



**UNICAMP**

**AMARO ILÍDIO VESPASIANO SILVA**

**AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA E RESISTÊNCIA ÓSSEA  
EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA DIÁRIA DE CAFÉ E  
REFRIGERANTES À BASE DE COLA E GUARANÁ**

Piracicaba

2014





**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

**AMARO ILÍDIO VESPASIANO SILVA**

**AVALIAÇÃO DA MICROARQUITETURA E RESISTÊNCIA ÓSSEA  
EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA DIÁRIA DE CAFÉ E  
REFRIGERANTES À BASE DE COLA E GUARANÁ**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Radiologia Odontológica, na Área de Concentração Radiologia Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Amaro Ilídio Vespasiano Silva e orientada pelo Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho.

---

Assinatura do Orientador

Piracicaba

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38a Silva, Amaro Ilídio Vespasiano, 1985-  
Avaliação da microarquitetura e resistência óssea em ratos submetidos à dieta diária de café e refrigerantes à base de cola e guaraná / Amaro Ilídio Vespasiano Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lourenço Correr Sobrinho.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Osso. 2. Densidade óssea. 3. Microtomografia por Raio-X. I. Correr Sobrinho, Lourenço, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of microarchitecture and bone resistance in mice with daily diet of coffee and soft drinks based in coke and guarana

**Palavras-chave em inglês:**

Bone

Bone density

X-ray microtomography

**Área de concentração:** Radiologia Odontológica

**Titulação:** Doutor em Radiologia Odontológica

**Banca examinadora:**

Lourenço Correr Sobrinho [Orientador]

Cláudio Costa

Gilberto Aparecido Coclete

Francisco Haiter Neto

Solange Maria de Almeida Bóscolo

**Data de defesa:** 16-04-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



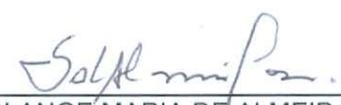
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 16 de Abril de 2014, considerou o candidato AMARO ILÍDIO VESPASIANO SILVA aprovado.

  
Prof. Dr. LOURENÇO CORRÊA SOBRINHO

  
Prof. Dr. CLÁUDIO COSTA

  
Prof. Dr. GILBERTO APARECIDO COCLETE

  
Prof. Dr. FRANCISCO HAITER NETO

  
Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA BOSCOLO



## RESUMO

O objetivo neste estudo foi investigar e comparar os efeitos da dieta de café e refrigerantes à base de cola e guaraná sobre a microarquitetura e resistência óssea em ratos. Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus* Wistar), sendo 40 machos e 40 fêmeas, distribuídos em 8 grupos experimentais que receberam água (grupos controles), refrigerantes à base de cola, guaraná e café *ad libitum*. Ao término dos 48 dias de administração das substâncias, todos os animais foram sacrificados e o fêmur direito coletado para análise por microtomografia computadorizada e ensaio de resistência à flexão de três pontos. Após tabulação dos dados e análise estatística (ANOVA), foi observado alteração na microarquitetura óssea nos seguintes parâmetros analisados pela microtomografia computadorizada: volume de tecido (TV), volume ósseo (BV), superfície de tecido (TS), superfície óssea (BS), número de trabéculas ósseas (Tb.N), espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), volume de poros fechados (Po.V(cl)) e Volume de poros abertos (Po.V(op)) além de alterações na resistência óssea nas fêmeas. Concluiu-se que A ingestão das substâncias avaliadas causou alteração na microarquitetura óssea, levando a um aumento dos parâmetros de volume, tanto ósseo quanto de tecido. Porém, o consumo de refrigerante à base de guaraná e de café reduziram a microarquitetura trabecular; além disso, a ingestão de café e de refrigerante à base de cola aumentou o risco à fratura óssea nas fêmeas.

Palavras-chave: Osso. Densidade óssea. Microtomografia por Raio-X.



## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate and compare the effects of daily diet of coffee and soft drinks based in coke and guarana over the microarchitecture and bone strength in rats. 80 rats ( *Rattus norvegicus*, Albinus Wistar ) were used, 40 males and 40 females, divided into 8 experimental groups that received water (control groups), coke and guarana and coffe ad libitum. At the end of the 30 days of administration of substances, all animals were sacrificed and the right femur collected for analysis by computerized microtomography and testing flexion module of three points. After tabulating the data and statistical analysis (ANOVA), was observed changes in the bone microarchitecture in the following parameters assessed by computed microtomography: tissue volume (TV), bone volume (BV), tissue surface (TS), bone surface (BS), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), volume of closed pores (Po.V(cl)) and volume of open pores (Po.V(op)), also changes in bone strength in females . It was concluded that ingestion of substances evaluated caused change in bone microarchitecture, leading to an increase in volume parameters, both bone as tissue. However, the consumption of coolant based on guarana and coffee reduced trabecular microarchitecture; Furthermore, ingestion of coffee and cola soft drink to increased risk of bone fracture in females.

Keywords: Bone Tissue. Bone Density. X-ray microtomography



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
LISTA DE SÍMBOLOS	xxvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	59



## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, **Nely Vespasiano da Silva**, fonte de vida e exemplo de luta.



## AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por estar comigo em todos os momentos da minha vida, me permitindo crescer, viver, sonhar e realizar.

Ao meu pai, **Mauro Teixeira da Silva**, que mesmo lá de cima sei do seu orgulho por mais uma etapa concluída, a saudade é eterna.

À minha mãe, **Nely Vespasiano da Silva**, obrigado por TUDO, por ser minha fonte de energia, a luz que me guia o amor que me faz viver, a sabedoria que me engrandece, a paciência que me norteia; fonte de vida, inspiração e luta. Obrigado por ser minha mãe. Sempre foi e sempre será pra você e por você.

Ao meu irmão **Daniel Henrique Vespasiano Silva**, pelo apoio, carinho e compreensão, nenhuma distância física separa o amor que tenho por você.

Ao meu sobrinho e afilhado **Bernardo Antônio Dias Vespasiano**, por ser minha alegria, minha fonte de vida.

A todos meus tios (as) e primos (as), em especial a tia **Marli Vespasiano Formiga** e ao tio **João Vespasiano dos Santos**, por todo carinho, dedicação, amizade e apoio durante toda minha vida.

Aos filhotes **Tony** e **Lara**, quem dera todos os homens tivessem o amor puro e incondicional dos animais.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, agradeço por toda dedicação e confiança depositada em mim, obrigado por me permitir crescer e somar em meus ideais mais força e sabedoria, por ser um exemplo de ser humano e profissional a seguir. Muito obrigado por ser mais que um professor, orientador e chefe, muito obrigado por ser um exemplo de vida.

## AGRADEÇO TAMBÉM

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, por ter oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados em suas áreas.

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho**, agradeço pela disponibilidade em me aceitar como orientador e por todas as sugestões que engrandeceram o trabalho.

À **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida Bóscolo** por ao longo desta jornada me permitir mostrar quem eu sou, sem a carga de um passado, e me aceitar como membro da Radiologia. Obrigado ainda por todas as oportunidades que a mim foram concedidas. Serei eternamente grato.

Ao **Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo** agradeço por todo convívio, pela oportunidade de aprender muito mais que Radiologia, aprender lições de vida. Obrigado por toda atenção e por nos deixar acreditar que tudo é possível.

À **Profa. Dra. Déborah Queiroz de Freitas** agradeço pelo convívio e por ser exemplo de profissional.

## **AGRADEÇO, AINDA:**

Aos meus grandes amigos **Bruno Augusto Benevenuto de Andrade** e **Wanessa Lopes de Oliveira**, obrigado por vocês serem parte do que eu sou; a família que meu coração escolheu, obrigado por me acompanharem e sempre torcerem por mim. A onde quer que eu vá, levo vocês.

