



**CEPPE**

Centro de Pós-Graduação,  
Pesquisa e Extensão

**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**JOYCE PINHO BEZERRA**

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO E/OU  
CONSUMO DE CAFEÍNA NA PERDA ÓSSEA, DENSIDADE E  
REPARO ALVEOLAR: UM ESTUDO EM RATAS.**

Guarulhos

2012

**JOYCE PINHO BEZERRA**

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO E/OU  
CONSUMO DE CAFEÍNA NA PERDA ÓSSEA, DENSIDADE E  
REPARO ALVEOLAR: UM ESTUDO EM RATAS.**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos para  
qualificação e obtenção do título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Periodontia

Orientador (a): Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte

Co-orientador (a): Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos

Guarulhos

2012

B574e BEZERRA, Joyce Pinho  
Efeitos da deficiência de estrógeno e/ou consumo de cafeína na  
perda óssea, densidade e reparo do osso alveolar: um estudo em  
ratas. / Joyce Pinho Bezerra. Guarulhos, 2013.  
73 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (Doutorado em Odontologia) - Centro de Pós-  
Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2013.  
Orientador: Dra. Poliana Mendes Duarte

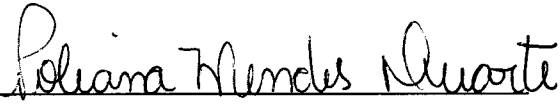

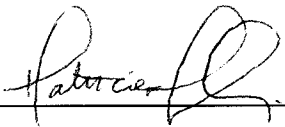
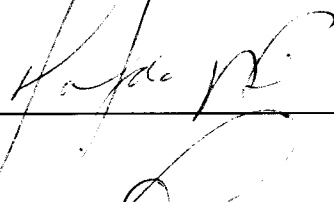

Bibliografia: f.

1. ovariectomia. 2. cafeína. 3. perda óssea alveolar. 4. RANKL.  
5. osteoprotegerina I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22<sup>st</sup> 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada “EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO E/OU CONSUMO DE CAFEÍNA NA PERDA ÓSSEA, DENSIDADE E REPARO ALVEOLAR: UM ESTUDO EM RATAS” em sessão pública realizada em 21 de Janeiro de 2013 considerou a candidata Joyce Pinho Bezerra aprovada.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UnG) 
2. Profa. Dra. Daiane Cristina Peruzzo (SLMandic) 
3. Profa. Dra. Patricia Furtado Gonçalves (UFVJM) 
4. Profa. Dra. Magda Feres (UnG) 
5. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG) 

Guarulhos, 21 de Janeiro de 2013.

Dedico esses anos de estudo, dedicação  
e realização 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.

## AGRADECIMENTOS

A obtenção do título de doutor é um feito que considero muito especial. Este momento possui muitos significados para mim e gera sentimentos os quais não posso deixar de expressar à algumas pessoas importantes que colaboraram para eu chegar até aqui. 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, pela providência de colocar sempre as pessoas certas nesses caminhos, e pela coragem para acreditar e seguir a Sua Vontade. Minha fonte inesgotável de esperança em um futuro melhor e mais humano.

Aos meus pais (amores da minha vida) Bezerra e Regina, pela minha educação, porque sempre incentivaram o estudo, por serem fonte de amor, incentivo, apoio (em todas as fases da minha vida) e coragem, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência dos meus próprios valores. Por todos os sacrifícios para que eu e meus irmãos tivéssemos uma boa formação, em direção a um futuro melhor, por abdicarem dos seus próprios sonhos em função dos nossos, a minha eterna gratidão e amor incondicional.

Aos meus irmãos mais novos, Matheus e Lucas, por me estimularem a querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Aprendi com eles que a vitória de um é a vitória do outro, assim como as necessidades de um são as do outro. Graças a eles, não tenho medo de ficar sozinha na vida, meus irmãos são meus pés e caminhos, escudo e artilharia.

Ao meu querido noivo, Cássio, por sua enorme paciência, apoio, cumplicidade, atenção, companheirismo, carinho, amor e acima de tudo pela sua leve e alegre presença em minha vida. Você me fez acreditar que existem pessoas de bom coração nos tempos de hoje, e eu tive o privilégio de ser escolhida por uma dessas. Meu mundo ficou cor-de-rosa depois que te conheci, te amo.

À minha família (pais, irmãos, tios e primos), a quem devo o meu caráter, a minha infância e as minhas melhores lembranças, pelo aprendizado através do que é justo e honesto. Obrigada por me amarem e me aceitarem como sou, por terem me proporcionado as maiores alegrias, por me ensinarem a sonhar e depois a lutar para concretizar esses sonhos, por serem a razão da minha vida. A vocês, toda a minha capacidade de amar.

À UnG, na pessoa da professora Dra. Magda Feres, que conduz estes estudos com ética, competência, transparência e humildade, agradeço pela oportunidade de estudar em uma instituição de tamanha importância. Sinto-me honrada em fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À minha orientadora professora Dra. Poliana Mendes Duarte por me aceitar como aluna e orientanda, mesmo com todas as minhas limitações, e sempre me dispensar o melhor da sua paciência, bondade, delicadeza, sabedoria até mesmo nos momentos em que precisei ouvir sermões, estes foram feitos de maneira tal que eu não me rebaixasse, mas sim, levantasse a cabeça e tentasse de novo. Além de orientadora, você é a minha inspiração. Sempre será a minha referência.

À minha co-orientadora neste trabalho, professora Dra. Marta Ferreira Bastos, por me ajudar a encarar os desafios, por acreditar na minha capacidade, por ensinar a ter uma visão (quando preciso) macro dos problemas e micro das soluções, por me passar ensinamentos que extrapolam o universo acadêmico. Por ter sempre um bom conselho e uma palavra amiga que apenas os grandes espíritos possuem.

À FAPESP pelo suporte financeiro para a execução do projeto e realização da pesquisa.

Aos demais professores do curso 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, o respeito pelo próximo, a essência e o valor de ser professor.

Às amigas e irmãs Josefa, Geisla, Vanessa e Kelly por todos os momentos de alegria, festa, sonhos, viagens, apresentações de trabalhos, preguiça, desespero, angústia. Nunca vou me esquecer dos nossos momentos compartilhados. Obrigada de coração!!

Aos amigos de turma Diogo, Diego, Ennyo, Eduardo, Maurilo, José Divino e Luís por compartilharem conhecimentos e momentos tão especiais de aprendizagem e companheirismo.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios de histologia (Paulo César) e biomolecular (Izilvânia), clínicas de periodontia (Cíntia e Samantha) e do biotério, alunos de iniciação científica (Ariane, Amanda, Elias) e todos que contribuíram direta ou indiretamente para a devida realização de todas as etapas desse estudo.

A todos aqueles que não foram citados, porém têm conhecimento deste trabalho e de sua importância. Aos meus amigos piauienses, paulistas e paraibanos que entenderam a minha ausência e torceram para que eu sempre viajasse em paz.

Meu sincero e carinhoso, muito obrigada.

" Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus,  
não sou o que era antes.  
Quando deixamos nossa luz própria brilhar,  
inconscientemente damos às outras pessoas  
permissão para fazer o mesmo."

Nelson Mandela



## RESUMO

Embora existam algumas evidências sobre os efeitos da deficiência de estrógeno e da cafeína no tecido ósseo, perda óssea periodontal e reparo alveolar, a influência da associação de ambas condições ainda não foi investigada sistematicamente. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da ingestão de cafeína e/ou deficiência de estrógeno sobre a perda óssea induzida por ligadura, área óssea trabecular e reparo ósseo pós-extração. Sessenta ratas foram distribuídas aleatoriamente em um dos grupos: Controle: sem ingestão de cafeína e cirurgia de ovariectomia (OVX) simulada (n = 15); Cafeína: ingestão de cafeína e OVX simulada (n = 15); OVX: sem ingestão de cafeína e OVX (n = 15); Cafeína/OVX: ingestão de cafeína e OVX (n = 15). As ratas foram submetidas à ingestão de cafeína durante 65 dias e/ou deficiência de estrógeno por 51 dias. No 21º dia após a OVX, o primeiro molar mandibular recebeu uma ligadura enquanto o dente contralateral serviu de controle. Os primeiros molares superiores foram extraídos 8 dias antes do sacrifício dos animais. A perda óssea, a área de osso trabecular e o número de células positivas para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), receptor ativador de NF- $\kappa$ B ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) foram analisados na região de furca dos molares inferiores. O reparo ósseo foi medido por histometria e a expressão gênica da proteína óssea morfogenética (BMP)-2, BMP-7, osteopontina e sialoproteína óssea foram avaliados por reação em cadeia da polimerase quantitativo nos alvéolos. Os resultados demonstraram que o grupo cafeína apresentou a maior perda e o grupo OVX o maior número de células TRAP positivas em torno dos dentes com ligadura ( $p < 0,05$ ). O grupo controle apresentou maior área de osso trabecular e reparo ósseo do que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Todos os grupos testes apresentaram maiores números de células RANKL/OPG positivas do que o grupo controle ao redor dos dentes sem ligadura. Os grupos OVX e cafeína/OVX apresentaram maior número de células TRAP positivas ao redor dos dentes sem ligadura comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos para a expressão gênica ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a cafeína aumentou a perda óssea na presença de ligadura. Além disso, a cafeína e/ou deficiência de estrógeno diminuiu a área de osso trabecular na ausência de ligadura e reduziu reparo ósseo após extração dentária.

Palavras-chave: ovariectomia, cafeína, perda óssea alveolar, RANKL, osteoprotegerina.

## ABSTRACT

Although there are some evidences regarding the effects of caffeine and estrogen deficiency on bone tissues, periodontal bone loss and alveolar repair, the influence of the association of both conditions has not been investigated systematically so far. Therefore, the aims of this study were to evaluate the effects of caffeine and/or estrogen deficiency on ligature-induced bone loss, trabecular bone area and post-extraction bone healing. Sixty rats were randomly assigned into one of the groups: Control: non-ingestion of caffeine/sham-surgery (n=15); Caffeine: ingestion of caffeine/sham-surgery (n=15); Ovariectomized (OVX): non-ingestion of caffeine/ovariectomy (n=15); Caffeine/OVX: ingestion of caffeine/ovariectomy. The rats were under caffeine administration during 65 days and/or estrogen deficiency for 51 days. On the 21<sup>st</sup> day after ovariectomy, one first mandibular molar received a ligature while the contralateral tooth was left unligated. The first maxillary molars were extracted at 8 days before sacrifice. Bone loss, trabecular bone area and the number of positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were analyzed in the furcation area of mandibular molars. Histometric bone healing and gene expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-7, osteopontin and bone sialoprotein were evaluated in alveolar sockets. The results demonstrated that the caffeine group presented the greatest BL and the OVX group the highest number of TRAP+ cells around ligated teeth ( $p < 0.05$ ). The control group presented higher trabecular bone area and bone healing than the other groups ( $p < 0.05$ ). All test groups presented higher number of RANKL/OPG+ cells than the control group around ligated/unligated teeth. The OVX and caffeine/OVX groups presented greater number of TRAP+ cells around unligated teeth than the control group ( $p < 0.05$ ). There were no differences among groups for gene expression ( $p > 0.05$ ). In conclusion, caffeine increased bone loss in the presence of ligature. In addition, caffeine and/or estrogen deficiency decreased trabecular bone area in absence of ligature and reduced bone healing after tooth extraction.

**Key Words:** Ovariectomy, caffeine, alveolar bone loss, RANK ligand, osteoprotegerin.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
<b>1.1. Doenças periodontais: definição e etiologia</b>	11
<b>1.2. Osteoporose: definição e etiologia</b>	13
1.2.1. Modelo experimental de deficiência de estrógeno: ovariectomia (OVX)	17
1.2.2. Influência da osteoporose nas doenças periodontais	18
1.2.2.1. Estudos em animais	19
1.2.2.2. Estudos em humanos	21
1.2.3. Influência da osteoporose no reparo ósseo alveolar	24
<b>1.3. Impacto da cafeína nos tecidos ósseos</b>	26
1.3.1. Estudos <i>in vitro</i>	27
1.3.2. Estudos em animais	30
1.3.3. Estudos em humanos	31
<b>1.4. Efeitos da cafeína no reparo ósseo</b>	34
<b>1.5. Efeitos da cafeína nos tecidos periodontais</b>	35
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	36
<b>3. ARTIGO</b>	37
<b>4. CONCLUSÕES</b>	61
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62
<b>ANEXOS</b>	71

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doenças periodontais: definição e etiologia

As doenças periodontais consistem em um grupo de doenças infecto-inflamatórias que resultam da interação entre os biofilmes supra e subgingival e a resposta imunoinflamatória gerada pelo hospedeiro (LÖESCHE, 1993). Tal resposta ocorre por meio da ativação dos sistemas inflamatório e imunológico pelos patógenos e seus fatores de virulência, que resulta na produção e liberação de mediadores inflamatórios no periodonto. Portanto, doença periodontal é a descrição geral dada à resposta inflamatória da gengiva e do tecido conjuntivo subjacente ao acúmulo de bactérias sobre o dente. Esses acúmulos bacterianos são altamente complexos e bem organizados em comunidades microbianas conhecidas como biofilme dentário (HIGHFIELD, 2009).

Essa biomassa bacteriana se distribui dentro cavidade bucal de maneira isolada ou associada na forma de biofilme e são reconhecidas como fatores etiológicos responsáveis pela destruição do tecido periodontal. As formas destrutivas de doença periodontal são caracterizadas por uma infecção com predomínio de microrganismos anaeróbios e Gram negativos presentes no biofilme subgingival, que representam uma fonte constante de agressão ao periodonto. Neste contexto, mais de 700 espécies bacterianas foram identificadas na cavidade bucal por meio de metodologias microbiológicas e biomoleculares. Aproximadamente 400 espécies foram observadas em bolsas periodontais, enquanto 300 espécies foram isoladas de outros sítios bucais, tais como dorso de língua, membranas mucosas, lesões de cáries e infecções endodônticas (PASTER et al., 2006).

Sockransky et al., em 1998, representou 40 espécies da população microbiana subgingival na forma de complexos microbianos. Cada grupo foi identificado por uma cor, e, foi proposto uma possível sequência de colonização dessas espécies. Os três primeiros complexos são compostos por espécies compatíveis com saúde periodontal e demonstram grande associação entre si. São eles: o complexo roxo, que é constituído pelas bactérias *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*; o complexo amarelo é composto por um grupo de *Streptococcus* (*S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. intermedius*) e o complexo verde por *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 complexo vermelho é constituído pelas bactérias *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* sorotipos 1 e 2) e *Selenomonas noxia*, com pouca relação entre si e com os cinco complexos, foram agrupadas em um novo complexo, denominado azul. As espécies do complexo vermelho, em grupo ou individualmente, estão intimamente relacionadas com indicadores de doença periodontal como a profundidade de bolsa e sangramento pós-sondagem.

As principais formas de doenças infecto-inflamatórias que acometem o periodonto são a gengivite e as periodontites. A gengivite se manifesta clinicamente pelo sangramento dos tecidos gengivais, sem evidências clínicas de perda de inserção e de osso alveolar. Alterações na cor, forma e contorno da gengiva, sangramento e edema são as principais características desta condição clínica, sendo a mesma reversível se o biofilme for eliminado. Embora a gengivite e a periodontite sejam consideradas um *continuum* da mesma doença inflamatória, devido à variabilidade na susceptibilidade do hospedeiro, nem todos os indivíduos com gengivite irão apresentar um quadro de periodontite destrutiva (ARMITAGE, 1999). Na periodontite, a resposta inflamatória induzida pelo biofilme ocasiona perda de inserção das fibras colágenas que unem o dente ao osso, perda do osso alveolar e eventual perda do elemento dental. A mesma envolve a destruição das estruturas de suporte dos dentes, que incluem o ligamento, osso e tecidos moles, e se caracteriza por múltiplos sinais e sintomas, incluindo sangramento gengival (espontâneo ou induzido por uma sonda periodontal), profundidade aumentada do sulco gengival (bolsas periodontais), recessão gengival, mobilidade dentária, lesões de bifurcação e supuração. (LÖESCHE, 1993).

Diversos estudos utilizando técnicas de biologia molecular, imunologia e histologia têm buscado elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças periodontais e na progressão da gengivite para a periodontite. Resumidamente, os patógenos periodontais e seus fatores de virulências com lipopolissacarídeos (LPS) causam vasculite dos vasos sanguíneos localizados abaixo do epitélio juncional, exsudação do fluido para os tecidos e sulco gengival, mobilização de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e migração destes para o epitélio juncional e sulco gengival (infiltrado inflamatório). Se as células PMN forem capazes de neutralizar as bactérias e os seus produtos (por exemplo, LPS), via fagocitose e outros

mecanismos intracelulares, a doença periodontal se mantém no estado inicial de gengivite e não evolui para periodontite. Se estes mecanismos de defesa não forem eficazes, ocorre a estimulação dos monócitos e consequente liberação de mediadores inflamatórios que causam diretamente destruição tecidual (destruição colágena), originando as bolsas (destruição da aderência de tecido conjuntivo e proliferação apical das células epiteliais) e destruição do osso alveolar pelos osteoclastos (KINANE, 2000).

Baseado no acima descrito, a condição inflamatória das doenças periodontais é, em geral, uma resposta imunoinflamatória à presença do biofilme que se forma em redor dos dentes. Entretanto, a mesma pode ser modificada por diversos fatores sistêmicos, medicamentosos ou hábitos do hospedeiro. Assim, embora os patógenos sejam essenciais para a ocorrência da doença, fatores inerentes ao hospedeiro (por exemplo, imunidade e doenças sistêmicas) e hábitos (por exemplo, o tabagismo) também desempenham um papel relevante na gravidade da doença e na resposta ao seu tratamento (HIGHFIELD, 2009).

