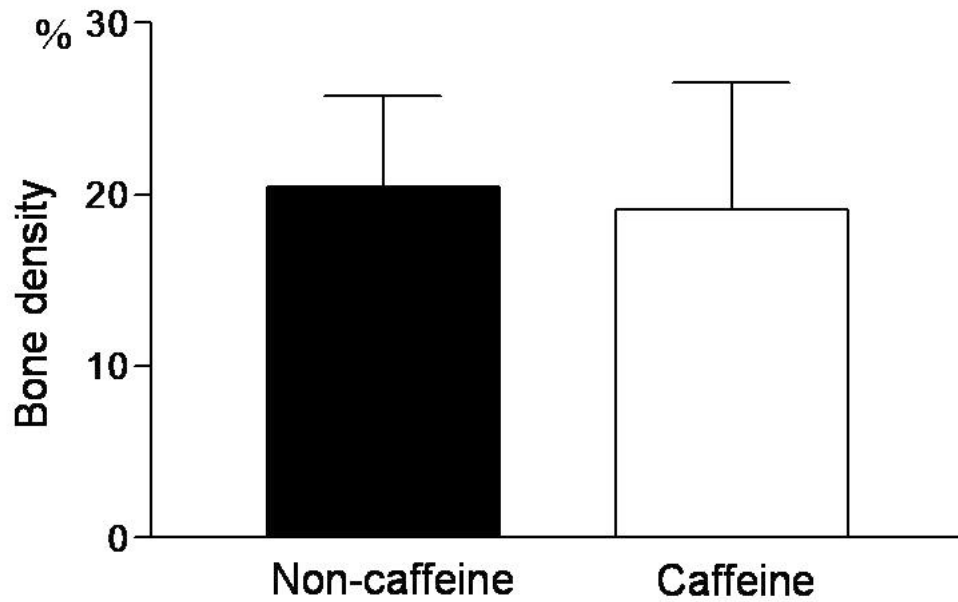


Figure 2: Photomicrographs illustrating the transversal sections of the tibia without surgical defect for non-caffeine (A) and caffeine (B) groups, showing a similar pattern of bone density in the medullar area.

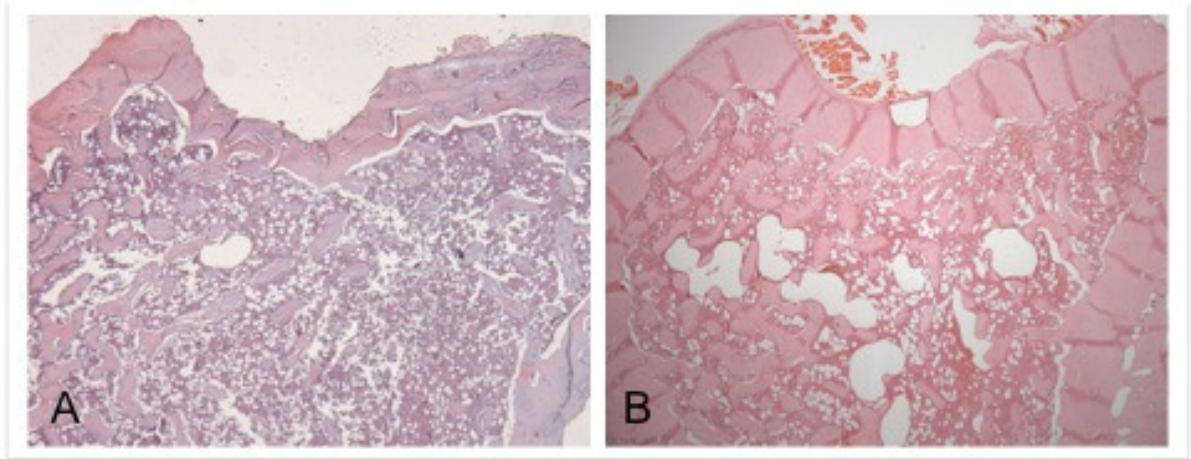


Figure 3: Mean and standard deviation of newly-formed bone area within the surgical bone defect created in the metaphyseal region of tibia for non-caffeine and caffeine groups. The symbol (\*) represents that the mean percentage of newly-formed bone in the caffeine group was lower than that of the non-caffeine group (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ).