Aos irmãos que Piracicaba me permitiu escolher para a vida, **Yuri Nejaim** e **Gina Délia Roque Torres**, agradeço por estarem do meu lado em todos os momentos, bons e ruins, por me levantarem quando precisei, por caminharem comigo quando não tive forças, por me fazerem acreditar que ainda vale a pena acreditar no ser humano.

Aos amigos que Piracicaba me deu, **Amanda Araújo, Anne Oening, Carolina Cintra, Danieli Brasil, Débora Távora, Débora Duarte, Francielle Verner, Frederico Sampaio, Gabriella de Rezende, Gustavo Santaella, Karla Vasconcelos, Karla Rovaris, Laura Sotelo, Leonardo Peroni, Liana Ferreira, Luciana Jácome, Manuella Belém, Matheus Oliveira, Maria Augusta Portela, Maria Beatriz Alonso, Mayra Yamasaki, Monikelly do Carmo, Phillipe Nogueira, Priscila Peyneau, Saulo Leonardo, Taruska Ventorini e Thiago Gamba**, sem vocês não teria sido a mesma coisa, obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos colegas da radiologia, **Amanda Farias, Ana Caroline Brito, Eliana Dantas, Helena Aguiar, Henrique Martins, Ilana Sanamaika, Isabela Crusoé, Polyane Queiroz, Raquel de Castro, Rafaela Argento, Saione Sá, Thiago Sousa e Thiago Nascimento**, obrigado pelo convívio.

Aos amigos e funcionários da Radiologia, **Fernando, Waldeck, Luciane, Giselda**, saibam que têm meu respeito e admiração, a dedicação ao que fazem torna tudo possível.

À **Cidinha, Eliene e Adriano**, obrigado pelo convívio e por tornar os dias de histologia e microtomografia mais agradáveis.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e conclusão da nova etapa, meu muito obrigado.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT <sup>®</sup> (Kontich, Bélgica)	26
Figura 2 – A – Câmara de escaneamento / B – Fonte de radiação e filtro de alumínio indicado pela seta vermelha / C – Receptor de imagem indicado pela seta amarela	27
Figura 3 – Ajuste dos parâmetros de reconstrução: ring artifacts reduction, smoothing e beam hard correction – interface do NRecon <sup>®</sup> (Kontich, Bélgica).	29
Figura 4 – Ajuste dos parâmetros de reconstrução: top e botton – interface do NRecon <sup>®</sup> (Kontich, Bélgica)	29
Figura 5 – Seleção do ROI inicial – interface do CTAn <sup>®</sup> (Kontich, Bélgica)	30
Figura 6 – A – ROI inicial / B – Seleção do ROI de interesse / C – ROI de interesse reconstruído / D – Binarização do ROI de interesse	31
Figura 7 – A – Máquina de ensaio universal (Modelo 4411; Instron Corporation, Canton, MA, EUA / B- Posicionamento do fêmur.	33



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de acordo com a dieta utilizada	24
Tabela 2 – Parâmetros para obtenção das imagens	28
Tabela 3 – Parâmetros de reconstrução	29
Tabela 4 – Task list	31
Tabela 5 – Apresentação e descrição dos parâmetros selecionados para análise da microarquitetura óssea trabecular	32
Tabela 6 – Médias dos consumos diários de líquidos (ml) e desvio padrão	35
Tabela 7 – Avaliação do peso corporal (%)	36
Tabela 8 – Análise de volume de tecido – TV (mm <sup>3</sup> )	38
Tabela 9 – Análise do volume ósseo – BV (mm <sup>3</sup> )	39
Tabela 10 – Avaliação da relação do volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse - BV/TV (%)	39
Tabela 11 – Análise da superfície de tecido – TS (mm <sup>2</sup> )	40
Tabela 12 – Análise da superfície óssea – BS (mm <sup>2</sup> )	41
Tabela 13 – Análise do número de trabéculas por milímetro	42
Tabela 14 – Análise da espessura de trabéculas ósseas em milímetros	43
Tabela 15 – Análise da separação entre as trabéculas ósseas (mm)	43
Tabela 16 – Análise do volume de poros fechados (mm <sup>3</sup> )	44
Tabela 17 – Análise do volume de poros abertos (mm <sup>3</sup> )	45

Tabela 18 – Análise do total de porosidade (%)	45
Tabela 19 – Valores médios de resistência à flexão de três pontos (N)	46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BV	-	Volume ósseo
BS	-	Superfície óssea
BV/TV	-	% Volume ósseo
CFO	-	Conselho Federal de Odontologia
DEXA	-	Absorção por dupla emissão de raios X
DMO	-	Densidade mineral óssea
HR-pQCT	-	Tomografia Computadorizada periférica de alta resolução
kV	-	Quilovoltagem
mM	-	Milimol
mm/min	-	Milímetro por minuto
micro-CT	-	Microtomografia computadorizada
$\mu\text{A}$	-	Microampère
$\mu\text{A.s}$	-	Microampère segundo
$\mu\text{m}$	-	Micrômetro
$\mu\text{m}^3$	-	Micrômetro por milímetro cúbico
N	-	Newton
pH	-	Potencial hidrogeniônico
Po.V(cl)	-	Volume de poros fechados
Po.V(op)	-	Volume de poros abertos

Po(tot)	-	Porosidade total
ROI	-	Região de interesse
TV	-	Volume de tecido
TS	-	Superfície de tecido
Tb.Th	-	Espessura de trabécula
Tb.Sp	-	Separação entre trabéculas
Tb.N	-	Número de trabéculas
TCFC	-	Tomografia computadorizada de feixes cônicos
vCanBDM	-	Densidade mineral óssea volumétrica trabecular
VOI	-	Volume de interesse

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	-	Marca registrada
μ	-	Micron
%	-	Porcentagem
≤	-	Menor ou igual
≥	-	Maior ou igual
±	-	Mais/menos



## 1 INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas inervadas e irrigadas que apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. Como é um tecido vivo e dinâmico, se renova permanentemente durante toda a vida em um sistema de construção e reabsorção da arquitetura óssea, denominado remodelação óssea, mediada por células osteoblásticas e osteoclásticas provenientes da medula óssea. Este processo de remodelação é fisiológico e utilizado pelos ossos como mecanismo de manutenção da massa óssea esquelética (Bord et al. 1996).

A fragilidade dos ossos causada pela deterioração da microarquitetura óssea é o que caracteriza a osteoporose, sendo esta uma condição patológica no metabolismo ósseo onde o processo de desmineralização óssea promovido pelos osteoclastos torna-se maior do que o processo de remineralização promovido pelos osteoblastos. Trata-se de uma doença que ocorre em consequência da redução da densidade mineral óssea do esqueleto, comprometendo a força e a qualidade óssea, predispondo o indivíduo ao aumento do risco de fraturas decorrentes de traumas de baixa intensidade ou menor impacto. Atualmente é relatada como um problema de saúde pública mundial, devido ao aumento da expectativa de vida, promovendo alterações no cotidiano, como nos hábitos alimentares e na prática de exercícios físicos, promovendo aumento da morbidade e mortalidade, levando ao aumento dos custos sociais aos sistemas de saúde. (Caliri et al., 2007)

Na osteoporose, a perda óssea é resultado do desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, sendo que inúmeros fatores sistêmicos e locais atuam sobre esse sistema, como os aspectos nutricionais, fatores raciais e genéticos, atividade física e influência hormonal. A osteoporose ocorre devido o processo de rarefação do osso com sua microarquitetura variando de um osso normal até o osso mais poroso. A porosidade ocorre pela intensa atividade de lise óssea, na qual os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda que

não consegue ser suficientemente preenchida pelos osteoblastos ou quando esses não conseguem preencher com nova formação óssea, uma cavidade de reabsorção normal, caracterizando a osteoporose senil que pode ser agravada devido aos fatores externos e desordens internas (Parfitt, 1987).