Segundo Garcia et al. (2001), “fator de risco” é um aspecto do comportamento pessoal, estilo de vida ou ambiente exposto ou uma característica inata que, de acordo com evidências epidemiológicas, está associado à uma condição relacionada à saúde/doença. A presença de um fator de risco implica diretamente no aumento da probabilidade de uma doença ocorrer, assim como aumento de sua gravidade. Para um determinado fator ser estabelecido como um verdadeiro fator de risco o mesmo dever ser biologicamente plausível como agente agravante da doença e ser identificado em estudos longitudinais, precedendo o desenvolvimento da doença.

Atualmente, os fatores de risco reconhecidos para as doenças periodontais são o diabetes melito, especialmente em indivíduos com controle glicêmico deficiente, e o tabagismo. Existem ainda os determinantes de risco associados à doença periodontal dentre os quais se destacam o gênero, idade e fatores genéticos, isto é, polimorfismos de mediadores inflamatórios. Outros estudos apontam certos fatores como indicadores de risco, dentre os quais se destacam o estresse, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, consumo excessivo de cafeína, desordens imunológicas, obesidade e osteopenia/osteoporose (LERNER, 2006).

## **1.2. Osteoporose: definição e etiologia**

O processo de envelhecimento é acompanhado de diversas mudanças fisiológicas no tecido ósseo. Dentre as alterações ósseas que ocorrem com o avanço da idade, destaca-se a perda de massa óssea, o que caracteriza uma patologia muito discutida, a osteoporose. A

densitometria por absorção de raios-X de dupla energia (DEXA) é atualmente considerada a técnica padrão-ouro para a medida de massa óssea e diagnóstico de osteopenia/osteoporose, devido a sua segurança, baixo custo e precisão. A atual classificação densitométrica da perda de massa óssea aceita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é baseada no índice T. O índice T relaciona a perda de massa óssea de um indivíduo em relação à média da densidade mineral óssea (DMO) de adultos jovens no pico de massa óssea do mesmo gênero, etnia e peso corporal. De acordo com a OMS, indivíduos com DMO entre 1,0 e 2,5 desvio-padrão (DP) abaixo do pico de massa óssea são osteopênicos enquanto indivíduos com DMO acima de 2,5 DP abaixo do pico de massa óssea são osteoporóticos.

A osteoporose é uma doença óssea metabólica muito comum, definida pelo *Consensus Development Conference* como uma desordem caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em maior fragilidade óssea e, conseqüentemente, em aumento no risco de fraturas (TARANTINO et al., 2011). A osteoporose é uma doença complexa cuja diminuição da massa óssea, redução da DMO, deterioração da microestrutura do osso medular e cortical e aumento da susceptibilidade à fraturas pode ser atribuída ao envelhecimento, deficiência estrogênica e outras desordens sistêmicas (osteoporose secundária). A osteoclastogênese excessiva e a osteoblastogênese inadequada são responsáveis pela desarmonia entre a formação e a reabsorção óssea observada na menopausa e no envelhecimento (ATIK et al., 2006; PARK et al., 2008).

A osteoporose e suas conseqüências tais como traumas e fraturas ósseas podem ter resultados dramáticos em termos de morbidade, mortalidade e custos para a saúde pública. O estudo realizado por Gauthier et al. (2011) no Reino Unido avaliou a incidência e prevalência de fraturas osteoporóticas, osteoporose e osteopenia e o número de mortes atribuíveis à osteoporose. Em 2010, havia 11.494.000 mulheres idosas das quais 224.219 sofreram fraturas por osteoporose. Estimou-se que 45.556 fraturas osteoporóticas (20,3%) ocorreram em mulheres com idade entre 50-64 anos, 83.905 (37,4%) ocorreram em mulheres entre 65-79 anos de idade e 94.757 (42,3%) fraturas sucederam em mulheres com mais de 80 anos. O número de mortes diretamente atribuíveis às fraturas foi estimado em 8.928. O estudo sugeriu ainda que mudanças demográficas dos próximos 10 anos deverão levar ao aumento significativo na incidência de fraturas osteoporóticas (17,2%) e no número de mulheres com história de múltiplas fraturas (27,4%). Choi et al. (2012) investigaram a prevalência de osteoporose, bem como seu protocolo de tratamento, com base na análise do diagnóstico e das taxas de tratamento de osteoporose entre adultos coreanos com  $\geq 50$  anos, usando dados do

*National Health Korean and Nutrition Examination Survey (KNHANES)*, na Coreia. A prevalência de osteoporose em adultos com idade  $\geq 50$  anos foi de 35,5% em mulheres e 7,5% em homens. A prevalência de casos anteriormente diagnosticados com osteoporose foi de 10,6% em mulheres e 0,4% em homens, a prevalência de indivíduos com osteoporose diagnosticada recentemente foi de 24,9% em mulheres e 7,1% em homens. Além disso, a prevalência de osteopenia foi de 46,7% em mulheres e 47,2% em homens com idade  $\geq 50$  anos de acordo com os critérios da OMS. O número de adultos coreanos com osteoporose ou osteopenia foi estimado em cerca de 2,8 milhões (2,4 em mulheres/ 0,4 nos homens) e 5,9 milhões (3,1 em mulheres/ 2,8 nos homens), respectivamente. Cawston et al. (2012) descreveram a prevalência de osteoporose, incidência de fraturas, números de mortes atribuídas às fraturas osteoporóticas e previsões futuras até 2020 para a população da França. O número de mulheres que experimentam uma primeira fratura osteoporótica foi estimado para cada idade ( $\geq 50$  anos) e ano de interesse (de 1970 a 2020), utilizando taxas de incidência de fratura e tamanho de população. O número de mortes atribuídas à fraturas foi calculado utilizando o aumento da mortalidade aos 6 meses em comparação com 1 ano pós-fratura. Segundo projeções francesas, o número de mulheres com osteoporose (T score  $< 2,5$  DP) deverá subir de 2,960 milhões para 3,413 milhões entre 2010 e 2020 (15,3%). O número de mulheres com  $\geq 50$  anos é esperado aumentar em 13,3%, de 12,2 em 2010 para 13,8 milhões em 2020. No entanto, a taxa de aumento não deverá ser a mesma em todos os grupos etários. O número de mulheres entre 50 e 64 anos deverá aumentar modestamente ao longo do tempo, com um aumento de 3,2% entre 2010 e 2015 e um período mais estável entre 2015 e 2020 (0,8%). Por último, o número de mulheres com  $\geq 80$  anos deverá aumentar em 14,7% entre 2010 e 2020. O número total de fraturas osteoporóticas em mulheres na pós-menopausa na França está projetada para aumentar em 18,1% (de 204.200 para 241.300) entre 2010 e 2020, em mulheres com  $\geq 80$  anos. Esse aumento é seguido pela faixa etária 65-79 anos e um aumento menos acentuado em mulheres com idade entre 50 e 64 anos. No entanto, a taxa anual de crescimento deverá cair de 2,7% (2010-2011) para 1,2% (2019-2020). Este estudo confirma a importância da prevenção nesta área, uma vez que é esperado um envelhecimento da população nos próximos 10 anos com aumento acentuado na prevalência de osteoporose e do número de fraturas osteoporóticas.

A deficiência de estrógeno é considerada o principal fator de risco para a osteoporose, que atinge, portanto, predominantemente mulheres no período pós-menopausa. Uma das mais importantes características da menopausa é a significativa diminuição da produção e secreção dos hormônios ovarianos, principalmente o estrógeno, que é considerado um dos fatores



patogênicos dominantes para a osteoporose em mulheres. Os estrógenos são hormônios que produzem diversas ações fisiológicas, incluindo as ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídios.

Em relação ao tecido ósseo, o estrógeno e seus análogos apresentam um importante papel na expressão de fatores de crescimento e de citocinas sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e osteoclastos. Esses mediadores celulares são responsáveis pelo equilíbrio funcional das células ósseas, determinando um controle autócrino e parácrino da remodelação óssea. O estrógeno promove um aumento na atividade osteoblástica e no crescimento ósseo, por aumentar a retenção de cálcio e os depósitos da matriz óssea (MCMANUS et al., 2008). Sua deficiência promove aumento no *turnover* ósseo (RAPURI et al., 2002; PARK et al., 2008), produzindo um desequilíbrio no remodelamento ósseo, onde a reabsorção sobrepõe a formação (BONNET et al., 2007). Portanto, a deficiência de estrógeno em mulheres na pós-menopausa provoca perda de massa óssea nos ossos vertebrais e longos, resultando em fraturas ósseas. Esta condição recebe o nome de osteoporose pós-menopausa e é também frequentemente associada à má absorção intestinal de cálcio, aumento dos níveis de cálcio na urina, redução na síntese de vitamina D ativa e balanço negativo de cálcio devido à redução na secreção de estrógeno (ZALLONE, 2006). Tem sido sugerido ainda que durante o envelhecimento, e particularmente nos pacientes com osteoporose, ocorra defeito no recrutamento e/ou atividade de osteoblastos, o que resulta no aumento de cavidades de reabsorção geradas pelos osteoclastos que não são completamente preenchidas por osso novo. Assim, com o envelhecimento, o número de fraturas tende a aumentar, bem como a mortalidade relacionada à essas fraturas (MCDONNEL et al., 2007).

Dentre outros processos moleculares, um dos principais mecanismos envolvidos no remodelamento e reabsorção óssea envolvem o receptor de ativação do fator nuclear Kappa- $\beta$  (RANK), seu ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). O RANKL pode se apresentar como uma molécula transmembrana ou como uma molécula livre e, tem como principal função iniciar a formação (osteoclastogênese), atividade e manter a viabilidade dos osteoclastos. A OPG, por sua vez, é produzida e liberada pelos osteoblastos para se ligar ao RANKL formando o complexo OPG-RANKL e impedir a reabsorção óssea. Assim, os osteoblastos apresentam um papel central na fisiologia óssea, uma vez que sintetizam a matriz orgânica do tecido ósseo, controlam a sua mineralização além de regular a osteoclastogênese e a atividade osteoclástica (FRANZ-ODENDAALL et al., 2006). A superfície da célula precursora do osteoclasto contém o RANK. A ativação dos osteoclastos para a reabsorção

óssea consiste na ligação RANKL-RANK, que estimula a formação de osteoclastos ativos pelas células precursoras de osteoclastos. A OPG, antagonista de RANK, tem como função inibir a diferenciação dos osteoclastos, efetuando a ligação com o RANKL. Esta ligação inibe a formação do complexo RANK-RANKL e impede a osteoclastogênese (WRIGHT et al., 2009). Osteoblastos e osteoclastos apresentam receptores para os hormônios sexuais como o estrógeno. Em nível molecular, o estrógeno induz a formação de osteoprotegerina (OPG) por meio da ativação de um receptor de estrógeno- $\alpha$ , enquanto em um quadro de deficiência de estrógeno ocorre a expressão exacerbada de RANKL. Tem sido ainda sugerido que o estrógeno pode afetar o tecido ósseo por meio de sua ação nas células imunológicas, uma vez que o mesmo regula a expressão de citocinas importantes para o remodelamento ósseo como a interleucina (IL)-1 e IL-6 (ZALLONE et al., 2006).

### **1.2.1. Modelo experimental de deficiência de estrógeno: ovariectomia (OVX)**

Conforme descrito acima, a osteoporose pós-menopausa é a principal patologia promovida pela disfunção hormonal de estrógeno, sendo caracterizada pela redução de massa óssea em função da redução/ausência de estrógeno. A OVX é a cirurgia de retirada dos ovários usada para induzir os efeitos da menopausa em animais, por excluir ou reduzir bruscamente a secreção do estrógeno (BONNET et al., 2007). Portanto, ratas ovariectomizadas têm sido amplamente utilizadas como um modelo animal para simular a acelerada perda óssea humana pós-menopausa em estudos na área de medicina e odontologia (TANAKA et al, 2002; DUARTE et al, 2004; ANBINDER et al., 2006; LIU et al., 2010; SHOJI et al., 2011). Wronski et al. (1985) demonstraram o efeito da OVX em ratas em um período de 5 semanas por meio de histomorfometria quantitativa. Os autores observaram uma evidente diminuição do volume de osso trabecular bem como aumento do número e da área contendo osteoclastos e osteoblastos na tíbia dos animais ovariectomizados. A superfície de formação óssea ativa, taxa de calcificação e taxa de formação óssea também foram significativamente elevadas, indicando um mecanismo de *feedback* na tentativa de conter a perda óssea nestes animais. Mais tarde em 1988, esse mesmo grupo de pesquisa avaliou os efeitos da OVX em ratas em diferentes períodos que variaram de 14 a 180 dias. Os resultados demonstraram sinais de osteopenia e aumento da reabsorção óssea logo em 14 dias. A osteopenia se tornou progressivamente mais acentuada em até 100 dias pós-OVX, a partir do qual o volume de osso trabecular apresentou uma estabilização da perda (WRONSKI et al., 1988).

A literatura mostra que os efeitos da deficiência de estrogênio sobre o tecido ósseo são dependentes do local, do apendicular esponjoso e dos ossos longos, sendo estes últimos os mais investigados devido a uma maior incidência de fraturas espontâneas observadas nos locais esqueléticos. Kuroda et al. (2003), por exemplo, demonstram que existem diferenças na diminuição do volume de osso mandibular de acordo com a região da mandíbula e em relação ao fêmur, em 109 dias pós-OVX. No fêmur, a perda de massa óssea (redução em 30%) foi mais evidente em comparação à mandíbula. Na mandíbula, a área mais afetada foi a região condilar que demonstrou uma perda de cerca de 12,5%.

### **1.2.2. Influência da osteoporose nas doenças periodontais**

Há evidências de que a osteoporose afeta as estruturas craniofaciais e orais, embora a contribuição da osteoporose na perda das estruturas periodontais, dentes e altura do rebordo não esteja totalmente elucidada. Desta forma, a relação entre a osteoporose e saúde oral é ainda um problema complexo de interesse para um grande número de pesquisadores e clínicos.

Foi demonstrado que a DMO mandibular está correlacionada com a densidade óssea do esqueleto. Indivíduos com osteoporose apresentam um decréscimo no número e espessura das placas trabeculares, principalmente na maxila anterior que apresenta grande quantidade de osso trabecular e reduzida espessura do osso cortical (DERVIS, 2005).

A perda óssea progressiva em mulheres osteoporóticas/osteopênicas sugere importantes implicações odontológicas. A perda progressiva de densidade do osso alveolar pode afetar o sucesso do implante dental, em particular quando a deterioração da microarquitetura do tecido ósseo (um aspecto característico da osteoporose), é o suficiente para impedir a estabilidade primária do implante dental. Além disso, a perda óssea em mulheres na pós-menopausa também pode comprometer o suporte ósseo em edêntulas, conduzindo à dificuldade em usar próteses dentárias (PAYNE et al., 1999).

Considerando que uma importante função do tecido ósseo é manter a ancoragem dos dentes e que na osteoporose ocorre uma diminuição da quantidade de tecido ósseo em vários sítios do esqueleto, Lener et al. (2006) ratificaram a relevância de estudos sobre a doença periodontal durante a osteoporose pós-menopausa. Neste contexto, a osteoporose tem sido apontada como um indicador de risco para as doenças periodontais uma vez que a perda de osso alveolar é uma das consequências mais importantes da periodontite. A seguir serão apresentados alguns estudos desenvolvidos em animais e em humanos cujo objetivo foi

avaliar o impacto da osteoporose nas doenças periodontais. Em animais, os estudos geralmente utilizam para induzir doença periodontal, o modelo de perda óssea/periodontite induzida por ligadura ou inoculação de bactérias e seus produtos. Para estimular um quadro de deficiência de estrógenos, os estudos em animais utilizam a OVX e, como controle, a OVX simulada onde os animais são submetidos a todos os procedimentos da OVX, sem remoção dos ovários. Em humanos, sobressaem os estudos transversais que correlacionam a presença de osteopenia/osteoporose com os parâmetros clínicos periodontais.

### **1.2.2.1. Estudos em animais**

Johnson et al. (1997) investigaram a relação entre doença óssea metabólica (deficiência de estrógeno), inflamação periodontal e perda óssea alveolar em ovelhas, em 90 dias e 1 ano. Para isso, os animais foram divididos em dois grupos: OVX e OVX simulada. As mandíbulas foram removidas para análises radiográficas e testes mecânicos de resistência. Sangue e urina foram coletados para análises de nível de estrógeno e biomarcadores para osteoporose por ELISA. A medida de profundidade de sondagem periodontal foi realizada e escores de 1 a 3, 4 a 6 e > 6 mm foram determinados. As papilas gengivas foram usadas para análises imunocitoquímicas e bioquímicas (total de proteínas e citocinas). Houve uma interação significativa entre os níveis de estrógeno e de osteocalcina, sugerindo que a deficiência de estrógeno promoveu um perfil sérico de biomarcadores para osteoporose. Após 3 meses, os níveis de osteocalcina em animais OVX e cirurgia simulada foram semelhantes, no entanto, após 6 meses, os parâmetros foram significativamente elevados em animais OVX e permaneceu significativamente elevado durante o restante do estudo. Aos 3 meses não houve diferença significativa para fratura óssea mandibular entre os grupos. Ovelhas do grupo OVX apresentaram perda óssea mais generalizada e acentuada. As médias de profundidade de sondagem foram significativamente maiores no grupo OVX, com evidências de perda óssea progressiva ao longo de um ano. Níveis séricos de IL-6 foram significativamente maiores no grupo OVX. Os dados sugeriram que a deficiência de estrógeno produziu perda de osso alveolar, possivelmente por meio da elevação dos níveis IL-6 e do acúmulo desta citocina nos tecidos gengivais, promovendo osteoclastogênese na crista alveolar e perda óssea alveolar.