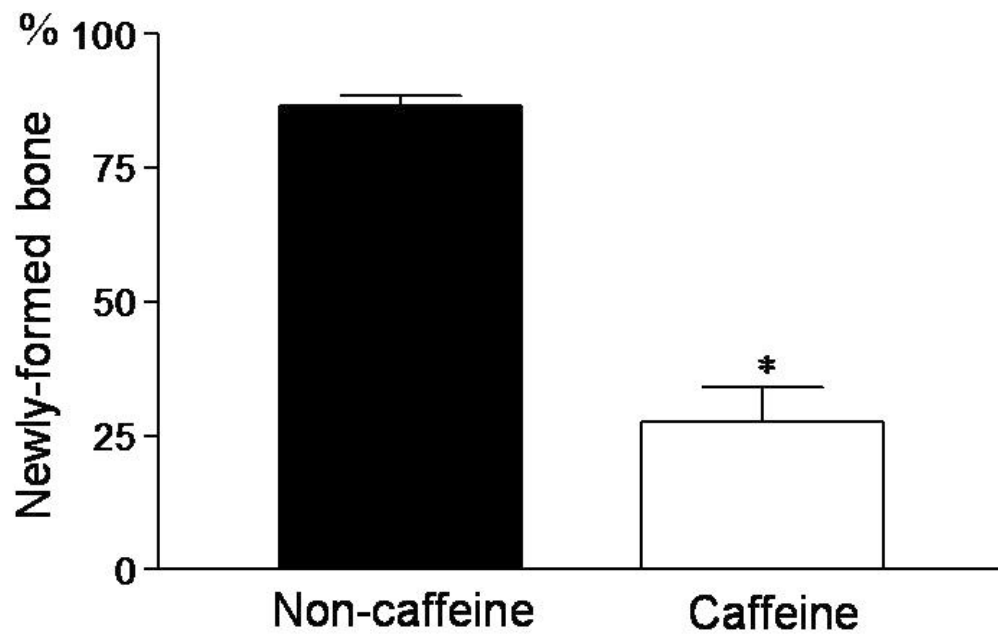
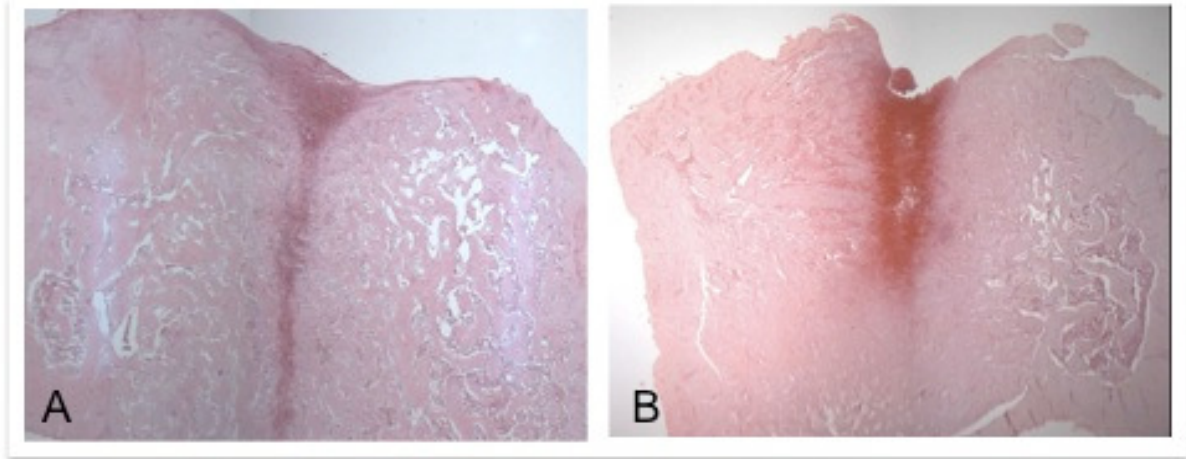