A compreensão da estrutura da massa óssea e as mudanças que ocorrem nos processos de aquisição e perda que ocorrem ao longo da vida são importantes para a descoberta de fatores determinantes da fragilidade óssea em grupos de indivíduos de várias faixas etárias. Sabe-se que a nutrição é um fator modificador importante no desenvolvimento e manutenção da massa óssea. Os componentes da dieta como as proteínas, vitaminas e sais minerais são necessários para a manutenção do metabolismo ósseo normal do indivíduo (Sarazim et al., 2000)

Com base na literatura observa-se que a cafeína e alguns tipos de ácidos, como o fosfórico, induzem a perda de cálcio e influenciam diretamente no desenvolvimento normal do tecido ósseo. O consumo diário de café e outras bebidas com cafeína em sua composição foram responsáveis por efeitos adversos graves no metabolismo ósseo, tanto em modelos experimentais com animais ou em intervenções populacionais. O aumento dos níveis de cálcio no plasma e na urina são decorrentes da redução da densidade mineral óssea e do volume ósseo, gerando conseqüentemente um atraso no processo da reparação óssea (Lacerda et al., 2010).

O consumo de refrigerantes à base de cola, largamente consumidos no mundo, também atua como possível responsável pela diminuição da densidade óssea mineral, devido a alterações celulares e funcionais no rim, alterando sua função, fator que interferiria na absorção de cálcio pelo organismo. Entretanto, existe na literatura uma contradição sobre os efeitos desses refrigerantes e das diferentes cafeínas encontradas em outros tipos de bebidas de largo consumo, sobre o tecido ósseo e no metabolismo do cálcio (Kristensen et al., 2005).

Considerando a participação do café no consumo diário de milhares de pessoas e do crescente aumento no consumo de substâncias industrializadas como os refrigerantes à base de cola e de guaraná, torna-se importante estudar os efeitos dessas substâncias no metabolismo ósseo, em especial o efeito do guaraná, planta de origem brasileira, sem estudos referentes ao seu efeito sobre o tecido ósseo.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Tecido ósseo**

Bord et al. (1996) descreveram o osso como sendo de aparência simples, constituído de um tecido conjuntivo especializado, vivo, complexo e em contínuo processo de remodelação, formado por 60% a 70% de cristal inorgânico e 30% a 40% de material orgânico, no qual 90% são constituídos por fibras colágenas. O mesmo possui funções como hematopoiese, reserva mineral e manutenção da integridade estrutural.

Odgren et al. (2001) relataram que a formação do tecido ósseo tem sua origem na diferenciação de células mesenquimais (provenientes da medula óssea e de vasos sanguíneos) mediante estímulos de fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas, diferenciando-se em células pré-osteoblásticas que por sua vez darão origem aos osteoblastos e osteócitos. Os osteoclastos, assim como os osteoblastos, também são originados a partir da diferenciação de células provenientes da medula óssea.

Turner (1991) e Robinson et al. (1997) descreveram os osteoblastos como sendo células derivadas dos pré-osteoblastos. Caracterizam-se por secretar proteínas colágenas e não colágenas, proteoglicanos da matriz óssea, metaloproteinases e citocinas. Os osteoblastos são células responsáveis pela formação do tecido ósseo, os quais sintetizam os componentes da matriz orgânica e controlam a sua mineralização. Os osteoblastos estão localizados na superfície óssea, promovendo deposição da matriz e podem se diferenciar em dois tipos de células: células ósseas de recobrimento e osteócitos. As células ósseas de recobrimento são células alongadas que recobrem a superfície do tecido ósseo. Já os osteócitos são células com formato estrelado que estão aprisionados dentro da matriz óssea mineralizada.

Derks et al. (1998) caracterizaram os osteócitos como estruturas que ficam aprisionados dentro da matriz óssea durante o processo de mineralização, juntamente com o fluido ósseo, fibrilas colágenas não mineralizadas e proteoglicanos. Possuem reduzida atividade sintética e secretora, porém apresentam prolongamentos citoplasmáticos que servem para a irrigação dos osteoblastos, além de mobilizar o cálcio e outros íons da matriz óssea e os transportar, através dos canalículos, para os osteoblastos. Os osteócitos são organizados como sincício e promovem ampla área de contato, entre as células e a parte não celular do tecido ósseo. Esse arranjo permite que os osteócitos participem na regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo e transmitam essas informações às outras células dentro do osso.

Robinson et al. (1997) relataram que os osteoclastos consistem em grandes células fagocíticas multinucleadas, concentradas no endóstio, cuja função é reabsorver o tecido ósseo. Os mesmos emitem projeções semelhantes a vilosidades em direção ao tecido ósseo, que secretam enzimas proteolíticas, ácido cítrico e ácido láctico que irão dissolver a matriz orgânica do osso e promover a dissolução dos sais minerais. As células osteoclásticas englobam, por fagocitose, as pequenas partículas da matriz óssea, dissolvendo-as e liberando os produtos da dissolução na corrente sanguínea, promovendo a perda estrutural e mineral do tecido ósseo.

Bord et al. (1996) relatam que a porção orgânica do osso é composta de proteínas colágenas e não colágenas acrescidas de proteoglicanos e fatores estimulantes de colônias. O colágeno tipo I responde por 90% da constituição proteica óssea, e serve como arcabouço estrutural para a fase mineralizada. As proteínas não colágenas promovem a mineralização óssea, regulando a adesão e atividade celular durante os fenômenos de formação e de reabsorção óssea. Dentre as proteínas não colágenas presentes na matriz óssea, podemos destacar a osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea e osteoprotegerina.

## **2.2 Dinâmica do tecido ósseo**

Theill et al. (2002) descreveram que a morfogênese e a remodelação óssea envolvem a síntese de matriz pelos osteoblastos e a reabsorção coordenada do osso pelos osteoclastos. Estima-se que aproximadamente 10% do total da massa óssea em seres humanos são remodeladas ao ano. Os osteoblastos e osteoclastos derivam de linhagens de células distintas e processos de maturação diferenciados. Os osteoblastos derivam de células mesenquimais indiferenciadas, enquanto os osteoclastos se derivam da diferenciação dos monócitos hematopoiéticos e dos macrófagos. As diferenças entre as atividades osteoclásticas e osteoblásticas podem ser originadas da grande variedade de mudanças hormonais ou perturbações nos processos inflamatórios e nos fatores de crescimento, promovendo alterações ósseas caracterizadas pela redução ou aumento da massa óssea.

Cadore et al. (2005) relataram que a densidade mineral óssea (DMO) é o resultado de um processo dinâmico de formação e reabsorção do tecido ósseo chamado de remodelação. A reabsorção promove a deterioração do tecido, enquanto a formação do mesmo é responsável pela reconstrução e fortalecimento do tecido deteriorado. Esse processo ocorre ao longo da vida em ciclos que variam de quatro a seis meses de duração. A manutenção da DMO é importante para a prevenção da osteoporose, caracterizada pela redução acentuada da DMO, na qual a matriz e os minerais ósseos são lixiviados devido ao excesso de reabsorção óssea em relação a sua formação. Esse processo está normalmente relacionado ao avanço da idade e a ocorrência da menopausa levando a maior incidência de fraturas ósseas. Embora a perda óssea seja mais intensa nas mulheres, os homens também apresentam redução devido à idade avançada.