Duarte et al. (2004) avaliaram o impacto da deficiência de estrógeno e seus tratamentos sobre a perda óssea induzida por ligadura em ratas. As ratas foram divididas em 4 grupos: OVX simulada, OVX, OVX e injeções de calcitonina, OVX e injeções de 17 $\beta$  estradiol. Vinte e um dias após a OVX os animais receberam a ligadura em um dos molares

enquanto o outro molar permaneceu sem ligadura e serviu como controle. Nos molares sem ligadura, a deficiência de estrógeno foi capaz de aumentar a perda óssea na região de furca, que foi antagonizada pela ação de  $17\beta$  estradiol, mas não de calcitonina. Nos dentes com ligadura, a deficiência de estrógeno aumentou a perda óssea quando comparado às ratas com cirurgia simulada. Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de proteger contra os efeitos deletérios da ligadura e deficiência de estrógeno juntos no osso alveolar.

Resultados contrários foram encontrados por Anbinder et al., em 2006. Os autores também investigaram a influência da deficiência de estrógeno como um fator de risco para a doença periodontal induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas e que foram submetidas à OVX simulada. As maxilas foram radiografadas para avaliação da reabsorção óssea na região de furca. Os resultados demonstraram diferenças estatísticas para a perda óssea entre os animais com ligadura e sem ligadura. Entretanto, a presença ou ausência de estrógeno não influenciou o nível de perda óssea.

Recentemente, Allam et al. (2010) investigaram as alterações histológicas, expressão imunohistoquímica de RANKL e de fosfatase alcalina sérica em modelos de osteoporose e periodontite induzida por ligadura em ratos. Os resultados demonstraram que os níveis séricos de fosfatase alcalina estavam significativamente maiores nos animais com periodontite, com osteoporose ou com ambas as condições. Os cortes histológicos do grupo sem periodontite e sem osteoporose (controle) apresentaram arquitetura periodontal normal. O grupo com periodontite apresentou reabsorção óssea evidente, ruptura de fibras do ligamento periodontal, vasodilatação e infiltrado de células inflamatórias, além do aumento do número de osteoclastos. Os animais com osteoporose apresentaram trabéculas ósseas mais finas com maior alargamento das cavidades medulares e alterações na conectividade trabecular. O grupo com ambas patologias demonstrou infiltrado inflamatório e vasodilatação aumentada, com a perda óssea maior que nos outros grupos. A expressão de RANKL foi maior nos grupos com periodontite e/ou osteoporose comparado ao controle, sendo mais exacerbada ainda no grupo que apresentava periodontite e osteoporose.

Amadei et al. (2011) avaliaram morfometricamente a influência de diferentes durações de deficiência de estrógeno (30, 60 e 90 dias) na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratas. Para todos os grupos, 30 dias antes do final do experimento, a ligadura foi colocada ao redor segundo molar superior. Não houve diferença estatística entre os grupos nos dentes sem ligadura para perda óssea em nenhum intervalo de tempo. Porém, nos molares com ligadura, o grupo OVX apresentou uma perda óssea alveolar significativamente maior em relação ao grupo de cirurgia simulada, no intervalo de 90 dias. Os resultados deste estudo

demonstraram que a deficiência de estrógeno em longo prazo afeta a perda óssea alveolar induzida por ligadura.

Kobayashi et al. (2012) avaliaram a influência da deficiência de estrógeno no osso alveolar, utilizando modelos experimentais de osteoporose e periodontite. Para induzir periodontite, LPS ou placebos foram injetados abaixo da gengiva de ratos nos dias 0, 2 e 4. Para induzir osteoporose, as ratas foram submetidas a cirurgias de OVX. Alguns animais receberam os dois tratamentos experimentais, sendo que a inoculação de LPS ou placebo foi feita 3 semanas após a cirurgia de OVX. Os resultados mostraram que o conteúdo ósseo alveolar estava reduzido nos animais submetidos à OVX e que a deficiência de estrógeno aumentou significativamente a perda de osso alveolar na periodontite induzida por LPS.

### **1.2.2.2. Estudos em humanos**

Gomes-Filho et al. (2007) investigaram a possível associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós-menopausa com  $\geq 50$  anos. 139 mulheres foram divididas em grupo caso, composto de mulheres na pós-menopausa com doença periodontal e grupo controle, formado por mulheres na pós-menopausa sem doença periodontal. As mulheres foram consideradas portadoras de periodontite quando apresentavam quatro dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem (PS)  $\geq 4$  mm e com perda de nível de inserção clínica (NIC)  $\geq 3$  mm e sangramento à sondagem (SS). A osteoporose foi diagnosticada por DEXA. As médias de NIC, PS e SS foram significativamente maiores no grupo caso em relação ao grupo controle. Os resultados demonstraram que as mulheres na pós-menopausa com osteoporose e baixa escolaridade têm uma chance maior de apresentar doença periodontal comparado aquelas sem osteoporose.

Moedano et al. (2009) estudaram a possível associação entre osteoporose, risco de fraturas e doença periodontal. Além disso, o papel do tratamento medicamentoso da osteoporose e seu possível impacto na condição periodontal também foi avaliado. Para isso, 166 idosos foram investigados por meio de questionários, densitometria óssea e avaliação do NIC e PS. O modelo de regressão linear para gravidade de periodontite mostrou que a idade [odds ratio (OR) = 1,07, intervalo de confiança (IC) 1,02 - 1,13], tabagismo [OR = 2,37, IC (1,13 - 4,97)], osteoporose [OR = 1,82, CI (1,04 - 3,18)] e uso de medicação para osteoporose [OR = 0,36, IC (0,15 - 0,85)] foram significativamente associados com a gravidade da periodontite, após ajuste para gênero, condição socioeconômica e quantidade de placa. Além

disso, uma maior perda de dentes foi associada com a idade e o risco de fratura. Os autores concluíram que existe uma associação entre a gravidade da periodontite e a osteoporose.

Martínez-Maestre et al. (2010) desenvolveram uma revisão sistemática com o objetivo de elucidar se a osteoporose no osso alveolar é uma manifestação local da perda óssea sistêmica, com etiologia e fatores de risco semelhantes, ou é um processo independente. Somente os artigos que utilizam técnicas de diagnóstico reconhecidas para diagnosticar a osteoporose (absorimetria de fóton duplo e DEXA) foram incluídos. As correlações entre a doença periodontal e osteoporose sistêmica foram analisadas para cada variável, aceitando que, no mesmo estudo, estas podem ter uma correlação positiva para certas variáveis e negativa para outras. A correlação entre as diferentes variáveis periodontais foi eliminada, analisando apenas aquelas diretamente relacionadas à periodontite e perda óssea sistêmica. Do total de 145 publicações, apenas 36 se adequaram aos critérios de inclusão. Os autores concluíram que a verdadeira relação entre periodontite e osteoporose permanece obscura e mais estudos são necessários para esclarecer o papel e efeito exatos de uma condição sobre a outra e as correspondentes implicações clínicas.

Al Habashneh et al. (2010) investigaram a relação entre os parâmetros clínicos periodontais e radiográficos e DMO entre as mulheres na pós-menopausa com idade entre 50 a 75 anos. Densitometrias de coluna e fêmur foram avaliadas para definir o grupo de osteoporose e osteopenia. Das 400 mulheres incluídas 42,5% foram classificadas como osteopênicas, 34% como osteoporóticas e 44,5% como portadoras de periodontite. Não houve diferenças significativas nos parâmetros clínicos e radiográficos entre mulheres com DMO normal, osteopenia e osteoporose. Na análise multivariada, apenas a idade, grau de escolaridade, renda e DMO sistêmica foram significativamente associados com a perda avançada de NIC. Após o ajuste para essas variáveis, a osteoporose foi significativamente associada com o risco de perda de NIC (OR: 4,20; IC 95%: 1,57 - 11,22). A prevalência de periodontite entre as mulheres com osteoporose (54,4%) foi significativamente maior que entre as mulheres com DMO normal (39,4%) e com osteopenia (39,4%). A osteoporose agiu como um forte indicador de periodontite no modelo multivariado. Mulheres na pós-menopausa com osteoporose estavam mais propensas a ter periodontite (OR: 2,45; IC 95%: 1,38 - 4,34).

Um estudo caso-controle (Shum et al. 2010) avaliou as condições clínicas periodontais em 200 idosos chineses com e sem osteoporose/osteopenia. A osteoporose/osteopenia foram comprovada por densitometria óssea de quadril, coluna e corpo todo. Os resultados demonstraram que pacientes com osteoporose apresentavam uma porcentagem

significativamente maior de sítios com recessão gengival interproximal  $\geq 5$  mm que indivíduos controle e uma porcentagem significativamente maior de sítios com NCI  $\geq 6$  mm do que indivíduos com osteopenia. Indivíduos com osteoporose tiveram mais chances (OR = 3,3) para recessão gengival interproximal  $\geq 5$  mm que os indivíduos controle. Os autores sugeriram que a osteoporose está associada com a perda de inserção clínica e a ressecção gengival interproximal em idosos chineses.

Renvert et al. (2011) avaliaram a relação entre periodontite e osteoporose comparando exames radiográficos médicos e radiografias panorâmicas faciais, em 778 idosos (53% mulheres). A proporção de sítios com perda óssea alveolar  $\geq 5$  mm foi significativamente maior nos indivíduos com idade  $\geq 80$  anos, dos quais 10,9% eram homens e 4,7% mulheres. Nas mulheres, a osteoporose e periodontite apresentaram uma associação significativa, com um OR=1,8 (95% IC: 1,1 - 3,3). Os autores sugeriram que a associação entre a osteoporose e a periodontite só pode ser confirmada em mulheres.

Sultan et al. (2011) investigaram a possível associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós-menopausa ( $\geq 50$  anos), em um estudo transversal com mulheres portadoras de periodontite crônica. Os autores observaram que a idade e o tempo de menopausa apresentaram correlação ligeiramente negativa com a DMO. Além disso, após ajuste para múltiplas variáveis, nenhum parâmetro clínico periodontal afetou a DMO.

Jabbar et al. (2011) estudaram a relação entre a doença periodontal, os níveis plasmáticos de marcadores bioquímicos de remodelação óssea (OPG, RANKL, Vitamina D: 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> [25OHD]), antropometria e DMO em mulheres na pós-menopausa com e sem osteoporose. Mulheres com osteoporose apresentaram baixa concentração de estrógeno e Vitamina D, e maiores concentrações de hormônio da paratireoide sérico, proteína C reativa (PCR), IL-6, RANKL, OPG e marcadores bioquímicos de remodelação óssea que o grupo controle. Uma proporção significativamente maior de mulheres com osteoporose tinham doença periodontal ativa ou passada. A média de DMO na coluna e do colo do fêmur foram significativamente mais baixas em mulheres com doença periodontal ativa ou passada, em comparação com aquelas sem doença periodontal.

Mais recentemente, o estudo de Martínez-Maestre et al. (2012) avaliou a relação entre osteoporose e periodontite usando a fratura de coluna como um marcador de osteoporose e o exame clínico periodontal para definir periodontite. Os resultados demonstraram que, com exceção ao número de dentes e a porcentagem de sítios com NCI  $> 7$  mm, não houve diferenças clínicas significativas entre mulheres com e sem fraturas.



Gomes-Filho et al. (2012) investigaram o efeito da osteoporose na condição periodontal em mulheres na pós-menopausa em terapia periodontal, por meio de um estudo intervencional. PS, sangramento à sondagem e NCI antes do tratamento e em 1 e 4 meses após tratamento periodontal foram obtidos para classificação dos grupos com periodontite ou sem periodontite após tratamento periodontal não-cirúrgico. O diagnóstico de osteoporose foi realizado por densitometria óssea da coluna e proximal de fêmur. Todos os parâmetros clínicos periodontais diminuíram após o tratamento periodontal. Entretanto, a recidiva de periodontite foi maior em indivíduos com osteoporose em relação aos com densitometria óssea normal.

Pepelassi et al. 2012 avaliaram a relação entre a gravidade da periodontite e a osteoporose ou osteopenia, separadamente, em mulheres com periodontite generalizada. A osteoporose foi diagnosticada por densitometria óssea de coluna, fêmur e total de quadril. Os valores médios NCI foram maiores no grupo osteoporose em relação ao grupo normal. Além disso, as mulheres osteopênicas e as mulheres com densitometria óssea normal foram similares em relação ao sangramento à sondagem, PS, NCI e recessão gengival.

### **1.2.3. Influência da osteoporose no reparo ósseo alveolar**

Além do possível impacto negativo da osteoporose na estabilização de implantes, reabsorção de rebordo alveolar e doença periodontal, alguns trabalhos em animais também verificaram a influência desta patologia no reparo alveolar pós-extração dental.

Um estudo realizado por Hsieh et al. (1995) avaliou o efeito da OVX sobre a formação de osso alveolar. Os resultados demonstraram que a taxa de aposição mineral foi maior em 5 dias após a OVX e extração dental, o que indica o potencial máximo dos osteoblastos nesse período de tempo. Durante os 9 dias pós-extração, o aumento da remodelação cortical vestibular por osteoclastos e formação no córtex palatal estava presente. Esta tendência estava ainda mais acentuada pela OVX, evidenciando que a deficiência de estrógeno afetou a remodelação óssea alveolar após a extração.

Shimizu et al. (1998) avaliaram as superfícies ósseas alveolares maxilares em 4, 7, 30 e 60 dias após a extração do primeiro molar de ratas OVX ou não, por meio de microscopia eletrônica de varredura. A neoformação óssea pareceu ser maior nos animais ovariectomizados em relação aos que sofreram OVX simulada no quarto dia. No sétimo dia, áreas de neoformação óssea lamelares foram observados no lado mésio-bucal dos alvéolos no grupo OVX, mas menos proeminente comparado ao grupo OVX simulada. Aos 30 dias, os

alvéolos tinham sido consideravelmente preenchidos e, aos 60 dias, preenchidos completamente para ambos os grupos.

Outro estudo conduzido por Shimizu et al. (2000) avaliou os efeitos da deficiência de estrogênio induzida por OVX na morfologia do reparo ósseo, por meio de análises quantitativas de imagens ao microscópio eletrônico. Neste estudo, a extensão de osso neoformado no alvéolo foi significativamente menor nos animais OVX que nos animais submetidos à OVX simulada aos 30 e 60 dias. Aos 7 dias, a extensão de osso neoformado foi similar para ambos os grupos, porém, numericamente menor para o grupo OVX. Baseado nesses achados, os autores sugeriram que o reparo ósseo após extração dental foi significativamente diminuído pela deficiência de estrogênio induzida por OVX.

Tanaka et al. (2001) avaliaram os efeitos da deficiência de estrogênio induzida por OVX no reparo alveolar de molares maxilares em ratas, por meio de análises morfológicas de microscopia eletrônica de varredura e radiografia. Os autores observaram que a neoformação óssea ocorreu de maneira semelhante para ambos os grupos em 7 dias. Entretanto, nos intervalos de 30 e 60 dias após a extração, a lacuna de reabsorção óssea foi maior no grupo OVX que grupo controle (OVX simulada), evidenciando que o reparo alveolar no grupo OVX estava visivelmente atrasado. Os mesmos resultados foram encontrados para as análises histológicas e radiográficas.

Zecchin et al. (2005) descreveram o efeito da deficiência de estrogênio (modelo de OVX) sobre a expressão e atividade das matrizes de metaloproteinasas (MMP)-2 e MMP-9 e na expressão de colágenos tipo I e tipo III em alvéolos. Os resultados mostraram que a atividade de MMP-2 estava mais elevada que a atividade de MMP-9 em 3, 5 e 7 dias pós-extração para o grupo OVX. Esse grupo apresentou também uma significativa diminuição nas atividades de MMP-2 e de MMP-9 em relação ao grupo controle (OVX simulada) em todos os intervalos de tempo. A expressão gênica para MMP-9, colágeno tipo I e tipo III também estava diminuída no grupo OVX. Assim, os autores mostraram as primeiras evidências de que a ausência de estrogênio diminui as atividades de MMP-2 e MMP-9 durante o reparo alveolar.

Em 2007, Pereira et al. descreveram os efeitos da OVX no reparo de alvéolos após a extração bilateral do primeiro molar inferior em ratas utilizando histologia e análises radiográficas. Vinte e um dias após OVX ou OVX simulada (controle), os primeiros molares mandibulares foram extraídos. Os animais foram mortos nos dias 3, 5, 7, 14, 21 ou 28 após a extração dentária. As radiografias demonstraram um aumento significativo da área radiolúcida no grupo OVX em relação ao grupo controle para a densidade volumétrica mandibular e reparo ósseo do alvéolo. O grupo OVX apresentou valores inferiores quando comparado ao

grupo controle. Em conclusão, o estudo sugeriu que a falta de estrógeno reduz a neoformação óssea e, posteriormente, pode atrasar o reparo alveolar em ratas após a extração dentária.

Mais recentemente, Shoji et al. (2011) avaliaram histologicamente os efeitos em longo prazo (após 6 semanas, 6 meses e 9 meses) da OVX no volume ósseo alveolar pós-extração em um alvéolo cicatrizado. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a OVX e a OVX simulada após 9 meses em relação à porcentagem de volume ósseo/volume total. No entanto, dentro do grupo OVX, ocorreu uma diminuição significativa neste parâmetro ao longo do tempo. A quantidade de osteoclastos na superfície óssea do grupo OVX nos tempos 6 e 9 meses foram significativamente maiores que o grupo controle nos mesmos intervalos de tempo. A razão de formação óssea e de superfícies mineralizadas diminuiu no decorrer do tempo para ambos os grupos, sem diferenças significativas entre eles para nenhum tempo experimental. Entretanto, dentro do grupo OVX, houve diferenças entre 6 meses e tempo inicial, 9 meses e tempo inicial, e, 9 meses e 6 semanas para formação óssea. Em conclusão, o estudo demonstrou que a OVX aumentou o *turnover* celular no osso alveolar cicatrizado após extração dentária em mandíbula de ratas desdentadas ovariectomizadas. Isto resultou numa queda significativa de osso trabecular em função do tempo no grupo OVX.