Figure 4: Photomicrographs illustrating the transversal sections of the tibia with the surgical defect for non-caffeine (A) and caffeine (B) groups.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese de que cafeína exerce efeito prejudicial no tecido ósseo tem sido testada por diversos estudos em humanos, em animais e *in vitro* (RICO et al., 2002; ILICH et al., 2002; HUANG et al., 2002; FÜCKING et al., 2005; TSUANG et al., 2006; RAPURI et al., 2007). Grande parte dos trabalhos teve como principal foco observar o efeito da cafeína na densidade óssea e no metabolismo dos minerais relacionados ao tecido ósseo. Entretanto, a literatura é desfavorecida de informações sobre o efeito deste agente na perda óssea periodontal e no reparo ósseo.

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que a ingestão diária de altas doses de cafeína foi capaz de exacerbar a perda óssea periodontal em um modelo já bem estabelecido de periodontite induzida por ligadura em ratos. A hipótese de que a cafeína poderia influenciar negativamente a perda óssea na periodontite foi baseado no fato de que este agente apresenta-se como um fator de risco para a osteopenia e osteoporose, que por sua vez, têm sido estudadas como fatores ou indicadores de risco para periodontite. Por se tratar de um estudo em ratos, obviamente, estes resultados não podem ser extrapolados diretamente para humanos. Entretanto, os achados do presente estudo forneceram os primeiros indícios de que a cafeína pode ser um fator crítico para destruição óssea periodontal, abrindo portas para estudos futuros com objetivo de compreender o mecanismo celular e molecular bem como a implicação clínica destes resultados. Sem dúvidas, a identificação dos grupos de risco para doenças periodontais bem como o entendimento dos mecanismos de ação dos fatores de risco constitui um importante passo para a proposição de estratégias preventivas e terapêuticas para essa doença.

Embora a cafeína não tenha demonstrado um efeito negativo direto no tecido ósseo alveolar e na densidade óssea da tíbia, a mesma provocou prejuízo no reparo em um defeito de tamanho crítico, em um período de oito dias de observação. Tais achados indicam que os estágios iniciais de neoformação óssea podem ser afetados pelo consumo de cafeína, o que apresenta relevante implicação clínica em odontologia e medicina. É importante ressaltar que o reparo ósseo foi avaliado em um curto período e que avaliações em tempos maiores também devem ser consideradas para identificar o efeito da cafeína até o reparo total do defeito ósseo. Assim como sugerido anteriormente, é importante avaliar os mecanismos celulares e moleculares bem como os reais efeitos clínicos desses achados.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados do presente estudo concluiu-se que a ingestão crônica de altas doses de cafeína:

- 1- Potencializou a perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.
- 2- Não influenciou a densidade óssea, mas produziu um efeito prejudicial no reparo de um defeito de tamanho crítico na tíbia de ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; 29: 177-206.

Chen X, Whitford GM. Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. *Arch Oral Biol* 1999; 44(1): 33-39.

Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med* 2000; 31(5):562-8.

Föcking M., Schmiegelt D., Trapp T. (2005). Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 337(2), 435-439.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996 Oct;67(10 Suppl):1041-9. Review.

Glajchen N, Ismail F, Epstein S, Jowell PS, Fallon 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(5): 277-280.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66(1): 23-29.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5:78-111.

Heaney R.P. (2002). Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol.* 40(9), 1263-1270. Review.

Hernandez-Avila M., Colditz G.A., Stampfer M.J., Rosner B., Speizer F.E., Willett W.C. (1991). Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 54(1):157-163.

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.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol* 2000. 2006;41:48-72. Review.

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004; 75(2):196-209. Review.

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(3): 283-288.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006; 85(7): 596-607. Review.

Lindhe J, Papapanou PN. Epidemiologia das doenças periodontais. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 3ª edição. Guanabara Koogan; 1997. 49-73.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun; 36: 177-87.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21(2):115-37. Review.

Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr*. 1993; 123(9): 1611-1614.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34(3): 235-249



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)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103(3-5): 368-371.

Ryan ME, Carnu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc* 2003; 134 Spec No: 34S-40S.

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.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2): 134-44.

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.

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(2): 273-280.

**ANEXOS**