Kristensen et al. (2005) relataram que a osteoporose tem sido um grande problema na saúde pública no mundo, acometendo homens e mulheres, porém com maior incidência no sexo feminino, principalmente devido à redução

do estrógeno após a ocorrência da menopausa. Segundo Boyd et al. (2006) a osteoporose é uma doença caracterizada pela perda da densidade mineral óssea, consequentemente com aumento da fragilidade e do risco de fraturas ósseas.

Um estudo realizado por Jha et al. (2010) com 57 mulheres e 43 homens indianos, pacientes do hospital de Nova Deli, com a finalidade de verificar a causa principal de fraturas ósseas na população. Associada à análise das fraturas ósseas, foram coletados dados referentes à dieta diária, atividades físicas e níveis séricos de cálcio e vitamina D no organismo. Os dados permitiram aos autores concluir que os pacientes com dieta rica em cálcio e vitamina D obtiveram aumento no índice de massa corporal, Os pacientes com intensa atividade física foram menos propensos à fraturas ósseas. Entretanto, os autores também concluíram que a idade avançada, o consumo de cafeína e a ausência de atividade física estavam diretamente associados aos casos de fraturas ósseas na população indiana.

Vários fatores exógenos e endógenos são capazes de controlar a formação, absorção e remodelação do tecido ósseo afetando diretamente a densidade mineral óssea, segundo Lacerda et al. (2010).

El Khassawna et al. (2013) mostraram que o consumo adequado de cálcio e vitamina D, provenientes da alimentação e/ou suplementação são necessários para garantir um pico máximo de densidade mineral óssea em indivíduos jovens, a fim de reduzir a taxa de perda óssea na terceira idade. Desordens no nível de cálcio podem levar ao desenvolvimento da hipercalcúria que frequentemente vem acompanhada de desmineralização óssea e deficiência de vitamina D. Os autores relataram ainda que o risco de fratura óssea em pacientes com redução da densidade mineral óssea e o nível sérico de vitamina D está diretamente relacionado à absorção intestinal de cálcio e que outros elementos essenciais no processo de mineralização durante a formação óssea são o fósforo e a vitamina K, que durante o processo do metabolismo ósseo são

responsáveis pela proteção do tecido ósseo contra a perda da densidade mineral óssea.

Klintstrom et al. (2013) relataram que para avaliar o conteúdo mineral ósseo, o método frequentemente utilizado na prática clínica é a mensuração da densidade mineral óssea pela dupla absorção de raios X – DEXA, método este que estima o conteúdo mineral por área óssea ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) a partir de uma imagem bidimensional.

## **2.2 – Consumo de bebidas à base de cola, guaraná e café versus a densidade mineral óssea.**

Garcia-Contreras et al. (2000) relataram que existe uma associação significativa entre o consumo de bebidas à base de cola e o aumento no risco de fratura óssea. A fim de comprovarem essa afirmação, os autores realizaram estudo com a finalidade de examinar a relação existente entre o consumo de refrigerantes à base de cola e a densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas. Nesse estudo foram utilizadas quarenta ratas Sprague-Dawley separadas em quatro grupos ( $n=10$ ): grupos I, II, III e IV. Os animais dos grupos II, III e IV foram submetidos à ovariectomia bilateral, a fim de induzir redução da massa óssea corporal; nos animais dos grupos I e II, foi administrada água *ad libitum* e nos animais dos grupos III e IV, administrados refrigerantes à base de cola, de marcas comerciais diferentes, *ad libitum*, sendo a administração nesses grupos, por dois meses. Após o período de administração das substâncias, foram avaliados os seguintes parâmetros: densidade óssea mineral, cálcio presente na massa óssea carbonizada, espessura da cortical do fêmur, cálcio, fosfato, albumina, creatinina e fosfatase alcalina. Os autores observaram que o consumo de refrigerantes à base de cola nos grupos III e IV foram três vezes superior ao consumo de água nos grupos I e II; os animais dos grupos III e IV desenvolveram hipocalcemia e a densidade mineral óssea, mensurada no fêmur por meio do DEXA, foi estatisticamente inferior em relação aos animais do grupo controle: grupo

I ( $0,20 \pm 0,02$ ), grupo II ( $0,18 \pm 0,01$ ), grupo III ( $0,16 \pm 0,01$ ) e grupo IV ( $0,16 \pm 0,01$ ) g/cm<sup>2</sup>. A partir da análise dos dados, os autores concluíram que o consumo de refrigerantes à base de cola tem potencial suficiente para redução da densidade óssea mineral na região do fêmur.

Heaney e Rafferty (2001) reportaram que bebidas gaseificadas podem estar associadas ao aumento do risco de fraturas ósseas e ao aumento da excreção de cálcio na urina. Os autores propuseram a avaliação de mulheres, entre 20 e 40 anos de idade, que consumiam aproximadamente 680 ml de refrigerante por dia. Foi avaliado o consumo de dois refrigerantes que possuíam cafeína em sua composição (Coca-Cola<sup>®</sup> e Coca-Free<sup>®</sup> (The Coca-Cola Company, Atlanta) e dois refrigerantes livres de cafeína (Mountain Dew<sup>®</sup>, Pepsi Cola<sup>®</sup> Company, Purchase, NY; e Sprite, The Coca-Cola Company, Atlanta). O estudo ainda incluiu um grupo de controle neutro, no qual era feito apenas o consumo de água e um grupo de controle positivo, que consumiu leite achocolatado. Os refrigerantes eram consumidos no café da manhã, após uma noite de jejum e nenhum outro alimento deveria ser consumido até a coleta da urina, quando foi avaliado o pH, acidez total, sódio, creatinina e cálcio. Os autores observaram que, em relação ao grupo controle neutro, houve aumento da excreção de cálcio na urina no grupo controle positivo, que fazia consumo de leite e no grupo que consumiu refrigerante à base de cola (Coca-free, The Coca-Cola Company, Atlanta). Assim, os autores concluíram que o excesso de perda de cálcio na urina está associada ao consumo de refrigerantes que possuem em sua composição a cafeína.

Kinney (2002) relatou que refrigerantes à base de cola, que contêm ácido fosfórico e cafeína podem aumentar a fragilidade dos ossos em crianças e adolescentes por meio da interação desses com o conteúdo mineral ósseo, fato este que pode aumentar o risco de fratura óssea. O autor relata ainda que o consumo de refrigerantes à base de cola está associado com fraturas ósseas em crianças e adolescentes com idade entre 7 e 14 anos. A fim de confirmar sua

posição, o autor descreve um estudo com 460 adolescentes norte americanos, que consumiam refrigerantes à base de cola e refrigerantes que não continham cafeína ou ácido fosfórico em sua composição. Os autores concluíram que existe uma relação positiva entre o consumo de refrigerantes à base de cola e o aumento no risco de fraturas ósseas.