### **1.3. Impacto da cafeína nos tecidos ósseos**

A cafeína, um dos principais tipos de metilxantina, é uma das substâncias farmacologicamente ativas mais utilizada em todo o mundo. A mesma está presente em chás, refrigerantes, produtos derivados do cacau e alguns medicamentos, embora seja bem reconhecido que em muitos países a cafeína é principalmente consumida como café. Além disso, o consumo de bebidas energéticas de elevado teor de cafeína tem aumentado significativamente nos últimos anos. Devido ao amplo consumo de cafeína por diferentes segmentos da população, a comunidade científica tem expressado grande interesse nos efeitos desfavoráveis que a mesma pode causar na saúde humana (NAWROT et al., 2003). Embora os efeitos da cafeína no metabolismo ósseo ainda não sejam totalmente esclarecidos, em geral, alguns possíveis mecanismos foram descritos pra tentar explicar o impacto deste fármaco sobre a massa óssea. O primeiro deles está atribuído à capacidade da cafeína em aumentar a excreção de cálcio (HEANEY, 2002). A cafeína foi relacionada ao aumento da excreção urinária de cálcio e, possivelmente, redução na absorção de cálcio endógena levando à um balanço negativo desse mineral. Embora alguns estudos em animais não tenham sido capazes de demonstrar um efeito negativo intenso da cafeína nos ossos, outros demonstraram efeitos

deletérios da cafeína no crescimento ósseo normal e diminuição do conteúdo de cálcio ósseo (OHTA et al., 1999; CHEN & WHITFORD, 1999; HUANG et al., 2002). Tem sido sugerido ainda que a cafeína poderia inibir a mineralização óssea, diferenciação de osteoblastos e formação da matriz extracelular, agravando o risco de osteoporose devido às alterações na microestrutura e redução na DMO, resultando numa maior suscetibilidade à fratura (RAPURI, et al., 2001; HEANEY, 2002; TSUANG, et al., 2006). No entanto, dados epidemiológicos e clínicos sobre a associação entre o consumo de cafeína e a condição óssea são bastante contraditórios (HEANEY, 2002).

### **1.3.1. Estudos *in vitro***

Estudos *in vitro* demonstraram um efeito direto da cafeína na expressão da proteína do receptor de vitamina D e na atividade da enzima fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação e ativação dos osteoblastos, indicando um mecanismo molecular provável para o papel da cafeína na osteoporose (RAPURI et al., 2007). Föcking et al. (2005) demonstraram que a cafeína amplifica drasticamente a atividade transcricional de receptores de glicocorticóides (RG) em células osteoblásticas. Os RGs são responsáveis pela regulação do comportamento, humor, memória e função neuroendócrina no sistema nervoso central, exercem ação inibidora sobre o sistema imunológico e regulam processos metabólicos na maioria dos tecidos e órgãos. Além disso, os agonistas do RG têm o potencial para reduzir o número de osteoblastos funcionais, promovendo apoptose celular osteoblástica. Esses dados fornecem evidências de que não só o genótipo pode influenciar se a cafeína tem impacto sobre a perda de massa óssea, mas também a concentração circulante de glicocorticóides. Dessa forma, a cafeína potencializa a função dos glicocorticóides, pode ter diferentes efeitos sobre a massa óssea em indivíduos com baixos níveis de glicocorticóides, quando comparados com indivíduos com níveis elevados devido à tratamentos medicamentosos ou secreção aumentada de cortisol iniciada por estresse físico ou emocional.

Tassinari et al. (1991) estudaram, por meio de análises bioquímicas, histoquímicas e de síntese de colágeno, os efeitos da cafeína no desenvolvimento e diferenciação de osteoblastos durante a formação da matriz óssea em cultura de células. Os resultados indicaram que não houve efeito da cafeína na taxa de proliferação celular. Após uma exposição de 24 horas, a presença de cadeias de colágeno aumentou nos meios de cultura, mas não nas camadas de células em comparação ao controle (sem cafeína), sugerindo que a cafeína pode interferir na etapa pós-tradução. Esses resultados mostraram que a exposição

crônica *in vitro* de cafeína inibe a formação e/ou a organização da matriz extracelular produzida pelos osteoblastos maduros. Isto é acompanhado pela diminuição da expressão do fenótipo osteoblástico, incluindo atrasos na expressão da atividade da fosfatase alcalina, decréscimo dose-dependente na expressão de osteocalcina, e em dose mais elevada (0,4 mM), inibição da mineralização.

Foi sugerido que, quando a prostaglandina (PG)E-2 está presente, o consumo de cafeína pode interferir negativamente na proliferação de osteoblastos. Para testar esta hipótese, um estudo *in vitro* de Kamagata-Kiyoura et al. (1999) foi realizado de maneira a determinar como e em qual proporção a cafeína e PGE-2 interagem, e qual é o efeito inibidor sobre a proliferação de osteoblastos. Osteoblastos foram cultivados com diferentes concentrações de cafeína e PGE-2 durante diferentes intervalos de tempo. Foi observado que embora nem cafeína (0,1 mM) nem PGE-2 (01g/ml) sozinhos demonstrassem qualquer efeito sobre a proliferação de osteoblastos, a combinação de cafeína e PGE-2 inibiu intensamente a proliferação dessas células.

Tsuang et al. (2006) investigaram a influência da cafeína no metabolismo de osteoblastos. Primeiramente, a biocompatibilidade foi avaliada por meio de testes de citotoxicidade e citocompatibilidade. Além disso, a proliferação celular, a expressão de alguns parâmetros bioquímicos de fenótipos osteoblásticos e o efeito da cafeína sobre a viabilidade dos osteoblastos também foram avaliados. Com relação às células osteoblásticas cultivadas com cafeína por um dia, não houve mudanças significativas na biocompatibilidade, enquanto que nas concentrações de 100 mM e 1 mM de cafeína, a biocompatibilidade foi significativamente diminuída no terceiro dia. Na cultura do dia 7, a diminuição da atividade dos osteoblastos foi observada na presença de várias concentrações de cafeína. A concentração de 10 mM de cafeína causou um efeito irreversível de morte celular. Este achado sugeriu que a cafeína poderia induzir a apoptose de osteoblastos, o que poderia ser um dos principais mecanismos da osteoporose associada à ingestão de cafeína.

Rapuri et al. (2007) sugeriram que a cafeína diminui a expressão do receptor de vitamina D (RVD) e afeta a atividade dos osteoblastos que, por sua vez, pode contribuir para a diminuição da DMO. Para isso, os autores examinaram o efeito de doses crescentes de cafeína (0,2 mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 10 mM) na expressão da proteína do receptor de vitamina D (RVD) e na atividade da fosfatase alcalina, como marcador de atividade dos osteoblastos, em cultura de células. Foi observado que a expressão do RVD foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de cafeína. A concentração de 1.0 mM foi capaz de afetar em 50% a expressão de RVD e a concentração de 10 mM em 70%. Em relação à

fosfatase alcalina, a concentração de 1 mM afetou significativamente a atividade da enzima. Em conclusão, os referidos resultados forneceram evidências de um efeito direto da cafeína na expressão da proteína do RVD e na atividade dos osteoblastos, o que poderia ser um dos prováveis mecanismos moleculares responsáveis pelo papel da cafeína na osteoporose.

Lu et al. (2008), com o objetivo de elucidar os mecanismos precisos de regulação de citotoxicidade desencadeada pela cafeína na osteoporose, examinaram os efeitos da cafeína em cultura osteoblastos humanos. Com base nos resultados do estudo, os autores propuseram um modelo de sinalização de injúria celular induzida pela cafeína nos osteoblastos. As experiências anteriores do mesmo grupo *in vivo* demonstraram que o consumo de cafeína provoca perda de DMO em modelo animal, possivelmente como resultado da citotoxicidade. Os osteoblastos foram submetidos à concentrações de cafeína que variavam entre 0 e 2 mM, por 24 horas. A viabilidade dos osteoblastos tratados foi reduzida em cerca de 10-35% em concentrações > 0,5 mM de cafeína, de maneira dose-dependente. Além disso, foi avaliado se a morte celular induzida pela cafeína acontecia por meio de apoptose ou necrose. A percentagem de células apoptóticas aumentou significativamente nas culturas expostas à concentrações de cafeína > 0,5 mM, e a população de células necróticas, simultaneamente, aumentou nas concentrações mais elevadas. Estes resultados indicaram que o tratamento com cafeína provoca dois modos de morte celular em osteoblastos, primeiramente apoptose, e, em menor extensão, necrose. Os autores salientaram que esses resultados fornecem evidências preliminares de que o alto consumo de cafeína pode ser um importante fator de risco para osteoporose.

Recentemente, Liu et al. (2011) investigaram os efeitos da cafeína na diferenciação das células progenitoras da medula óssea e na DMO (por meio de densitometria), em experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os efeitos de doses baixas e doses não-tóxicas de cafeína (0,005 mM a 0,1 mM) na osteoblastogênese (medido por meio da atividade de fosfatase alcalina) e na osteoclastogênese (medido por meio de ensaios para TRAP) foram examinados. Foi observado que a viabilidade das células da medula óssea não foi afetada pelo tratamento com cafeína. A cafeína não induziu apoptose celular e citotoxicidade e, não alterou a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização óssea durante a diferenciação das células progenitoras da medula óssea. Entretanto, baixas doses de cafeína foram capazes de aumentar a diferenciação dos osteoclastos a partir das células precursoras, ampliar a atividade de reabsorção óssea e a expressão de RANKL, além de reduzir a expressão de OPG.

### 1.3.2. Estudos em animais

A maioria dos estudos em animais demonstrou que a cafeína exerce efeitos deletérios sobre o tecido e/ou metabolismo ósseo.

Evidências sobre o efeito da cafeína no metabolismo ósseo foram demonstradas por Glajchen et al., em 1988. Os autores realizaram um estudo histomorfométrico e 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). Foi observado 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 (0, 3, 25 e 100 mg/kg por dia) nas concentrações de fluoretos, cálcio e fósforo, por meio de exames de urina, sangue e fezes. A dose mais elevada de cafeína foi associada à uma redução no conteúdo mineral ósseo de tíbia e ao aumento da excreção urinária de cálcio. No entanto, este efeito não foi suficiente para influenciar significativamente o equilíbrio do cálcio no organismo dos animais (CHEN & WHITFORD, 1999).

Ohta et al. (1999) avaliaram a hipótese de que a ingestão de cafeína atua como um fator de risco para a perda óssea em mulheres na pós-menopausa utilizando o modelo de ratas ovariectomizadas. Ratas ovariectomizadas que ingeriram cafeína apresentaram menor resistência óssea, quando comparado às ratas ovariectomizadas que não ingeriram cafeína (controle). Menores níveis de cálcio, magnésio, zinco, estrôncio e silício, sendo os três últimos estatisticamente significativos, foram encontrados nos animais sob efeito da cafeína. Dessa maneira, foi sugerido que a falta de alguns minerais poderia afetar o tamanho do cristal ósseo e aumentar a fragilidade óssea.

Sakamoto et al. (2001) estudaram o efeito da ingestão de café sobre os níveis séricos de osteocalcina, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , excreção urinária de fósforo, cálcio e desoxipiridinolina e volume ósseo e número de osteoclastos (TRAP) na metáfise proximal de tíbias de ratos. Os animais foram subdivididos em dois grupos: com e sem injeção de LPS. Após duas horas da injeção de LPS, amostras de sangue foram coletadas. Por meio de análises de histomorfometria óssea, biomarcadores séricos e urinários de renovação óssea, foi demonstrado que o consumo de café não ocasiona reabsorção óssea. Em comparação com a

dieta controle sem café, a elevada e baixa ingestão café não afetaram o número de osteoclastos, os níveis de desoxipiridinolina urinária e a osteocalcina no soro (que refletem a reabsorção óssea e formação óssea). O café levou à uma maior excreção urinária de fósforo comparada com a dieta controle. O estudo demonstrou que o TNF- $\alpha$  e IL-6 séricos aumentaram acentuadamente 2 horas após a injeção de LPS. No entanto, o subgrupo que consumiu café não apresentou efeito sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, com ou sem estimulação por LPS.

Ohta et al. (2002) investigaram os efeitos a ingestão de cafeína sobre as propriedades mecânicas do osso de ratos em crescimento. Ratos nascidos de mães tratadas com cafeína continuaram a ingestão da mesma após o nascimento por mais 22 dias. Ao dia 32, as ratas da segunda geração foram ovariectomizadas e mortas ao dia 52. Ambos, tensão máxima e módulo elástico ósseo do grupo cafeína foram significativamente menor do que no grupo controle (sem ingestão de cafeína). Quantidades de cálcio, magnésio e fósforo no grupo cafeína foram significativamente mais baixas do que no controle.

Com o objetivo de avaliar se um programa de treinamento com exercícios físicos tem a capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais da cafeína no metabolismo de crescimento ósseo, Huang et al. (2002), utilizaram ratos divididos em 4 grupos de acordo com a frequência de exercício físico e ingestão de cafeína por 10 semanas. As seguintes avaliações foram realizadas nas tíbias/fêmures: histomorfometria óssea, quantidade de osteoclastos, DMO e quantidade de cálcio. Não foi encontrada diferença estatística na quantidade de osteoclastos para nenhum grupo experimental. Os grupos usuários de cafeína apresentaram menor volume ósseo que os demais grupos. O grupo submetido à exercício físico sem cafeína apresentou uma maior proporção de volume ósseo. O estudo de área de crescimento histomorfométrica e medição de comprimento tibial representam o crescimento longitudinal do osso longo. Os grupos que ingeriram cafeína apresentaram um crescimento abaixo dos demais grupos, menor DMO e reduzida quantidade de cálcio no fêmur. No entanto, o exercício não foi capaz de neutralizar o efeito negativo da cafeína.

### **1.3.3. Estudos em humanos**

Em humanos, os efeitos da cafeína no tecido ósseo são bastante contraditórios. É importante salientar que os níveis de cafeína consumidos diariamente pelos participantes dos estudos foram obtidos geralmente por meio de questionários.



Cooper et al. (1992) examinaram a relação entre consumo de cafeína e DMO do esqueleto apendicular e axial, e a influência da cafeína nos fatores determinantes para densidade óssea. O consumo médio diário de cafeína foi de 210 mg, principalmente na forma de café, chás ou outras bebidas cafeinadas. Houve uma significativa correlação positiva entre o consumo de cafeína e a DMO da coluna e, entre o consumo de cafeína e a fratura de quadril.

O estudo de Harris e Dawson-hughes (1994) avaliou os efeitos do consumo de cafeína na massa óssea, diante da ingestão de diferentes doses de cálcio em mulheres na pós-menopausa. A média de ingestão diária de cafeína foi  $349 \pm 308$  mg. Houve uma significativa correlação positiva entre a ingestão de cafeína e cálcio. Por outro lado, mulheres que não consumiram doses adequadas de cálcio apresentaram maiores riscos para perda óssea. Os autores concluíram que o consumo diário de altas doses de cafeína pode acelerar a perda óssea na coluna e no corpo todo em mulheres que não fazem uso da dose recomendada de cálcio.

Parkard e Recker (1996) analisaram o consumo de cafeína e a massa óssea em mulheres jovens, na terceira década da vida. As participantes responderam à um questionário sobre estilo de vida, incluindo a ingestão de cálcio, cafeína, proteínas e outros nutrientes e, realizaram exames para averiguar a quantidade e qualidade óssea. A média de ingestão de cafeína foi de  $103 \pm 106$  mg/dia e variou entre 7 a 809 mg/dia. Os autores concluíram que a massa óssea em mulheres jovens estava positivamente correlacionado com a ingestão de cálcio e atividade física e negativamente com a ingestão de proteína. Não foi observado correlação entre a ingestão de cafeína e a massa óssea e nem efeitos nocivos da cafeína na saúde óssea geral.

Lloyd et al., em 1997, avaliaram o efeito da ingestão de cafeína em longo prazo na densidade óssea dos quadris e do esqueleto de mulheres saudáveis no estado pós-menopausa, que nunca haviam sido submetidas à terapia de reposição hormonal ou que a tivesse usado no último ano. De acordo com os relatos da quantidade de cafeína ingerida, as mulheres foram divididas em: baixo consumo (0 a 2 copos de café cafeinado), consumo moderado (3 a 4 copos) ou alto consumo ( $\geq 5$  copos). A ingestão de cafeína variou entre 0 e 1400 mg/dia. Não foi observada associação do consumo de cafeína com a baixa densidade óssea corpórea ou de quadril bem como alteração nos valores de densidade óssea. Assim, os autores sugeriram que a ingestão de cafeína não é um fator de risco para perda óssea em mulheres saudáveis na pós-menopausa.

Grainje et al. (1998) compararam os efeitos do consumo de diferentes quantidades de cigarro, álcool e cafeína (uso de questionário) na DMO. A medida de DMO foi realizada por

densitometria óssea no fêmur, coluna, radio, ulna e corpo todo. O consumo de cafeína foi expresso em mg/dia e calculado em 20, 30 e 40 anos de consumo. Os autores não encontraram evidências de que o consumo de cafeína afeta a DMO.

Conlisk e Galuska (2000) realizaram um estudo transversal para observar a relação entre a ingestão de cafeína e a densidade óssea em mulheres jovens e a associação entre a ingestão de cafeína e DMO nas mulheres que fazem uso de níveis baixos de cálcio na dieta. 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, consumo 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, nem mesmo naquelas que fizeram pouca utilização de cálcio na dieta.

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 ( $> 300$  mg/dia) e baixas ( $\leq 300$  mg/dia) doses de cafeína na perda óssea em mulheres idosas em um estudo longitudinal em três anos. Além disso, esse estudo avaliou a associação entre a ingestão de cafeína, o genótipo de RVD e a perda óssea. 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 a ingestão de cafeína  $> 300$  mg/dia pode causar perda óssea. Além disso, foi demonstrado que a ingestão de cafeína é um fator capaz de alterar a predisposição genética para a remodelação óssea. Na pós-menopausa, as mulheres idosas com a variante genética de tt para RVD foram mais suscetíveis aos efeitos negativos da cafeína por meio da evidenciação de taxas de perda óssea mais elevadas.

Ilich et al. (2002) relacionaram o consumo de bebidas alcoólicas, cafeína e a condição de ex-fumante (uso de questionário) com a DMO em mulheres idosas. A fim de detectar outras possíveis desordens comuns em idosos, como a baixa circulação de vitamina D ou hiperparatireoidismo, amostras de soro foram analisadas para os níveis de cálcio sérico, vitamina D e do hormônio da paratireóide. As frequências de ingestão de cafeína foram associadas à exames de densidade óssea em várias regiões do esqueleto. O consumo de altos níveis de cafeína (200-300 mg/dia) durante dois anos apresentou uma associação negativa com a DMO na maioria dos locais do esqueleto. Porém, esse efeito foi atenuado nas mulheres com ingestão de cálcio maior ou igual a 750 mg/dia. Os autores concluíram que a ingestão de

cafeína está associada à baixa DMO, porém esse efeito pode ser diminuído pela ingestão de altas concentrações de cálcio.

Wetmore et al. (2008) levantaram a hipótese que a ingestão de altas doses de cafeína estaria associada à baixa DMO e à alterações na DMO em mulheres com idades entre 14 e 40 anos durante 36 meses. O consumo de cafeína, obtido por meio de questionários, foi classificado nos seguintes escores: nenhum (0 mg/dia), baixo ( $\leq 200$  mg/dia) e alto ( $\geq 200$  mg/dia). As medidas de DMO foram obtidas por densitometria óssea de quadril, coluna vertebral e corpo inteiro. Os autores observaram que, em mulheres jovens, não houve associação entre alto consumo de cafeína e as medidas de DMO.

Em 2009, Waugh et al. avaliaram as evidências científicas que identificaram fatores de risco para baixa DMO em mulheres saudáveis com idade entre 40-60 anos. A partir de uma busca na literatura de trabalhos publicados entre 1999 e 2006, os autores selecionaram estudos observacionais de coorte, caso-controle e transversais, nos quais a DMO foi obtida por densitometria óssea. De um total de 1556 artigos, apenas 13 foram utilizados. Os resultados demonstraram que não existem evidências consistentes para a associação entre a ingestão ou história de ingestão de cafeína e a DMO.

#### **1.4. Efeitos da cafeína no reparo ósseo**

Poucos estudos até o presente momento investigaram os efeitos da cafeína no reparo ósseo e, nenhum estudo avaliou seu impacto no reparo alveolar pós-extração.

Lacerda et al. (2010) avaliaram os efeitos do consumo diário de café (correspondente a 240 ml por dia para uma pessoa de 60 kg) no metabolismo ósseo de ratos (nascidos de ratas que também consumiram café por 30 dias) por meio de análises bioquímicas de cálcio no sangue, urina e osso alveolar e análises de densitometria e histomorfometria. Após 60 dias do nascimento e ingestão de café, os incisivos superiores direitos foram extraídos. Os ratos foram mortos após 7, 21 e 42 dias. Os resultados bioquímicos mostraram que os níveis de cálcio na urina, plasma e osso maxilar (sem ingestão de café) foram significativamente inferiores nos animais tratados com café em relação ao controle. As avaliações radiográficas dos alvéolos demonstraram maior radiolucência nos animais tratados com café. A avaliação histomorfométrica demonstrou que, após uma semana, osteoblastos foram encontrados nas trabéculas ósseas imaturas, envolvidos em coágulos remanescentes e grande quantidade de tecido conjuntivo em ambos os grupos. Após 42 dias, o defeito ósseo estava preenchido com

osso trabecular compacto envolto por pequenas áreas de tecido conjuntivo maduro. Entretanto, esses achados para o grupo cafeína foram em média 10-20% menores quando comparadas ao grupo controle. Os autores concluíram que o café/cafeína provoca efeitos adversos no metabolismo do cálcio em ratos, incluindo aumento dos níveis de cálcio na urina e no plasma, diminuição da DMO e atraso no processo de reparação óssea.

Um estudo de nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da ingestão de altas doses de cafeína (10mg/100g peso corpóreo/dia) nos estágios iniciais do reparo ósseo. Ratos (machos) ingeriram água (grupo controle) ou cafeína (grupo teste) durante 56 dias. Ao dia 48, um defeito ósseo de tamanho crítico (3 mm de diâmetro) foi realizado na tíbia dos animais. De acordo com os resultados, o grupo cafeína ( $27,69 \pm 6,38\%$ ) apresentou uma significativa menor proporção de osso neoformado no defeito ósseo em relação ao grupo controle ( $86,80 \pm 1,70\%$ ). Além disso cortes histológicos mostraram evidências de tecido ósseo imaturo, desorganizado e uma fina camada de osso cortical formada (em relação à pré-existente) no grupo cafeína. Esses achados sugerem que a ingestão diária de altas doses de cafeína durante 56 dias promoveu um efeito prejudicial nos estágios iniciais do reparo ósseo de um defeito de tamanho crítico em tíbias de ratos (DUARTE et al. 2009).

### **1.5. Efeitos da cafeína nos tecidos periodontais**

A relação direta entre o consumo de cafeína e os tecidos periodontais foi avaliada por um estudo do nosso grupo de pesquisa, em 2008 (Bezerra et al. 2008). Ratos (machos) foram submetidos à ingestão diária de doses altas de cafeína (10mg/100g peso corpóreo/dia) ou água (grupo controle) e à colocação de ligadura. Os resultados demonstraram que a ingestão de cafeína por si só não afetou a perda óssea alveolar nos dentes sem ligadura. Entretanto, na presença de ligadura, os animais que ingeriram cafeína apresentaram uma potencializada e significativa perda óssea na região de furca em relação aos dentes com ligadura do grupo controle. Dessa maneira, conclui-se que a ingestão de altas doses de cafeína aumenta a perda óssea induzida por ligadura em ratos.

## **2. PROPOSIÇÃO**

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da cafeína e/ou deficiência de estrógeno sobre:

1 - A perda óssea induzida por ligadura e área de osso alveolar trabecular por análises histométricas, histoquímicas (fosfatase ácido tartarato resistente [TRAP]) e imunohistoquímicas (RANKL e OPG);

2 – Reparo ósseo alveolar após a extração do dente por meio de análises de expressão gênica e histométricas.

### 3. ARTIGO

#### **EFFECTS OF ESTROGEN DEFICIENCY AND/OR CAFFEINE INTAKE ON ALVEOLAR BONE LOSS, DENSITY AND HEALING: A STUDY IN RATS.**

Aceito para publicação - *Journal of Periodontology* (doi: 10.1902/jop.2012.120192)

**Background:** To evaluate the effects of caffeine and/or estrogen deficiency on ligature-induced bone loss (BL), trabecular bone area (TBA) and post-extraction bone healing (BH).

**Methods:** Rats were assigned into one of the groups: *Control*: non-ingestion of caffeine/sham-surgery (n=15); *Caffeine*: ingestion of caffeine/sham-surgery (n=15); *Ovariectomized (OVX)*: non-ingestion of caffeine/ovariectomy (n=15); *Caffeine/OVX*: ingestion of caffeine/ovariectomy. The rats were under caffeine administration during 65 days and/or estrogen deficiency for 51 days. On the 21<sup>st</sup> day after ovariectomy, one first mandibular molar received a ligature while the contralateral tooth was left unligated. The first maxillary molars were extracted at 8 days before sacrifice. BL, TBA, the positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were analyzed in the furcation area of mandibular molars. Histometric BH and gene expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-7, osteopontin and bone sialoprotein were evaluated in alveolar sockets. **Results:** The caffeine group presented the greatest BL and the OVX group the highest number of TRAP+ cells around ligated teeth (p<0.05). The control group presented higher TBA and BH than the other groups (p<0.05). All test groups presented higher RANKL/OPG+ cells than the control group around ligated/unligated teeth. The OVX and caffeine/OVX groups presented greater number of TRAP+ cells around unligated teeth than the control group (p<0.05). There were no differences among groups for gene expression (p>0.05). **Conclusions:** Caffeine increased BL in the presence of ligature. Caffeine and/or estrogen deficiency decreased TBA in absence of ligature and reduced BH after tooth extraction.

**Key Words:** Ovariectomy, caffeine, alveolar bone loss, RANK ligand, osteoprotegerin.

## Introduction

Osteoporosis is a bone disease characterized by decrease in bone mass, deterioration of microstructure and increased susceptibility to fracture.<sup>1</sup> During the first years after menopause, decreased estrogen levels normally lead to rapid bone loss (BL), with slower age-related BL occurring during later life. Of its several biological functions, estrogen reduces BL and the risk of bone fractures and increases calcium absorption by displaying multiple positive impacts on the metabolism of bone-related cells.<sup>2,3</sup>

In addition to the two well known physiological factors involved in osteoporosis, age and estrogen deficiency, some lifestyles such as high caffeine intake may accelerate the process of osteoporosis.<sup>4,5</sup> Caffeine is a commonly consumed psychostimulant, which is present in coffee, tea, several beverages and over-the-counter medications. Although the actual effects of caffeine on bone are still controversial<sup>6</sup>, some studies have suggested that chronic caffeine intake may induce a damaging impact on bone tissue, including decreased bone mineral density<sup>4,5</sup>, increased risk of bone fracture<sup>7</sup> and reduction in calcium absorption.<sup>7,8</sup> Interestingly, epidemiological studies have demonstrated that regular consumption of caffeine had negative effects on bone mass among elderly postmenopausal women<sup>4,5</sup>, but not among young women<sup>9</sup>, suggesting that different levels of estrogen can interfere in the action of caffeine on bone metabolism.

Alveolar bone is critical for tooth support and the rehabilitation of edentulous patients with dental implants and prostheses. Therefore, it is important to identify the pathologies and lifestyles that affect alveolar BL, quality and healing and their possible mechanisms of actions. The clinical influence of osteoporosis/estrogen deficiency and caffeine ingestion on the loss of periodontal attachment and height of the alveolar bone are still unclear.<sup>10,11</sup> Previous studies in rats have demonstrated that estrogen deficiency may decrease alveolar bone healing (BH)<sup>12-14</sup>, increase ligature-induced alveolar BL<sup>15,16</sup> and reduce mandibular bone density (BD).<sup>10,17</sup> In addition, preliminary studies from our research group showed that chronic intake of high doses of caffeine increased ligature-induced BL and disturbed the early stages of BH in a critical-sized surgical defect in rat tibiae.<sup>18,19</sup>

Zhou *et al.*<sup>20</sup> hypothesized that caffeine may exert negative effects on bone particularly in the absence or low levels of estrogen and that estrogen sufficiency may antagonize the impact of caffeine on bone. However, there are no data in the literature that determine the effects of caffeine intake, associated with estrogen deficiency, on alveolar bone. As such, the aims of this study were to evaluate the effects of caffeine and/or estrogen deficiency, on: 1- ligature-

induced BL and alveolar trabecular bone area (TBA) by histometric, histochemical (tartrate resistant acid phosphatase [TRAP]) and immunohistochemical (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand [RANKL] and osteoprotegerin [OPG]) analyses; 2- alveolar BH after tooth extraction by histometric and gene expression analyses. It was hypothesized that caffeine exerts exacerbated negative effects on alveolar bone in the absence, or low level, of estrogen.

## **Materials and Methods**

### ***Animals***

The Institutional Committee for Animal Care and Use at Guarulhos University (Guarulhos, São Paulo, Brazil) approved the study protocol. Sixty female Wistar rats were obtained from the University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) and used in this study. The rats were 90 days of age, weighed an average of  $206.4 \pm 14.1$  g at baseline and underwent an acclimatization period of 5 days. During the acclimatization and experimental period of 65 days, each animal was housed alone in plastic cages in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University. The animals were kept with access to food<sup>1</sup> and drinking water *ad libitum*, with the exception of the ovariectomized (OVX) rats, whose food consumption was restricted to match their body weights to those of sham-OVX rats.<sup>21</sup> The animals were in a room with a 12-hour light/dark cycle and temperature between 22°C and 24°C.

### ***Experimental groups***

The rats were randomly assigned to one of the following groups:

*Control group*: animals without caffeine ingestion submitted to sham-surgery (n=15); *Caffeine group*: animals ingesting caffeine and submitted to sham-surgery (n=15); *OVX group*: animals without caffeine ingestion submitted to ovariectomy (n=15); *Caffeine/OVX group*: animals ingesting caffeine and submitted to ovariectomy (n=15).

### ***Caffeine administration***

Thirty rats (caffeine and caffeine/OVX groups) ingested 10mg/100g body weight/day of caffeine via drinking water for 65 days (Figure 1). Since the rats were kept alone in the cages, the mean volume of water consumption by each animal per day was obtained during the acclimatization period. Therefore, the dose of caffeine required was diluted in a volume of water 50 ml lower than this mean volume that was observed to be consumed per day by each animal. Daily, it was checked if the total volume of caffeine-supplemented water offered was effectively consumed. In addition, the amount of caffeine in the water was adjusted on the

---

<sup>1</sup> Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil



first, third and fifth day of each week according to the body of the animals throughout the experimental period. Therefore, although the intake was voluntary, the dose of caffeine consumed remained constant throughout the study and did not differ among animals.<sup>18,19</sup>

### ***Ovariectomy***

On the 14<sup>th</sup> day after the beginning of caffeine ingestion (Figure 1), the animals were anesthetized by intramuscular administration of xylazine (0.3 ml/kg)<sup>2</sup> and ketamine (0.5ml/Kg)<sup>||</sup> for ovariectomy or sham surgeries. Bilateral ovariectomies were performed in 30 rats (OVX and caffeine/OVX groups) using a dorsal approach.<sup>15,21</sup> The remaining 30 animals (control and caffeine groups) were submitted to sham surgeries in which the ovaries were lifted up and returned intact to their original position. Postoperatively, the animals received analgesic<sup>¶</sup> given as a single intramuscular injection.

### ***Ligature placement and tooth extractions***

Thirty-five days after the beginning of caffeine ingestion and 21 days after ovariectomy and sham surgeries (Figure 1), the animals received a ligature after general anesthesia. A cotton ligature was placed in the cervical position of the first right mandibular molar in order to induce alveolar BL, while the contralateral molar was left without ligature.<sup>15,18</sup> Twenty-two days later (Figure 1), the right and left first maxillary molars were extracted<sup>12</sup> under general anesthesia with a micro-chisel. Thirty days after ligature placement and eight days after tooth extractions (Figure 1), the animals were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. The success of the ovariectomy was confirmed by the absence of the ovaries and the atrophy of uterine horns in the OVX rats. In addition, the presence of normal uterine horns confirmed the success of the sham surgery.

### ***Gene expression***

Gene expression protocol was performed as previously described.<sup>22</sup> Samples of granulation tissue from ten sockets per group of the right maxillary first molar were evaluated for mRNA levels of bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-7, bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The granulation tissue was collected with a dentine excavator and stored in proper solution<sup>#</sup> at -20°C.

---

<sup>2</sup> Virbaxil<sup>®</sup>; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil

<sup>||</sup> Francotar<sup>®</sup>; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil

<sup>¶</sup> Sodium dipirone<sup>®</sup>, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>#</sup> RNA later, Ambion Inc., Austin, TX, USA

*RNA extraction:* Total RNA from the samples was isolated by the trizol method<sup>3</sup>, according to the manufacturer's recommendation. RNA pellets were resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water and stored at -70°C. The RNA concentration was determined from the optical density using a micro-volume spectrophotometer<sup>4</sup>.

*cDNA synthesis:* Total RNA was DNase treated<sup>5</sup>, and 1.25 µg was used for cDNA synthesis. The reaction was carried out using a synthesis kit<sup>6</sup>, following the manufacturer's recommendations.

*Primer design:* Primers were designed using a probe-design software<sup>|||</sup>. The primer sequences, amplification profiles [temperature (°C)/time (s)] and lengths of PCR products (bp) were established as follows: BMP-2: forward primer: GTCCCTACTGATGAGTTTCTC; reverse primer: AACCTGGTGTCCAATAGTC; amplification profile: 95/10 - 56/8 - 72/7; 170bp, BMP-7: forward primer: CACTTCATCAACCCAGACAC; reverse primer: TCAGGGTCTCAGGAAGACC; amplification profile: 95/10 - 57/8 - 72/7; 165bp, BSP: forward primer: GCAACGAGTACAACACTGC; reverse primer: CACTGGTGGTAGTAATAATCCTG; amplification profile: 95/10 - 56/8 - 72/6; 151bp, OPN: forward primer: CCGGATGCAATCGATAGTG; reverse primer: GAAATGCGGAATTTTCAGATAACC; amplification profile: 95/10 - 56/8 - 72/7; 164bp, GAPDH: forward primer: TGAGTATGTCGTGGAGTCTACTG; reverse primer: TTGAGGGAGTTGTCATATTTCTCG; amplification profile: 95/10 - 56/8 - 72/6; 159bp.

*Real-time polymerase chain reaction (PCR):* Quantitative PCR was performed in a real-time PCR apparatus<sup>¶¶</sup> using a proper kit<sup>###</sup>. Results are expressed as relative amounts of the target genes using GAPDH as the inner reference gene by means of a relative quantification tool<sup>7</sup>, following the manufacturer's recommendations.