Kristensen et al. (2005) relataram que no mundo ocidental, o consumo de refrigerantes combinado com a redução no consumo de leite tem gerado relação positiva no aumento dos casos de osteoporose. A fim de verificarem esta relação, os autores desenvolveram um estudo onde foi avaliada a tendência de substituição do leite por refrigerantes. Onze homens, saudáveis, com idade entre 22 e 29 anos, os quais foram submetidos a uma dieta pobre em cálcio, por dez dias em dois períodos de intervenção, com intervalo de dez dias entre as intervenções e estudado os efeitos dessa substituição na homeostase do cálcio e na remodelação óssea. Durante o primeiro período de intervenção, eram consumidos, juntamente com a dieta pobre em cálcio, 2,5 litros de Coca-Cola® por dia; já no segundo período de intervenção, foi administrado 2,5 litros de leite semidesnatado por dia para cada sujeito da pesquisa. Foram avaliados, no início e ao fim de cada período de intervenção, os níveis séricos de cálcio, fosfato, osteocalcina e fosfatase alcalina. Foi observado pelos autores um aumento nos níveis de fosfato e osteocalcina no primeiro período de intervenção em relação ao segundo período. Observaram ainda aumento significativo na reabsorção óssea no primeiro período de administração da Coca cola em relação ao período de administração do leite semidesnatado. A partir dos dados analisados, os autores concluíram que a ingestão de refrigerantes à base de cola, associado à dieta pobre em cálcio afeta negativamente a saúde óssea.

Hallstrom et al. (2006) afirmaram que o consumo de café e chás, que possuem em sua composição a cafeína, estão associados ao risco de fraturas ósseas por osteoporose. Nesse estudo, os autores propuseram examinar a relação de associação, realizando um estudo coorte, com o acompanhamento de

31527 mulheres, suecas, com idade variando entre 40 e 76 anos, onde o consumo de café, chá cafeinado e consumo total de cafeína eram estimados por meio de questionário preenchido pelas próprias voluntárias em relação a sua dieta diária. Durante os dez primeiros anos de acompanhamento, os autores observaram a ocorrência de 3279 casos de fraturas ósseas devido à osteoporose. Observaram ainda que as voluntárias que consumiam valores superiores a 330 mg/dia de cafeína total, tinham seu risco de fratura óssea aumentada em relação às demais voluntárias do estudo. O consumo de café isoladamente aumentou significativamente o risco de fraturas, enquanto o consumo de chás, mesmo que cafeinados, não apresentou a mesma relação. Observaram ainda que o risco de fraturas ósseas aumentou exponencialmente quando havia a associação do consumo de café com outras fontes de cafeína, principalmente nas voluntárias com baixo consumo de cálcio. A partir da análise dos dados, os autores concluíram que o consumo diário de cafeína, 330 mg/dia, equivalente ao consumo de 4 copos de café/dia, aumentou significativamente o risco de fraturas ósseas e redução da densidade mineral óssea.

Tsuang et al. (2006) desenvolveram estudo com a finalidade de verificar a influência do consumo de cafeína no comportamento dos osteoblastos, uma vez que a cafeína pode ser responsável pela redução da densidade mineral óssea, aumento do risco de fraturas ósseas, além de exercer influência negativa na retenção de cálcio no organismo. Nesse estudo, os autores realizaram a cultura de células osteoblásticas, provenientes da medula óssea da calvária de ratos Wistar, os quais foram expostos à cafeína em sete concentrações distintas (100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 mM) analisadas nos períodos de 1, 3, 7 e 14 dias. Após a exposição dos osteoblastos à cafeína, os autores concluíram que a mesma tem potencial deletério sobre os osteoblastos, mesmo que em pequenas concentrações, desde o primeiro contato com a linhagem de células, induzindo a apoptose dos osteoblastos.

Tucker et al. (2006) afirmaram que o consumo de refrigerantes pode causar efeitos adversos sobre a densidade mineral óssea, principalmente os refrigerantes à base de cola, que possuem em sua composição a cafeína e o ácido fosfórico. Os autores realizaram a mensuração da densidade mineral óssea na coluna vertebral (L2-L4) e outras três mensurações em região do quadril (trocanter, cabeça do fêmur e quadril total), em 1413 mulheres e 1125 homens, pacientes do centro de estudos em osteoporose de Framingham. Para a mensuração da densidade mineral óssea, todos os pacientes foram submetidos à densitometria óssea pela dupla absorção de Raios X – DEXA (Lunar DPX-L, Lunar Radiation Corp, Madison, WI). O consumo diário de refrigerantes foi mensurado por meio de questionário de frequência alimentar. Os autores observaram que o consumo de refrigerante à base de cola está associado à redução da densidade mineral óssea na região de quadril nas mulheres avaliadas pelo estudo; observaram ainda que a cola foi responsável por redução da densidade mineral óssea na cabeça do fêmur. A partir dos dados analisados, os autores concluíram que o consumo de refrigerantes à base de cola está associado à baixa densidade mineral óssea em mulheres.

Ogur et al. (2007) desenvolveram um estudo para determinar as alterações na densidade mineral óssea, geradas pelo consumo de refrigerante de cola. Os autores utilizaram trinta ratos (Sprague-Dawley), sendo 15 fêmeas e 15 machos, separados em quatro grupos, grupo 1 (10 machos), grupo 2 (10 fêmeas), grupo 3 (5 machos) e grupo 4 (5 fêmeas). Para os grupos 1 e 2 foi administrado *ad libitum* ração padrão, água e refrigerante à base de cola, para os grupos 3 e 4 (grupos controle) foi administrado ração padrão e água. Após trinta dias da nova dieta, todos os animais foram submetidos à densitometria óssea por meio da dupla absorção de Raios X – DEXA, além de coleta de sangue, parte do esôfago e do rim para análise histológica. Os autores observaram um ganho de peso nos animais dos grupos 1 e 2, com redução no consumo de água e aumento no consumo de refrigerante. Na análise do nível de cálcio sérico, não observaram diferenças

estatísticas entre os grupos, porém ao analisar os dados da densitometria óssea, verificaram significativa redução na densidade mineral óssea dos grupos 1 e 2, em relação ao grupo controle. Foram observados ainda, congestão glomerular e derrame intertubular nos cortes histológicos do rim. Com a análise dos dados, os autores concluíram que a redução da densidade mineral óssea está intimamente relacionada ao derrame renal, fato que reduz a captação de cálcio pelo organismo.

Libuda et al. (2008) estudaram a associação entre o consumo a longo prazo de refrigerantes e as alterações ósseas em crianças e adolescentes. Os autores acompanharam durante quatro anos, 228 crianças e adolescentes que consumiam refrigerantes, com a finalidade de verificar a remodelação óssea do rádio por meio de tomografia computadorizada quantitativa periférica. Os participantes da pesquisa foram separados em quatro grupos (n=57): grupo 1 (todos os refrigerantes cafeinados e descafeinados, gaseificados ou não, adoçados por açúcar ou adoçantes), grupo 2 (refrigerantes cafeinados adoçados por açúcar ou adoçante, com ácido fosfórico em sua composição), grupo 3 (refrigerantes descafeinados, adoçados por açúcar ou adoçante e com ácido cítrico em sua composição) e grupo 4 (grupo que fazia consumo de leite, achocolatado ou não). Após coleta dos dados, não foi observado associação entre os grupos 1 e 3, com o conteúdo mineral ósseo, área de cortical óssea e o índice de resistência óssea. Os autores concluíram que o consumo a longo prazo de refrigerantes cafeinados e não cafeinados, apresentam efeito catabólico sobre o tecido ósseo de jovens em ambos os gêneros, afirmando ainda que este efeito se deve à associação negativa entre o consumo total de proteína e o baixo consumo de leite entre crianças e adolescentes.