### ***Histological procedures and histometric analysis***

BL measurements were performed in ligated and unligated teeth of mandibular first molars. TBA measurements were performed in unligated teeth of mandibular first molars, while

<sup>3</sup> Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA

<sup>4</sup> Nanodrop 1000, Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, NC, USA

<sup>5</sup> Turbo DNA-free, Ambion Inc., Austin, TX, USA

<sup>6</sup> First-Strand cDNA, Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA

<sup>|||</sup> Light-Cycler Roche probe design software, Diagnostics GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany

<sup>¶¶</sup> LightCycler System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany

<sup>###</sup> Syber Green, FastStart DNA Masterplus Syber Green, Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA

<sup>7</sup> LightCyclers Software 4, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany

alveolar BH was evaluated in the alveolus of the extracted left maxillary first molar. The lower and upper jaws of the rats were removed and fixed in modified Karnovsky's solution (2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde and 0.2% picric acid) for 24 hours. The specimens were decalcified in a solution containing 10% ethylene-diamine tetraacetic acid for 60 days, dehydrated in an ascending series of ethanol solutions and embedded in paraffin. Serial sections (5  $\mu\text{m}$ ) were obtained in a mesio-distal vertical direction of the mandibular molars and in a transversal direction of the maxilla. After excluding the first and last sections, in which the furcation area was totally evident, ten sections, 30  $\mu\text{m}$  apart, of each mandibular first molar were chosen for BL and TBA evaluations. These ten sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) solutions, while other two and four sections were selected for histochemistry and immunohistochemistry, respectively. After excluding the first and last sections in which the alveolus of the disto-buccal root of the extracted maxillary left first molar was evident, ten sections, 30  $\mu\text{m}$  apart, were chosen for BH analysis. For BL, the areas between the inter-radicular bone crest and the furcation roof ( $\text{mm}^2$ ) of the mandibular molars were histometrically determined. For the analysis of tooth-supporting alveolar TBA, a standardized rectangular area (1  $\text{mm}^2$ ) was delimited in the furcation area of the unligated teeth. Subsequently, a checkered diagram (grid) was overlaid on this area, constituting a drawing with 358 intersections. The number of intersections presenting bone tissue was counted. TBA was calculated according to the following formula:  $\text{TBA} = \text{number of intersections with bone counted} \times 100/358$ . For the analysis of BH, a checkered diagram was used to count the total number of intersections on the alveolus. Subsequently, the number of intersections, under which new bone was formed, was counted. The percentage of newly-formed bone was obtained according to the following formula:  $\text{BH} = \text{number of intersections with new bone} \times 100/ \text{total number of intersections on the alveolus}$ . All analyses were performed using image analysis software<sup>8</sup> by one trained, calibrated and blinded examiner (AS)<sup>18-19</sup>.

### ***Histochemical analysis***

TRAP staining was performed to identify and quantify bone-resorption associated cells.<sup>23</sup> Two sections of the central portion of the mandibular molars were deparafinized and incubated at 37°C for 30 min in a solution containing 4mg naphthol AS-BI<sup>9</sup>, 24 mg red violet salt<sup>†††</sup>, 30mL acetate buffer (pH 5.2) and 0.3 mmol/L tartrate (pH 5)<sup>†††</sup>. Subsequently, the sections were washed in distilled water and counter-stained with fast green<sup>†††</sup>. Consecutive

---

<sup>8</sup> NIS Elements Br, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, EUA

<sup>9</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA

sections were incubated in substrate-free medium as a negative control for TRAP activity. The number of cells with granules of TRAP reaction products presenting  $\geq 3$  nuclei was counted in the furcation bone of ligated and unligated molars by one trained, calibrated and blinded examiner (JPB), using image analysis software<sup>†††</sup>. Data were expressed as number of TRAP+ cells per mm<sup>2</sup> of bone.

### ***Immunohistochemical analysis***

Four sections of the central portion of the mandibular molars were mounted on glass slides pre-treated with 3-aminopropyltriethoxy-silane<sup>†††</sup> for RANKL and OPG immunohistochemical analysis. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes to eliminate endogenous peroxidase. The sections were blocked with PBS-1% bovine serum albumin for 30 minutes at room temperature before incubation with the primary antibody<sup>§§§</sup> (polyclonal antibodies against RANKL [5µg/ml] or OPG [5µg/ml]) for 3 hours at room temperature. Sections were incubated with biotinylated secondary antibody for 45 minutes at room temperature. Subsequently, slides were treated with the streptavidin peroxidase conjugate<sup>||||</sup> for 30 minutes at room temperature, and the specific reaction for each antibody was visualized using 3,3'-diaminobenzidine. The slides were counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated through graded ethanol, cleared in xylene, and mounted on slides with the aid of Permount mounting media<sup>†††</sup>. Negative controls were obtained by omission of the primary antibodies. The number of RANKL+ and OPG+ cells was counted in the furcation bone of ligated and unligated molars by one trained, calibrated and blinded examiner (JPB), using image analysis software<sup>†††</sup>. Since RANKL and OPG are recognized as positive and negative regulators of osteoclastogenesis<sup>24</sup>, respectively, the data were expressed as ratio of RANKL/OPG+ cells per mm<sup>2</sup> of bone. This ratio was obtained by dividing the total number of RANKL+ cells by the total number of OPG+ cells.

### ***Examiner calibration***

Calibration exercises were conducted before the beginning of the study for all measurements. Intra-examiner calibration was achieved by examining ten non-study sections twice, with an interval of 48 hours between measurements. Intra-examiner reproducibility of all measurements achieved  $\geq 90\%$ , by intra-class correlation.

### ***Statistical analysis***

The ideal sample size to assure adequate power in this study was calculated considering differences of 0.5 mm<sup>2</sup> between groups for BL in ligated teeth and a standard deviation of 0.5

---

<sup>§§§</sup> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

<sup>||||</sup> Goat ImmunoCruz<sup>™</sup> Staining System, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

mm<sup>2</sup>.<sup>18</sup> Based on these data, it was determined that 14 rats per group would be necessary to provide an 85% power with an alpha of 0.05. However, considering the possibility of loss of animals, 15 rats were included per group. Statistical analyses were performed using statistical software<sup>¶¶¶</sup>. Data were first examined for normality by the Kolmogorov-Smirnov test and, since data demonstrated normality, analyses were performed using parametric methods. BL, TRAP+ cells and the ratio of RANKL/OPG+ cells were computed for each tooth and averaged across unligated and ligated teeth of the experimental groups. TBA was averaged across unligated teeth of each experimental group. BH and the mRNA levels were computed for the teeth extracted and averaged across groups. ANOVA was used to demonstrate significant differences among groups. If significance was detected, the pair-wise multiple comparison Tukey test was used to assess differences among groups. In addition, the t-test was used for intragroup BL comparisons between ligated and unligated teeth. The significance level established for all analyses was 5% (p< 0.05).

## RESULTS

### *Body weight*

All animals gained weight during the study. The final mean body weights did not differ among groups (p>0.05; 356 ± 27g, 372 ± 22g, 385 ± 18g and 337 ± 16g for control, caffeine, OVX and caffeine/OVX groups, respectively).

### *Histometric analysis*

*BL*: Ligated teeth presented higher BL when compared to unligated teeth in all experimental groups (p<0.05), showing that ligature model was able to induce loss of bone. Table 1 shows the differences among groups for BL around ligated and unligated teeth. There were no differences among groups for BL around unligated teeth (p>0.05). The caffeine group presented a greater BL than the control group around ligated teeth (p<0.05). Although not significant (p>0.05), BL around the ligated teeth of the OVX and caffeine/OVX groups tended to be higher than that of the control group. Figure 2 presents the histological findings for ligated and unligated teeth of all experimental groups. The distance between the bone crest and furcation roof around the ligated teeth of the control group was lower than those of the test groups (Figure 2 E).

*TBA*: TBAs were lower in the caffeine, OVX and caffeine/OVX groups, when compared to the control group (Table 1; p<0.05). Figure 2 illustrates the histological findings of TBA,

---

¶¶¶ BioEstat 5.0, Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, AM, Brazil

showing enlargement of trabecular spaces and marrow cavities on the furcation bone of caffeine (Figure 2 B), OVX (Figure 2C) and caffeine/OVX (Figure 2D).

*BH*: The percentages of BH in the disto-buccal root of the maxillary first molar were lower in the caffeine, OVX and caffeine/OVX groups than in the control group (Table 1;  $p < 0.05$ ). In addition, the OVX and caffeine/OVX groups presented lower BH than the caffeine group (Table 1;  $p < 0.05$ ). Figure 3 illustrates the histological findings of BH, showing reduced newly-formed bone in the alveolus of the caffeine (Figure 3B), OVX (Figure 3C) and caffeine/OVX groups (Figure 3D).

### ***TRAP staining***

Table 1 presents the number of TRAP+ cells around ligated and unligated teeth. With regard to unligated teeth, both OVX and caffeine/OVX groups presented a greater number of TRAP+ cells than the control group ( $p < 0.05$ ). The number of TRAP+ cells was higher in the OVX group, when compared to the control group, around ligated teeth ( $p < 0.05$ ). Although not significant ( $p > 0.05$ ), the number of TRAP+ cells around ligated teeth of caffeine and caffeine/OVX groups tended to be higher than in the control group. Figure 4 illustrates TRAP staining around unligated teeth of all experimental groups.

### ***Immunohistochemical analysis***

The caffeine, OVX and caffeine/OVX groups demonstrated a higher ratio of RANKL/OPG+ cells around unligated teeth than the control group. In addition, the unligated teeth of the caffeine/OVX group presented a greater proportion of RANKL/OPG+ cells than the caffeine and OVX groups (Table 1  $p < 0.05$ ). The ratios of RANKL/OPG+ cells around ligated teeth were higher in the caffeine, OVX and caffeine/OVX groups than around control group (Table 1;  $p < 0.05$ ). Figure 4 illustrates immunohistochemical staining for RANKL and OPG around unligated teeth of experimental all groups.

### ***Gene expression***

Table 2 shows the mRNA levels of all genes studied for all experimental groups. There were no significant differences among groups for the expression of any gene evaluated ( $p > 0.05$ ).

## **Discussion**

This animal study assessed the effects of caffeine intake, associated with estrogen deficiency, on alveolar bone, evaluating the BL induced by biofilm accumulation, the TBA in the absence of bacterial challenge and the BH after tooth extraction. The results demonstrated that caffeine induced detrimental effects on ligature-induced BL, TBA and BH while estrogen deficiency mostly presented harmful effects on TBA and BH. In addition, both conditions

altered to some extent the levels of bone-resorption cells or the balance between RANKL and OPG. However, a synergic deleterious effect of caffeine intake and estrogen deficiency was not observed for the majority of parameters evaluated. Therefore, the hypothesis that caffeine's negative effects on alveolar bone may be exacerbated in the presence of reduced levels of estrogen was rejected.

OVX rats are suitable for studying bone disorders related to postmenopause, since ovariectomy is a well-recognized model able to induce estrogen deficiency that demonstrates similarities with postmenopausal osteoporosis, including an increased rate of bone turnover, with resorption exceeding formation.<sup>21</sup> In this study, caffeine was administered in the drinking water in order to simulate its chronic consumption in humans. As reported in previous studies, the dose of caffeine administered was able to induce alterations in bone tissue and markers<sup>6,18,19</sup> and calculated to be equivalent to 1360mg/70 kg<sup>0.75</sup> in humans (a daily consumption of 16 cups of coffee), when the conversion is based on the metabolic body weight (kg<sup>0.75</sup>).<sup>19</sup> It has been shown that a moderate daily caffeine intake of up to 420mg/70 kg<sup>0.75</sup> in healthy humans is not associated with adverse effects on bone and other systems.<sup>25</sup> The ligature model is able to induce changes in the periodontal tissues similar to those observed in human periodontitis, including rupture and apical migration of junctional epithelium, influx of inflammatory cells and loss of ligament fibers and bone in the interproximal and furcation areas.<sup>15,18</sup> In this study, bone loss was assessed in the furcation area because it is easier to determine the bone loss between the inter-radicular bone crest and the furcation roof than between the enamel-cement junction and the interproximal bone crest. In addition, the knot of the ligature is positioned in the mesial face of the first molars, which could affect the bone loss level in the interproximal areas.<sup>15,18</sup>

The results of this study showed that caffeine ingestion increased BL and the ratio of RANKL/OPG+ cells in the presence, but not in the absence, of ligature, corroborating previous findings from our research group.<sup>18</sup> In fact, caffeine seems to influence bone resorption indirectly by the stimulation of inflammatory mediators<sup>30-31</sup>. Previous studies have demonstrated that caffeine increased cyclooxygenases/prostaglandin E<sub>2</sub>-regulated RANKL-mediated osteoclastogenesis<sup>30</sup> and may potentiate the inhibitory effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on osteoblast-like cells.<sup>31</sup> Therefore, it could be speculated that, under a periodontal infection (i.e. presence of ligature), BL could be more pronounced due to the combined effects of biofilm and caffeine on inflammatory mediator stimulation. In this study, at a histometric level, estrogen deficiency did not significantly increase ligature-induced BL. In agreement with these results, Vaziri *et al.*<sup>26</sup> observed that estrogen deficiency alone induced minimal

alveolar bone and attachment losses at 4 weeks after ovariectomy and ligature placement. In addition, Anbinder *et al.*<sup>27</sup> found no differences in alveolar BL between estrogen-deficient and estrogen-sufficient rats at 5 weeks after ligature placement. On the other hand, Allam *et al.*<sup>28</sup> showed a more pronounced histological BL and intense RANKL immunoreactivity in the bone and ligament of OVX rats with ligature, when compared to non-OVX animals. Noteworthy, in the ligated teeth, there was an increased number of TRAP+ cells in the OVX group and an elevated ratio of RANKL/OPG+ cells in the OVX and caffeine/OVX groups. Therefore, although histometric damage was not detected, estrogen deficiency deregulated the levels of bone resorption-related factors. As a consequence of these cellular and molecular findings, it is possible to suggest that significant histometric damage could occur in the ligature-induced BL of the OVX groups during long-term exposure to estrogen deficiency and ligature, as observed in previous reports.<sup>15,16,29</sup> Nevertheless, additional studies are necessary to prove this hypothesis. In addition to its action on bone cells, estrogen regulates the immune system and T cells. *In vivo* and *in vitro* models of postmenopausal osteoporosis have suggested that estrogen deficiency increases the production of pro-inflammatory cytokines by immune cells that, in turn, intensify osteoclastogenesis and bone resorption.<sup>1,2</sup>

BL did not differ among groups around the unligated teeth, indicating that caffeine and/or estrogen deficiency *per se* may not affect BL in the absence of plaque accumulation. However, TBA was higher in the control than all other groups, inferring that the estrogen deficiency or high doses of caffeine may affect BD regardless of biofilm. Our group has previously noted that caffeine intake alone decreases alveolar TBA in rats.<sup>32</sup> Regarding long bone, the effects of caffeine remain still controversial. Some previous data have shown that long-term caffeine consumption significantly decreases BD in long bone of rats.<sup>30,33</sup> On the other hand, other studies failed to find histomorphometric differences in the medullar area of the tibial metaphyseal bone between animals that ingested caffeine and controls.<sup>6, 19</sup> In support of our results, the OVX rat models<sup>28,34,35</sup> and clinical studies<sup>10,36</sup> have demonstrated that estrogen deficiency may reduce alveolar BD under periodontally-healthy condition.

This study demonstrated that estrogen depletion alone and combined with caffeine intake increased the number of TRAP+ cells around unligated teeth. In addition, the ratio of RANKL/OPG+ cells in the presence or absence of biofilm was greater in all test groups. More interestingly, there was a synergic impact of both factors on the ratio of RANKL/OPG+ cells in the bone around unligated teeth. Several mechanisms have been proposed to explain the damaging effects of caffeine on bone cells. Zhou *et al.*<sup>37</sup> demonstrated that caffeine acts harmfully in a dose-depend manner on the commitment of bone marrow-derived



mesenchymal stromal cells to the osteogenic lineage, downregulating important genes and proteins expressed in osteogenesis. Caffeine also promotes inhibitory effects on the proliferation, bone formation ability and viability of osteoblasts by increasing intracellular cAMP concentration and glucocorticoid receptor activity, decreasing vitamin D receptor expression and activating mitochondria-dependent cell death signaling.<sup>31,33,37-40</sup> Recently, Liu *et al.*<sup>30</sup> demonstrated that caffeine, even at a low concentration, significantly enhanced osteoclastogenesis and bone resorption activity. In addition, caffeine effectively increased RANKL and reduced OPG expression in MC3T3-E1 cells, corroborating our immunohistochemical findings. Although the exact actions of estrogen on bone metabolism remain unclear, various studies have also tried to explain the impact of estrogen deficiency on bone cells. Estrogen demonstrated pro-apoptotic effects on osteoclasts, while its deficiency increased osteoblast and osteocyte apoptosis.<sup>41</sup> On a molecular level, estrogen increased OPG levels in human osteoblasts transfected with estrogen receptors<sup>42</sup> and can adversely influence osteoclastic activity by the down regulation of the production of RANKL and OPG.<sup>20</sup> Consequently, estrogen deficiency may enhance the ratio of RANKL/OPG and promote osteoclastogenesis.<sup>43</sup> Overall, the data from TRAP and RANKL/OPG stainings, observed in our OVX animals, supported the above mentioned mechanisms of action of estrogen on bone. It is worthy of note that recent evidence suggests that caffeine and estrogen can inversely regulate the expression of key genes of bone metabolism (*i.e.* Cbfa1/Runx2, peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$ , RANKL and OPG) via the cAMP dependent PKA pathway, indicating that caffeine's negative effects on bone may be antagonized by estrogen.<sup>20</sup>

In this study, caffeine consumption and estrogen deficiency decreased the early alveolar healing after tooth extraction, when compared to control animals. In addition, OVX and caffeine/OVX groups presented the worst levels of wound healing, suggesting a predominantly deleterious effect of estrogen deficiency on bone repair. Nevertheless, it is important to emphasize that this study evaluated a single early stage of BH (8 days after extraction) and that further evaluations are essential to determine whether, and to what extent, this initial negative influence of estrogen deficiency and caffeine will be sustained over the long-term healing. In agreement with our results, delayed alveolar BH after tooth extraction was also observed in OVX rats in previous studies.<sup>12,44-46</sup> Interestingly, ovariectomy induced more marked damaging effects on wound healing after tooth extraction in the early stage of estrogen depletion.<sup>45</sup> Zecchin *et al.*<sup>12</sup> demonstrated that a decrease in the gelatinolytic activities and expression of metalloproteinase -2 and -9 and types I and III collagens may contribute to the delayed alveolar wound healing in an estrogen-deficient state by interfering

with the extracellular matrix turnover. Furthermore, cellular and molecular alterations during an estrogen-deficiency state, especially those related to reduced numbers and activity of osteoblasts, may also explain the worsening of BH in the presence of reduced levels of estrogen.<sup>47</sup> Our research group has demonstrated that high doses of caffeine decreased the early BH in critical-sized defects created in the rat tibiae.<sup>19</sup> Later, Lacerda et al.<sup>48</sup> showed a decrease in the amount of bone in the alveolus of animals treated with coffee within 42 days after tooth extraction, corroborating the findings of the present study. By increasing the levels of intracellular cAMP, caffeine could alter the proportion of osteoblast differentiation and proliferation and, finally, affect bone formation.<sup>20,37</sup> BMP-2, BMP-7, BSP and OPN are all critical in the formation, remodeling and maintenance of bone. BMPs induce the commitment of mesenchymal cells toward osteoblastic lineage and enhance the differentiated function of osteoblasts.<sup>49</sup> BSP is an important protein nucleator of hydroxyapatite crystal formation, while OPN is a highly phosphorylated sialoprotein of the mineralized extracellular bone matrix.<sup>50</sup> In this study, the levels of mRNA for BMP-2, BMP-7, BSP and OPN present in the granulation tissue of the alveolar sockets did not differ among the groups. Possible explanations for these findings may be the small sample size and/or the need for the observation of later remodeling phases. Therefore, further studies are necessary to better understand the effects of caffeine and/or estrogen deficiency on these bone markers during alveolar socket repair.