Celec e Behuliak (2009) descreveram que apesar do consumo de refrigerantes de cola ser em larga escala no mundo, os seus efeitos ainda não estão claros, apesar de algumas associações já conhecidas como: ganho de peso, doenças renais e osteoporose. Os efeitos deletérios dos refrigerantes à base de cola foram analisados em quarenta ratos Wistar com três diferentes refrigerantes

de cola, no período de três meses. Após o tempo de administração dos refrigerantes, os autores procederam a mensuração de hormônios esteroides no plasma sanguíneo e o estresse oxidativo. Os autores observaram aumento na atividade locomotora e aumento na ansiedade em todos os animais do grupo com ingestão de refrigerante à base de cola, além de um sutil efeito antidepressivo após os testes de natação, ao qual, os animais foram submetidos. Os autores concluíram que ocorre um aumento nos níveis de estradiol e testosterona, sugerindo assim novos efeitos da cafeína sobre os receptores de adenosina.

Teófilo et al. (2010) afirmaram que o consumo de refrigerantes à base de cola afetam o metabolismo ósseo e aumentam o risco de fraturas ósseas, além de promover atraso na reparação e remodelação ósseas. Com a finalidade de verificar os efeitos dos refrigerantes à base de cola no processo de formação e reparação óssea, os autores utilizaram vinte ratos Wistar, machos, com 23 dias de vida, os quais foram tratados com dieta à base de refrigerante de cola *ad libitum* por 14 e 21 dias, períodos após os quais foram realizadas as exodontias dos incisivos superiores direito para o estudo da reparação óssea. Para verificar a quantidade de osso neoformado na região das exodontias, foram realizados cortes histológicos semi-seriados da região a ser avaliada e os mesmos analisados pelo método quantitativo de contagem de pontos sobre as trabéculas ósseas neoformadas. A análise histológica sugeriu redução no processo de osteogênese nos grupos que receberam a dieta à base de refrigerante de cola, além do fato de que o osso neoformado, apresentava-se mais escasso e fino em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que apesar dos resultados experimentais obtidos a partir de um modelo animal não poderem ser extrapolados para a prática clínica, o referido estudo comprovou a influência negativa do refrigerante à base de cola na formação óssea.

Lacerda et al. (2010) afirmaram que a cafeína induz a perda de cálcio e influencia o desenvolvimento normal do tecido ósseo. Nesse estudo, os autores propuseram avaliar os efeitos do café no metabolismo ósseo em ratos, por meio

de mensurações bioquímicas do nível de cálcio, além da densitometria e histomorfometria do tecido ósseo. Os autores utilizaram quarenta e dois ratos Wistar, machos, nascidos de mães que receberam dieta à base de café durante a gestação. Os ratos receberam dieta à base de café desde o nascimento até 60 dias de vida, momento em que foi realizada a exodontia do incisivo superior direito com sacrifício em 7, 21 e 42 dias posteriores à exodontia. No momento do sacrifício, foram coletados sangue e urina, as maxilas foram radiografadas e posteriormente processadas, sendo confeccionadas lâminas histológicas da região de interesse a ser analisada. Os autores observaram grande quantidade de cálcio no plasma sanguíneo e na urina. Em contrapartida, foi observada redução dos níveis de cálcio no tecido ósseo, além de redução na densidade mineral óssea, que foi avaliada por meio da imagem radiográfica desta, obtida juntamente com uma escala de alumínio dos animais que foram tratados com café e sacrificados em 42 dias. A partir dos dados obtidos na pesquisa, os autores concluíram que a ingestão de café/cafeína promove efeitos adversos no metabolismo do cálcio, incluindo aumento nos níveis plasmáticos e urinários, além da redução da densidade mineral óssea, redução do volume ósseo no processo de reparação tecidual.

Liu et al. (2011) desenvolveram um trabalho onde comprovaram que a cafeína aumenta a diferenciação de células da medula óssea em osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea e alterando a densidade mineral óssea em ratos. Os autores utilizaram duas linhagens animais, camundongos ICR e ratos Wistar, de onde foram extraídas células da medula óssea da calvária e fêmur, respectivamente. As culturas celulares foram expostas à cafeína onde não foi observada alteração metabólica no desenvolvimento dos osteoblastos, porém notaram maior diferenciação das células da medula óssea em osteoclastos. Os mesmos animais foram submetidos à dieta de cafeína por vinte dias, onde ao final do estudo, os autores observaram redução da densidade mineral óssea na região de vértebras lombares, fêmur e tíbia em relação ao grupo controle.

### **2.3 A microtomografia computadorizada e a análise óssea**

Parfitt et al. (1987) realizaram um estudo onde padronizaram a nomenclatura, símbolos e unidades referentes ao estudo da histomorfometria óssea, com a finalidade de facilitar a comunicação e entendimento de novos estudos e tecnologias, sendo esta padronização utilizada nas análises ósseas em micro-CT.

Muller et al. (1998) desenvolveram um estudo analisando morfométricamente fragmentos de biopsias ósseas realizando a comparação estrutural entre os cortes histológicos e a microtomografia computadorizada. Para a realização do estudo, os autores removeram peças de tecido ósseo da região ilíaca de 27 mulheres e 36 homens, com idade variando entre 23 e 92 anos, dos quais foram retirados 4 fragmentos, sendo posteriormente descalcificados e analisados por histomorfometria convencional, a fim de verificar a microarquitetura óssea dos fragmentos. O restante da peça foi mantida em formol e analisada por microtomografia computadorizada, utilizando o aparelho Scanco Medical AG (Bassersdorf, Suíça) com *voxel* de 14  $\mu\text{m}$ . Após o escaneamento, as imagens foram reconstruídas e analisadas sob os seguintes parâmetros: % volume ósseo, % superfície óssea, espessura de trabécula e separação entre as trabéculas. A partir dos resultados encontrados na histomorfometria e na microtomografia computadorizada, os autores concluíram que existe uma alta correlação entre as duas modalidades de exame para análise da porcentagem de volume ósseo, espessura de trabéculas e separação entre as mesmas. Fatores estes que garantiram à microtomografia computadorizada potencial para análise da microarquitetura óssea, sendo este um exame não invasivo, rápido e de alta precisão.

Boyd et al. (2006) realizaram estudo com a finalidade de verificar as mudanças morfológicas que ocorrem a longo prazo, em ratas ovariectomizadas,

por meio da microtomografia computadorizada *in vivo*. Os autores afirmam que o modelo animal de ratas ovariectomizadas é o ideal para estudos e controle da osteoporose e que, o desenvolvimento e o aprimoramento da microtomografia computadorizada permitiu o monitoramento individual das alterações que ocorrem na redução da densidade mineral óssea. O estudo constituiu-se no delineamento de tempo e curso das perdas ósseas em ratas ovariectomizadas, com auxílio do micro-CT *in vivo*, comparado a estudos morfométricos de ratas ovariectomizadas e sacrificadas em diferentes períodos de tempo. Nesse estudo, os autores utilizaram 20 ratas Wistar divididas em dois grupos (n=10): grupo 1 (ovariectomizadas) e grupo 2 (controle). Todos os animais passaram por exames de microtomografia computadorizada, na região da tíbia, com intervalo de um mês, durante seis meses, onde em cada exame foram analisados os seguintes parâmetros: % volume ósseo, % superfície óssea, espessura de trabécula, separação entre as trabéculas, número de trabéculas, densidade de conectividade e índice de modelo estrutural. Os autores observaram alterações ao longo do tempo, em ambos os grupos, com decréscimos dos valores em todos os parâmetros analisados, exceto para a separação entre trabéculas no grupo controle; observaram ainda que o exame de micro-CT *in vivo* permitiu um diagnóstico precoce das alterações morfológicas encontradas quando comparadas a demais estudos.