In conclusion, caffeine increased BL in the presence of ligature while caffeine and/or estrogen deficiency negatively affected TBA in the absence of ligature and reduced the BH after tooth extraction. These experimental results are relevant evidence that implicate postmenopausal osteopenia and caffeine consumption as possible risk indicators for alveolar BL and reduced TBA and BH.

### **Acknowledgements**

The authors thank São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil; # 2009/09446-6) and Guarulhos University Undergraduate Research Program for financial support. There is no conflict of interest to declare.

### **References**

1. Atik OS, Uslu MM, Eksioğlu F, Satana T. Etiology of senile osteoporosis: a hypothesis. *Clin Orthop Relat Res* 2006;443:25-27.

2. Gennari C, Agnusdei D. Calcitonin, estrogens and the bone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:451-455.
3. Prince RL, Dick IM, Beilby J, Dhaliwal SS, Devine A. A cohort study of the effect of endogenous estrogen on spine fracture risk and bone structure in elderly women and an assessment of its diagnostic usefulness. *Bone* 2007;41:33-38.
4. 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.
5. Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 2002;21:536-544.
6. 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 histo- morphometry in the rat. *Calcif Tissue Int* 1988;43:277- 280.
7. Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1263-1270.
8. Taylor EN, Curhan GC. Demographic, dietary, and urinary factors and 24-h urinary calcium excretion. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1980-1987.
9. Wetmore CM, Ichikawa L, LaCroix AZ, Ott SM, Scholes D. Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. *Osteoporos Int* 2008;19:519-527.
10. Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:349-356.
11. Sultan N, Rao J. Association between periodontal disease and bone mineral density in postmenopausal women: a cross sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:440-447.
12. Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcif Tissue Int* 2005;76:136-145.
13. Rawlinson SC, Boyde A, Davis GR, Howell PG, Hughes FJ, Kingsmill VJ. Ovariectomy vs. hypofunction: their effects on rat mandibular bone. *J Dent Res* 2009;88:615-620.
14. Shoji K, Elsubeihi ES, Heersche JN. Effects of ovariectomy on turnover of alveolar bone in the healed extraction socket in rat edentulous mandible. *Arch Oral Biol* 2011;56:114-120.

15. Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2004;39:107-110.
16. Amadei SU, de Souza DM, Brandão AA, da Rocha RF. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Braz Oral Res* 2011;25:538-543.
17. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;9:24-28.
18. Bezerra JP, da Silva LR, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2008;79:2356-2360.
19. Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density A histometric study in rats. *Arch Oral Biol* 2009;54:717-722.
20. Zhou Y, Zhu ZL, Guan XX, Hou WW, Yu HY. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med Hypotheses* 2009;73:83-85.
21. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1987;40:155-159.
22. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:447-452.
23. Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987;35:203-206.
24. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56-64.
25. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 2003;20:1-30.
26. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, et al. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol* 2007;78:1561-1567

27. Anbinder AL, Prado Mde A, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J* 2006;17:201-207.
28. Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, Windsor LJ. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodontal Res* 2010;45:136-142.
29. Duarte PM, de Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 2004;75:1196-1202.
30. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res* 2011;29:954-960.
31. 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.
32. Bezerra JP, Bastos MF, da Silva LRF, Duarte PM. Effect of intake of high doses of caffeine on alveolar bone density in rats: a histometric study. *Rev Saude* 2009;3:05-09.
33. Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2008;9:698-718.
34. Tanaka M, Ejiri S, Toyoka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rats alveolar bone. *J Periodont Res* 2002;37:161-165.
35. Duarte PM, Gonçalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res* 2006;41:541-546.
36. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int* 1999;10:34-40.
37. Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Br J Pharmacol* 2010;161:1542-1552.
38. Föcking M, Schmiegelt D, Trapp T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:435-439.

39. Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res* 2006;7:1-7.
40. 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.
41. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:173-179.
42. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-4370.
43. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292:490-495.
44. Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec* 2000;259:76-85.
45. Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec* 2001;262:203-212.
46. Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:2248-2253.
47. Tarantino U, Cerocchi I, Scialdoni A, et al. Bone healing and osteoporosis. *Aging Clin Exp Res* 2011;23:62-64.
48. Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J* 2010;21:199-204.
49. Gaggero E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:51-65.
50. Fujisawa R, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front Biosci* 2012;17:1891-1903.

**Table 1** - Mean ( $\pm$  SD) of BL, TBA, BH, number of number of TRAP+ cells and ratio RANKL/OPG+ cells for all experimental groups.

<b>Parameter</b>	<b>Control (n=15)</b>	<b>Caffeine (n=15)</b>	<b>OVX (n=15)</b>	<b>Caf/OVX (n=15)</b>
BL around unligated teeth (mm <sup>2</sup> )	0.09 ( $\pm$ 0.006)	0.12 ( $\pm$ 0.006)	0.11 ( $\pm$ 0.01)	0.14 ( $\pm$ 0.02)
BL around ligated teeth (mm <sup>2</sup> )	0.7 ( $\pm$ 0.14) <sup>a</sup>	1.3 ( $\pm$ 0.15) <sup>b</sup>	1.0 ( $\pm$ 0.11) <sup>ab</sup>	0.9 ( $\pm$ 0.05) <sup>ab</sup>
TBA (%)	83.7 ( $\pm$ 0.7) <sup>a</sup>	75.6 ( $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>	74.2 ( $\pm$ 2.3) <sup>b</sup>	77.6 ( $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>
BH (%)	32.6 ( $\pm$ 3.8) <sup>a</sup>	18.4 ( $\pm$ 2.8) <sup>b</sup>	5.9 ( $\pm$ 1.8) <sup>c</sup>	4.5 ( $\pm$ 1.8) <sup>c</sup>
TRAP+ cells/mm <sup>2</sup> around unligated teeth (number)	2.9 ( $\pm$ 0.3) <sup>a</sup>	4.1 ( $\pm$ 0.4) <sup>ab</sup>	7.3 ( $\pm$ 1.1) <sup>b</sup>	8.6 ( $\pm$ 1.8) <sup>b</sup>
TRAP+ cells/mm <sup>2</sup> around ligated teeth (number)	3.5 ( $\pm$ 0.6) <sup>a</sup>	6.0 ( $\pm$ 0.5) <sup>ab</sup>	8.4 ( $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	8.1 ( $\pm$ 0.3) <sup>ab</sup>
RANKL/OPG+ cells/ mm <sup>2</sup> around unligated teeth (ratio)	0.4 ( $\pm$ 0.04) <sup>a</sup>	1.6 ( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>	1.4 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	4.4 ( $\pm$ 0.2) <sup>c</sup>
Ratio RANKL/OPG+ cells around ligated teeth (ratio)	0.5 ( $\pm$ 0.07) <sup>a</sup>	3.3 ( $\pm$ 0.7) <sup>b</sup>	2.3 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	1.2 ( $\pm$ 0.03) <sup>b</sup>

**Table 2** - Mean ( $\pm$  SD) of the relative levels of mRNA for all genes (mRNA gene/mRNA GAPDH).

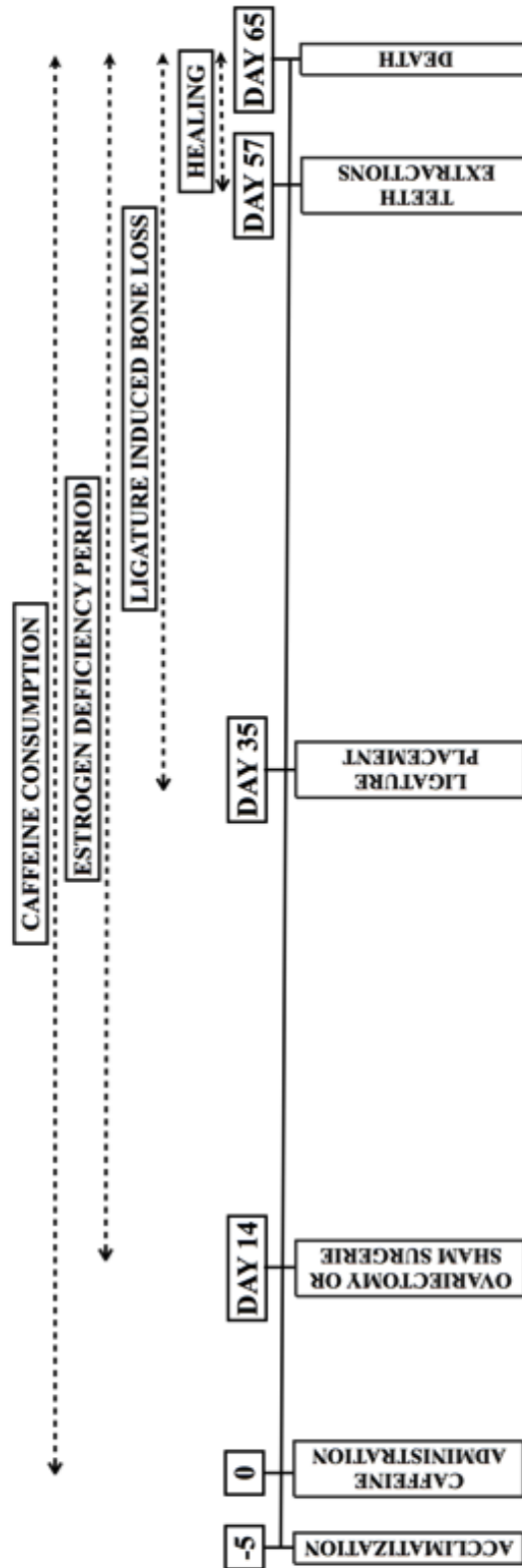
<b>Gene/GAPDH</b>	<b>Control (n=10)</b>	<b>Caffeine (n=10)</b>	<b>OVX (n=10)</b>	<b>Caffeine/OVX (n=10)</b>
<b>BMP-2</b>	0.01 ( $\pm$ 0.01)	0.02 ( $\pm$ 0.02)	0.01 ( $\pm$ 0.02)	0.04 ( $\pm$ 0.07)
<b>BMP-7</b>	0.2 ( $\pm$ 0.2)	0.2 ( $\pm$ 0.2)	0.2 ( $\pm$ 0.3)	0.4 ( $\pm$ 0.6)
<b>BSP</b>	0.3 ( $\pm$ 0.3)	0.1 ( $\pm$ 0.1)	0.1 ( $\pm$ 0.1)	0.2 ( $\pm$ 0.2)
<b>OPN</b>	2.9 ( $\pm$ 4.6)	3.8 ( $\pm$ 6.5)	2.2 ( $\pm$ 5.0)	2.3 ( $\pm$ 2.9)

There were no differences among groups by ANOVA ( $p > 0.05$ ). Bone morphogenetic protein (BMP), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

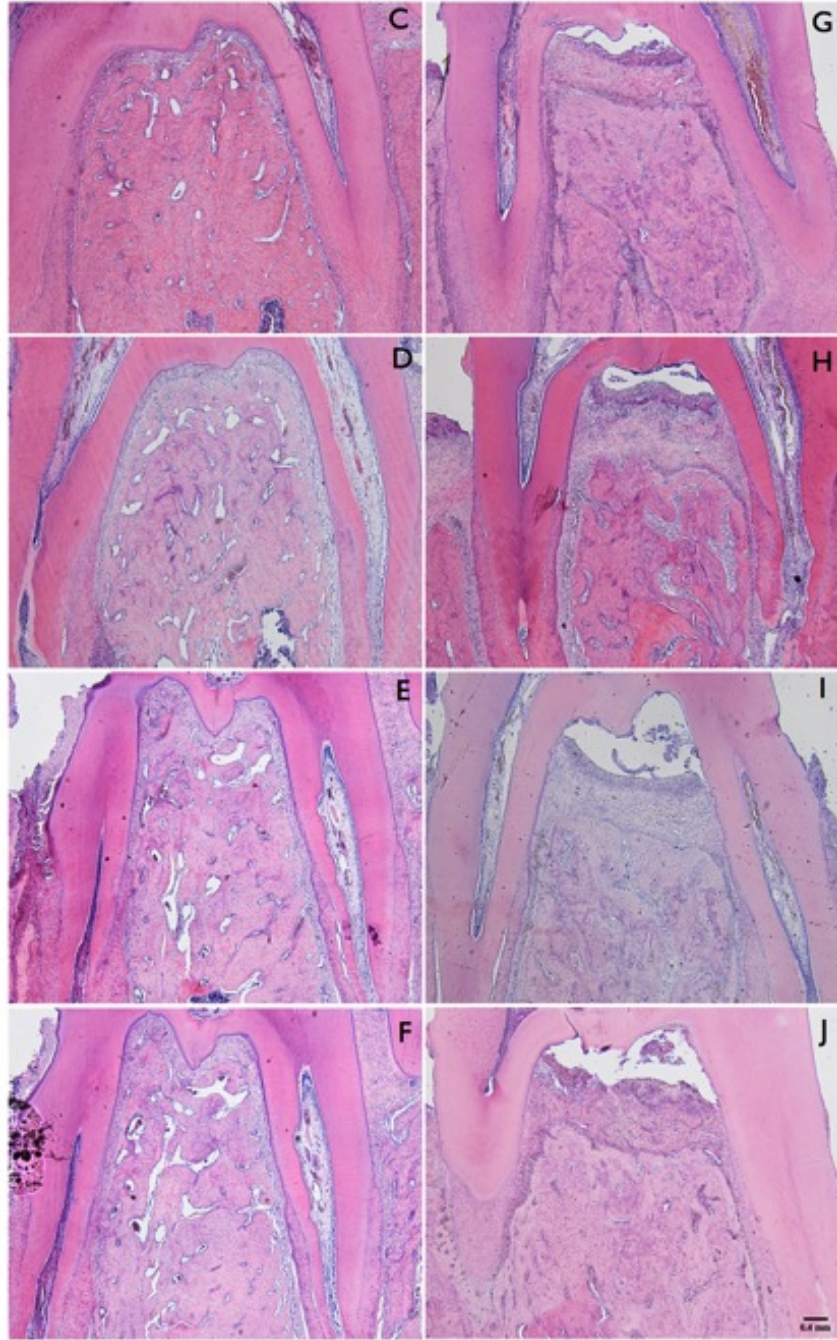
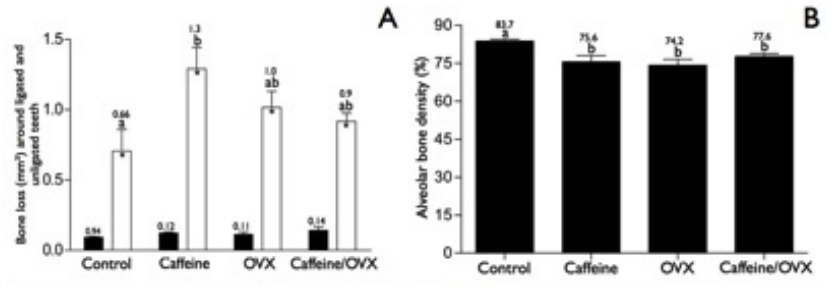


## Legends

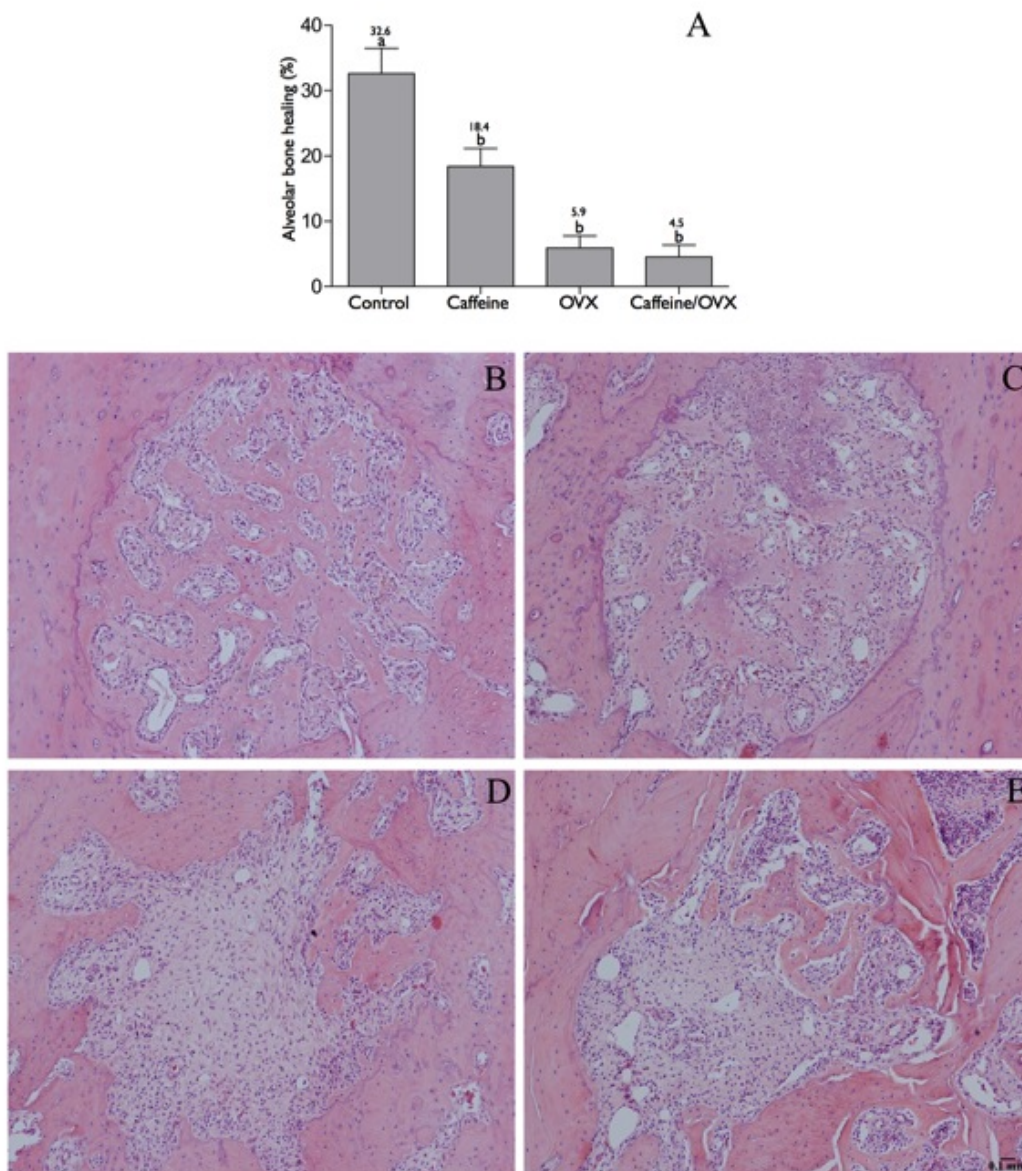
**Figure 1.** Experimental design.



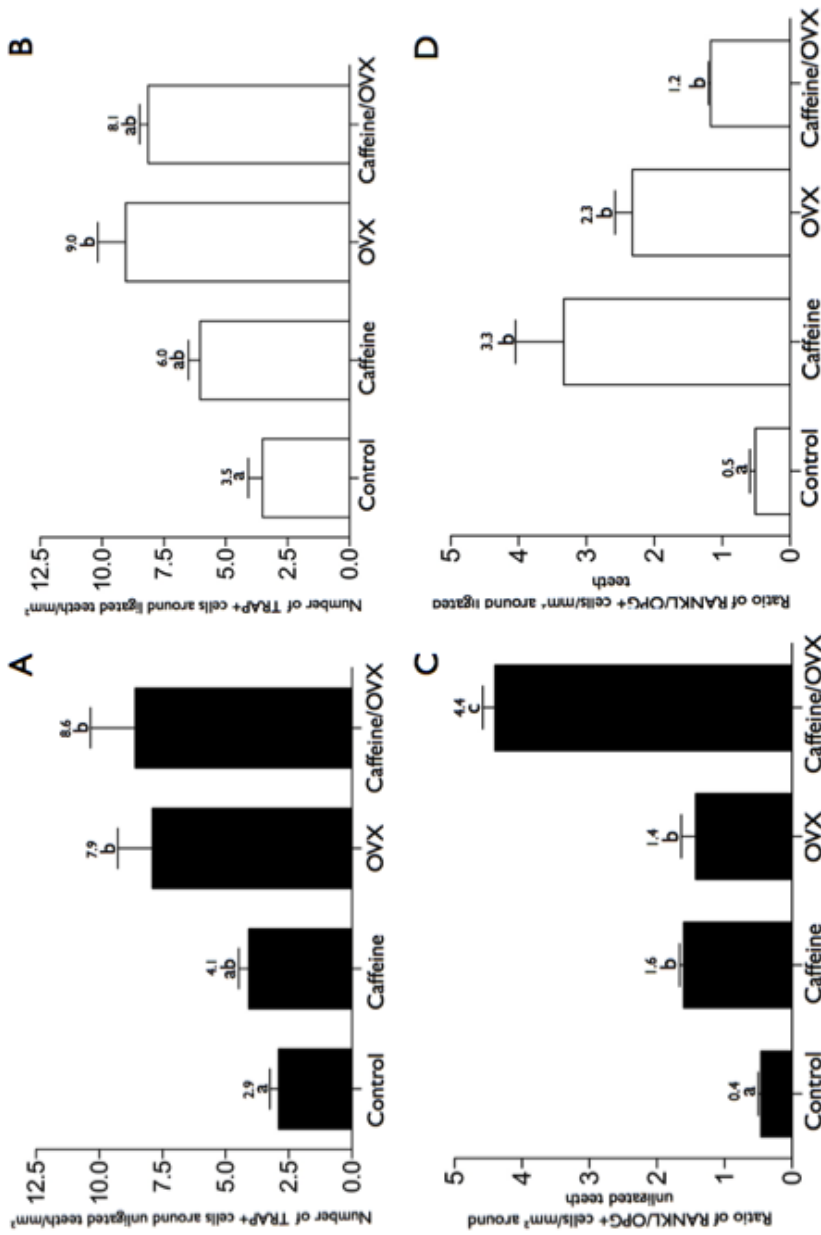
**Figure 2.** Photomicrographs illustrating the area between the interradicular bone crest and furcation roof of unligated (A-control; B- caffeine, C-OVX and D-caffeine/OVX) and ligated (E-control; F- caffeine, G-OVX and H-caffeine/OVX) teeth (40x magnification) as well as the trabecular bone area of the unligated teeth. Observe the enlargement of trabecular spaces and marrow cavities on the furcation bone of caffeine (Photomicrograph B), OVX (Photomicrograph C) and caffeine/OVX (Photomicrograph D). Note the lower bone loss in the ligated teeth of control group (Photomicrograph E) when compared to the other groups.



**Figure 3.** Photomicrographs illustrating the BH, i.e. newly-formed bone in the alveolar sockets, in the disto-buccal root of the maxillary first molar (A-control; B- caffeine, C-OVX and D-caffeine/OVX). Note the greatest number of empty lacunae in the alveolar sockets of OVX (C) and caffeine/OVX (D) groups (100x magnification).



**Figure 4.** Photomicrographs illustrating immunohistochemical staining for RANKL (A-control; B- caffeine, C-OVX and D-caffeine/OVX) and OPG (E-control; F-caffeine, G-OVX and H-caffeine/OVX) and, TRAP staining (I-control; J-caffeine, K-OVX and L-caffeine/OVX) around unligated teeth (x 400 magnification).



#### **4. CONCLUSÕES**

A cafeína aumentou a perda óssea na presença de ligadura, enquanto a cafeína e/ou deficiência de estrógeno afetaram negativamente a área óssea trabecular na ausência de ligadura e reduziram o reparo ósseo após extração dentária. Esses resultados experimentais são relevantes evidências que sugerem a osteopenia/osteoporose pós-menopausa e o consumo de cafeína como possíveis indicadores de risco para perda óssea e reduzida área óssea trabecular na mandíbula e para o reparo ósseo alveolar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Habashneh R, Alchalabi H, Khader YS, Hazza'a AM, Odat Z, Johnson GK. Association between periodontal disease and osteoporosis in postmenopausal women in Jordan. *J Periodontol* 2010;81(11):1613-1621.

Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, Windsor LJ. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodontal Res* 2010;45:136-142.

Amadei SU, Souza DM, Brandão AA, Rocha RF. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Braz Oral Res* 2011;25(6):538-543.

Anbinder AL, Prado Mde A, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J* 2006;17:201-207.

Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4:1-6.

Atik OS, Uslu MM, Eksioğlu F, Satana T. Etiology of senile osteoporosis: a hypothesis. *Clin Orthop Relat Res* 2006;443:25-27.

Bezerra JP, da Silva LR, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2008;79:2356-2360.

Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, Benhamou CL. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2007;22(4):578-588.

Cawston H, Maravic M, Fardellone P, Gauthier A, Kanis JA, Compston J, Borgström F, Cooper C, McCloskey E. Epidemiological burden of postmenopausal osteoporosis in France

from 2010 to 2020: estimations from a disease model. *Arch Osteoporos* 2012 Sep 28 (Antes da impressão).

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.

Choi YJ, Oh HJ, Kim DJ, Lee Y, Chung YS. The prevalence of osteoporosis in Korean adults aged 50 years or older and the higher diagnosis rates in women who were beneficiaries of a national screening program: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2009. *J Bone Miner Res* 2012;27(9):1879-1886.

Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med* 2000;31(5):562-568.

Cooper C, Atkinson EJ, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL, Judd HL, Melton LJ 3rd. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;7(4):465-471.

Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:349-356.

Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2004;39:107-110.

Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density A histometric study in rats. *Arch Oral Biol* 2009;54:717-722.

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

Franz-Odendaall TA, Hall BK, Witten PE. Buried Alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; 235(1):176-190.



Garcia R, Henshaw M, Krall E. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000* 2001; 25:21-36.

Gauthier A, Kanis JA, Jiang Y, Martin M, Compston JE, Borgström F, Cooper C, McCloskey EV. Epidemiological burden of postmenopausal osteoporosis in the UK from 2010 to 2021: estimations from a disease model. *Arch Osteoporos* 2011;6(2):179-188.

Glajchen N., Ismail F., Epstein S., Jowell P.S., 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.

Gomes-Filho IS, Oliveira TJ, Passos JS, Cerqueira ED, da Cruz SS, Barreto ML, Coelho JM, Trindade SC, Santos CA, Sarmiento VA. Effect of osteoporosis on periodontal therapy among post-menopausal women. *Gerodontology* 2012 Mar 16 (Antes da impressão)

Gomes-Filho IS, Passos Jde S, Cruz SS, Vianna MI, Cerqueira Ede M, Oliveira DC, dos Santos CA, Coelho JM, Sampaio FP, Freitas CO, de Oliveira NF. The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol* 2007;78(9):1731-1740.

Grainge MJ, Coupland CA, Cliffe SJ, Chilvers CE, Hosking DJ. Cigarette smoking, alcohol and caffeine consumption, and bone mineral density in postmenopausal women. The Nottingham EPIC Study Group. *Osteoporos Int* 1998;8(4):355-363.

Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994;60(4):573-578.

Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1263-1270.

Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal* 2009;54(1):11-26.

Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol* 1995;40(6):529-531.

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.

Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 2002; 21:536-544.

Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *J Periodontal Res* 2011;46(1):97-104.

Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, Dai X, Newton BI, Tracy RR, West WF, DeMoss TL, Myers PJ, Streckfus CF. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *J Periodontol* 1997;68(9):864-871.

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.

Kinane D. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2000; 25:8-20.

Kobayashi M, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M, Miyaura C. The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models. *Exp Anim* 2012;61(2):183-187.

Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;9:24-28.

Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J* 2010;21:199-204.

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

Liu S, Cheng Y, Xu W, Bian Z. Protective effects of follicle-stimulating hormone inhibitor on alveolar bone loss resulting from experimental periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endod*. 2010;36(4):658-663.

Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res* 2011;29:954-960.

Lloyd T, Rollings N, Egli DF, Kieselhorst K, Chinchilli VM. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997;65(6):1826-1830.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1993;16(4):203-210.

Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2008;9:698-718.

Martínez-Maestre MÁ, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric* 2010;13(6):523-529.

Martínez-Maestre MA, Machuca G, González-Cejudo C, Flores JR, Cardoso RT, Castelo-Branco C. Osteoporosis, fragility fracture, and periodontal disease: a cross-sectional study in Spanish postmenopausal women. *Menopause* 2012 Aug 20 (Antes da impressão).

McDonnel P, McHugh PE, O'Mahoney D. Vertebral osteoporosis and trabecular bone quality. *Ann Biomed Eng* 2007;35(2):170-189.

McManus JF, Davey RA, Maclean HE, Doust EA, Chiu WS, Sims NA, Bouxsein ML, Glatt V, Zajac JD, Danks JA. Intermittent Fugu parathyroid hormone 1 (1-34) is an anabolic bone agent in young male rats and osteopenic ovariectomized rats. *Bone*. 2008;42(6):1164-1174.

Moedano DE, Irigoyen ME, Borges-Yáñez A, Flores-Sánchez I, Rotter RC. Osteoporosis, the risk of vertebral fracture, and periodontal disease in an elderly group in Mexico City. *Gerodontology* 2011;28(1):19-27.

Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 2003;20(1):1-30.

Ohta M, Cheuk G, Thomas KA, Kamagata-Kiyoura Y, Wink CS, Yazdani M, Falster AU, Simmons WB, Nakamoto T. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 1999;43(1):52-59.

Ohta M, Ide K, Cheuk G, Cheuk SL, Yazdani M, Nakamoto T, Thomas KA. A caffeine diet can alter the mechanical properties of the bones of young ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 2002;46(4):108-113.

Packard PT, Recker RR. Caffeine does not affect the rate of gain in spine bone in young women. *Osteoporos Int* 1996;6(2):149-152.

Park H, Kim KJ, Komatsu T, Park SK, Mutoh Y. Effect of combined exercise training on bone, body balance, and gait ability: a randomized controlled study in community-dwelling elderly women. *J Bone Miner Metab* 2008;26(3):254-259.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial in the human periodontal pockets and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006;42:80-87.

Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int* 1999;10:34-40.

Pepelassi E, Nicopoulou-Karayianni K, Archontopoulou AD, Mitsea A, Kavadella A, Tsiklakis K, Vrotsos I, Devlin H, Horner K. The relationship between osteoporosis and periodontitis in women aged 45-70 years. *Oral Dis* 2012;18(4):353-359.

Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(11):2248-2253.

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.

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.

Rapuri PB, Kinyamu HK, Gallagher JC, Haynatzka V. Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2024-2032.

Renvert S, Berglund J, Persson RE, Persson GR. Osteoporosis and periodontitis in older subjects participating in the Swedish National Survey on Aging and Care (SNAC-Blekinge). *Acta Odontol Scand* 2011;69(4):201-277.

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.

Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec* 2000;259:76-85.

Shoji K, Elsubeihi ES, Heersche JN. Effects of ovariectomy on turnover of alveolar bone in the healed extraction socket in rat edentulous mandible. *Arch Oral Biol* 2011;56:114-120.

Shum I, Leung PC, Kwok A, Corbet EF, Orwoll ES, Phipps KR, Jin L. Periodontal conditions in elderly men with and without osteoporosis or osteopenia. *J Periodontol* 2010;81(10):1396-1402.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2):134-144.

Sultan N, Rao J. Association between periodontal disease and bone mineral density in postmenopausal women: a cross sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(3):440-447.

Tanaka M, Ejiri S, Toyoka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rats alveolar bone. *J Periodont Res* 2002;37:161-165.

Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec* 2001;262(2):203-212.

Tarantino U, Cerocchi I, Scialdoni A, Saturnino L, Feola M, Celi M, Liuni FM, Iolascon G, Gasbarra E. Bone healing and osteoporosis. *Aging Clin Exp Res*. 2011;23(2):62-64.

Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *J Bone Miner Res* 1991;6(10):1029-1036.

Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res* 2006;7:1-7.

Waugh EJ, Lam MA, Hawker GA, McGowan J, Papaioannou A, Cheung AM, Hodsmann AB, Leslie WD, Siminoski K, Jamal SA; Perimenopause BMD Guidelines Subcommittee of Osteoporosis Canada. Risk factors for low bone mass in healthy 40-60 year old women: a systematic review of the literature. *Osteoporos Int* 2009;20(1):1-21.

Wetmore CM, Ichikawa L, LaCroix AZ, Ott SM, Scholes D. Association between caffeine intake and bone mass among young women: potential effect modification by depot medroxyprogesterone acetate use. *Osteoporos Int* 2008;19:519-527.

Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56-64.

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1988;43(3):179-83.

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985;37(3):324-328.

Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:173-179.

Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcif Tissue Int* 2005;76:136-145.

**ANEXOS**



**16. PARECER SOBRE RECURSO DO COMITÊ DE BIOÉTICA**

**"IMPACTO DA INGESTÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA ASSOCIADA OU NÃO  
A OSTEOPOROSE NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA POR  
LIGADURA, E NA DENSIDADE E REPARO ÓSSEO EM RATOS"**

Aprovado     Não aprovado     Aprovado com restrições

Descrever restrições:

Os itens apontados no último indeferimento foram, ou defendidos por  
argumentação ou corrigidos pela pesquisadora.

A análise das adequações incorreu em aprovação do projeto.

Visto do comitê: \_\_\_\_\_ Data: 11/12/2009

  
Luis Artur Giuffrida

  
Fabio Futema

  
Marta Ferreira Bastos

  
Sílvia Lobato

  
Valmir Akira M. Moura

  
Silmara G. F. da Fonseca

  
Maria Christina Pelliciani

Nicole Bernart Casara