Cooper et al. (2007) descreveram o impacto do tamanho do *voxel* na análise tridimensional por microtomografia computadorizada da porosidade da cortical do fêmur humano. Para a realização do estudo, os autores recolheram amostras de dez fêmures humanos, provenientes de arquivo anatômico, que foram microtomografados pelo aparelho SkyScan 1072 (Aartselaar, Belgium), com os seguintes parâmetros de aquisição: 100 kV, 100  $\mu$ A, tempo de exposição de 5,9 segundos, aquisição de quatro frames a cada 0,45 graus de rotação e filtro de alumínio de 1mm. Em relação ao *voxel*, os autores utilizaram cinco diferentes tamanhos, 5, 10, 15, 20 e 40  $\mu$ m com a finalidade de comparar a interferência dos mesmos sobre as análises. Após a reconstrução, procederam as análises dos

seguintes parâmetros na porção cortical: % do volume de canal, a superfície do canal em relação ao volume, média do diâmetro de canal, média da separação de canal, número de canal, grau de anisotropia e densidade de conectividade de canal. A partir da análise dos dados, os autores concluíram que os valores referentes às análises dos canais encontrados na cortical óssea foram diminuindo à medida que o tamanho do *voxel* aumentou, com conseqüente redução na qualidade final da imagem.

de Oliveira et al. (2011) realizaram um estudo com a finalidade de identificar os principais parâmetros e as características mais importantes da microarquitetura óssea, em sítios de implantes, que estariam relacionados a um correto planejamento operatório. Para tal, os autores recolheram amostras de quarenta e seis sítios ósseos, em trinta e dois voluntários que foram submetidos à cirurgia para instalação de implantes dentários. Os fragmentos ósseos removidos durante a cirurgia foram microtomografados utilizando o aparelho Skyscan 1172 (Antwerp, Bélgica) 92 kV, 120  $\mu$ A, *voxel* de 2,7  $\mu$ m. Com as análises realizadas, os autores concluíram que os parâmetros mais importantes a serem analisados em um sítio de implante seriam: configuração e organização trabecular (arquitetura), variáveis referentes ao volume e a superfície óssea (densidade), massa óssea e por fim, a quantidade, a organização e o espaçamento entre as trabéculas ósseas.

Perilli et al. (2012) afirmaram existir relações significativas entre a densidade mineral óssea, obtida por meio da dupla absorção de raios X - DEXA e a resistência óssea. Porém os autores afirmaram ainda que a densitometria óssea possui baixa sensibilidade no diagnóstico de perda de massa óssea na região das vértebras lombares e que a microtomografia computadorizada poderia ser uma modalidade de exame com maior capacidade de diagnóstico tridimensional não invasivo desta região. Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizadas oito vértebras lombares retiradas de *ex vivos*, e as mesmas submetidas à análise pelo DEXA e pela microtomografia computadorizada para avaliar a capacidade de prever a densidade e a resistência dos corpos vertebrais. Foram avaliados os

seguintes parâmetros: volume total de osso, volume do osso trabecular e fração de volume ósseo trabecular. Os corpos vertebrais foram testados mecanicamente através do ensaio de resistência à compressão, para determinar a carga máxima. Os autores concluíram de acordo com os dados, que ao contrário do proposto, projeções laterais da densitometria óssea se mostraram mais eficientes no diagnóstico do volume da massa óssea em corpos vertebrais quando comparados aos dados da microtomografia computadorizada.

Tjong et al. (2012) afirmaram ser importante o conhecimento da microarquitetura óssea para o entendimento dos mecanismos e tratamentos de várias alterações do tecido ósseo. Os autores desenvolveram um estudo com o objetivo de comparar o efeito do tamanho do *voxel* (41, 82 e 123  $\mu\text{m}$ ) da tomografia computadorizada periférica de alta resolução (HR-pQCT) na análise do osso cortical e esponjoso, comparado aos valores de referência da microtomografia computadorizada, considerada padrão ouro para tal análise. Foram utilizados 17 ossos rádios, provenientes de *ex vivos*, que foram submetidos à HR-pQCT e à micro-CT, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: densidade volumétrica, % volume ósseo sobre o volume total, número de trabéculas, separação entre as trabéculas e espessura de trabéculas. Nesse estudo, observou-se alta correlação entre os dados obtidos entre o micro-CT e a HR-pQCT com *voxel* de 41  $\mu\text{m}$  na análise da espessura das trabéculas. A densidade volumétrica se mostrou acurada nas duas modalidades de exame. Em todos os *voxels* testados, observou-se forte correlação entre a espessura cortical nos dois métodos de avaliação. Os parâmetros de porosidade da cortical se mostraram dependentes do tamanho do *voxel*, quanto menor o *voxel* maior a porosidade demonstrada. Com a análise dos dados, os autores concluíram que quando comparada à microtomografia, a HR-pQCT só é eficaz quando utilizada com o menor *voxel* possível, mantendo ainda a micro-ct como padrão ouro para análise da microarquitetura óssea.

Klintstrom et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de desenvolverem um método de avaliação quantitativa do osso trabecular em tomografia multislice e tomografia computadorizada de feixe cônico, tendo como base os valores de referência da microtomografia computadorizada. Os autores utilizaram quinze fragmentos ósseos retirados do rádio de *ex vivos*. As amostras foram tomografadas por dois diferentes tomógrafos multislice 64 canais, Siemens Definition (Siemens AG, Alemanha) e VCT (GE Medical Systems, Milwaukee, USA), por um tomógrafo de feixe cônico, Accuitomo 3D FDP 80 (J Morita Mfg. Corp., Kyoto, Japão) e por um microtomógrafo,  $\mu$ CT40 (Scanco Medical AG, Suíça), sendo avaliados os seguintes parâmetros: volume ósseo, espessura de trabécula, separação entre trabéculas, número de trabéculas e intercessões trabeculares. Com base na análise dos dados, os autores observaram que os tomógrafos, tanto os multislice quanto o de feixe cônico, superestimaram o volume ósseo e a espessura das trabéculas e subestimaram as intercessões trabeculares. Observaram ainda que os parâmetros obtidos pela tomografia computadorizada do feixe cônico foram mais próximos aos obtidos pela microtomografia, com coeficiente de correlação entre 0,93 e 0,98. Como isso os autores concluíram alta correlação entre os mesmos e sugeriram a possibilidade de estudos de monitoramento e quantificação óssea utilizando a tomografia computadorizada de feixes cônico.

Khassawana et al. (2013) avaliaram em um modelo animal experimental, a indução da osteoporose por ovariectomia, associada à deficiência de vitamina D, vitamina K, cálcio e fósforo, na análise óssea por microtomografia computadorizada. Foram utilizadas trinta e duas ratas, Sprague-Dawley, com 14 semanas de idade divididas em três grupos: grupo 1 (controle), grupo 2 (controle cirúrgico-simulado) e grupo 3 (ratas ovariectomizadas com dieta multideficiente). Após três meses de tratamento, os animais foram sacrificados, os fêmures analisados pela histomorfometria e as tíbias analisadas por microtomografia SkyScan 1072 (Antwerp, Bélgica) nos seguintes parâmetros: % volume ósseo

sobre o volume total, espessura de trabécula, separação entre trabéculas, número de trabéculas e índice de modelo estrutural. Foi observada redução da porção óssea em relação ao volume total da tíbia com aumento da área total avaliada pela microtomografia computadorizada. Na análise histológica do fêmur, foi observado aumento da porosidade na porção cortical. Os autores concluíram que uma dieta multideficiente associada ao quadro de osteoporose promove alterações sobre a microarquitetura óssea em modelo animal.

Hsu et al. (2013) realizaram um estudo visando comparar a capacidade da microtomografia computadorizada e a tomografia computadorizada de feixe cônico na avaliação dos parâmetros do osso trabecular e cortical. Os autores realizaram exames de tomografia computadorizada de feixe cônico e microtomografias computadorizadas em vinte e oito fêmures, de quatorze ratos machos, Sprague-Dawley, com a finalidade de mensurar a densidade mineral óssea volumétrica trabecular, densidade mineral óssea volumétrica cortical e o índice de resistência óssea. Cinco parâmetros estruturais do osso trabecular da cabeça femoral foram calculados a partir de imagens de micro-CT, sendo eles: % volume ósseo sobre o volume total, % superfície óssea, espessura de trabécula, separação entre as trabéculas e o número de trabéculas. Além disso, foi realizado o ensaio de resistência à flexão de três pontos, com a finalidade de mensurar a carga de fratura de cada fêmur. As análises estatísticas mostraram forte correlação entre os valores de densidade mineral óssea volumétrica trabecular (vCanBMD) obtidos pela microtomografia computadorizada e a tomografia computadorizada de feixe cônico. Ainda foi observado correlação forte/moderada entre o vCanBMD medida em imagens de TCFC e de micro-CT. Os autores concluíram que a TCFC pode ser utilizada para avaliação dos parâmetros ósseos, entretanto a microtomografia computadorizada continua sendo o exame considerado padrão ouro.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo neste estudo foi avaliar o efeito de dietas à base de café, refrigerantes de cola e guaraná em fêmures de ratos machos e fêmeas, em relação à microarquitetura e resistência óssea.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os critérios estabelecidos para análise deste estudo estão de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo resolução CFO 179/91. Antes que ocorresse a coleta de dados. Esse projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, com parecer favorável 2458-1, em anexo.

Neste estudo foram selecionados oitenta ratos adultos (*Rattus Norvegicus*, *Albinus Wistar*), sendo 40 machos e 40 fêmeas, com idade de noventa dias e peso inicial variando de: 295 - 358g para os machos e 186-224 g para as fêmeas, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, em local com temperatura e umidade controladas, com ciclos alternados de doze horas em ambiente claro e escuro. A alimentação dos mesmos constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum* em todos os grupos, além de dieta à base de café e refrigerantes de cola e guaraná *ad libitum* nos grupos experimentais.

### 4.1 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em oito grupos (n=10), sendo quatro constituídos por animais machos (M) e quatro por animais fêmeas (F), de acordo com o tipo de dieta, conforme descrito abaixo e de acordo com a Tabela 1.

- Grupo controle: dez ratos distribuídos em duas gaiolas com cinco animais cada, com dieta à base de ração padrão e água *ad libitum*.

- Grupo cola: dez ratos distribuídos em duas gaiolas com cinco animais cada, com dieta à base de ração padrão, água e refrigerante à base de cola / Coca-Cola® (Coca-Cola Company, Atlanta) *ad libitum*.
- Grupo guaraná: dez ratos distribuídos em duas gaiolas com cinco animais cada, com dieta à base de ração padrão, água e refrigerante à base de guaraná / Guaraná Antarctica® (Antarctica, Manaus) *ad libitum*.
- Grupo café: dez ratos distribuídos em duas gaiolas com cinco animais cada, com dieta à base de ração padrão, água e café / Utam® (Utam, Ribeirão Preto, São Paulo) *ad libitum* na proporção de seis colheres de pó para dois litros de água.

Tabela 1- Grupos de acordo com a dieta utilizada.

<b>Grupos</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Dieta</b>
Controle	10	Água
Cola	10	Água e refrigerante cola
Guaraná	10	Água e refrigerante guaraná
Café	10	Água e café

As gaiolas utilizadas neste estudo possuíam dois bebedouros, um com água e o outro com a dieta selecionada, dispostos em posições opostas, aleatorizados e reabastecidos diariamente com 500 ml de cada substância, onde o volume diário consumido foi anotado e posteriormente tabulado, com a finalidade de estabelecer a média de consumo diário de água, café e refrigerantes à base de cola e guaraná em cada grupo experimental.

Todos os animais foram pesados semanalmente, com a finalidade de se verificar se ocorreu ganho e/ou perda de peso, em função das dietas utilizadas neste estudo.

## **4.2 Obtenção e preparo das amostras**

Decorridos quarenta e oito dias de administração das dietas à base de café e refrigerantes à base de cola e guaraná, todos os animais foram novamente pesados, com a finalidade de verificar a média de peso corporal final em cada grupo experimental, o qual permitiu analisar se ocorreu ganho ou perda de massa corporal em cada animal.

Após procedimento de pesagem, todos os animais foram sacrificados por decapitação. Com auxílio de uma lâmina de bisturi nº15 Solidor<sup>®</sup> (Solidor, São Paulo, Brasil), o fêmur direito foi então dissecado e armazenado em recipientes de vidro individualizados para cada amostra, contendo formol tamponado a 10%, Formol 10%<sup>®</sup> (Indalabor, Minas Gerais, Brasil).

## **4.3 Métodos de avaliação**

Dois diferentes métodos de avaliação foram utilizados no presente estudo. Para análise da microarquitetura óssea trabecular do fêmur foi utilizado o microtomógrafo computadorizado (SkyScan 1174 Compact Micro-CT<sup>®</sup>, Kontich, Bélgica) e para análise da resistência óssea, foi utilizado o teste de resistência à flexão de três pontos utilizando uma máquina de ensaios mecânicos (Modelo 4411; Instron Corporation, Canton, MA, EUA).

### **4.3.1 Análise por micro-CT da microarquitetura óssea**

Para a descrição da análise por microtomografia computadorizada, foi adotada a nomenclatura recomendada pelo Comitê de Nomenclatura de Histomorfometria da Sociedade Americana de Osso e Pesquisa Mineral e pelo Journal of Bone and Mineral Research (Parfit, et al., 1987).

#### 4.3.1.1 Obtenção das imagens por micro-CT

As imagens foram obtidas no aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT<sup>®</sup> (Kontich, Bélgica) (figura 1), seguindo as seguintes etapas:

- Preparo e posicionamento da amostra.
- Padronização dos parâmetros para obtenção das imagens.



Figura 1 – Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT<sup>®</sup> (Kontich, Bélgica)

##### 4.3.1.1.1 Preparo e posicionamento da amostra

As amostras foram fixadas com cera utilidade (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo-SP, Brasil), numa haste metálica fornecida pelo fabricante do aparelho, com a finalidade de evitar que ocorressem movimentos durante a obtenção das imagens. O conjunto foi posicionado dentro da cabine de escaneamento de maneira que a articulação coxofemoral das amostras ficassem voltadas para cima, com a extremidade livre favorecendo o seu escaneamento.

##### 4.3.1.1.2 Padronização dos parâmetros de obtenção das imagens

O escaneamento das amostras foi realizado utilizando-se os seguintes parâmetros: energia de 50 kVp e intensidade de corrente do tubo de raios X de 800  $\mu$ A.s. A fim de filtrar os fótons com maior comprimento de onda, utilizou-se um filtro de alumínio com espessura de 0,5 mm posicionado a frente da saída externa

dos Raios X. Essa espessura é a ideal para a amostra utilizada neste estudo, de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 2).

Para padronização dos escaneamentos, foi selecionado ainda o *voxel* com resolução isotrópica de 30,04  $\mu\text{m}$ , com aquisição de 3 *frames* por cada 0,5° de rotação do aparelho, totalizando um giro de 180° sendo obtidas 380 projeções de cada peça microtomografada. Neste estudo foi aplicado um algoritmo de correção de endurecimento do feixe fornecido pelo software SkyScan 1174® (Kontich, Bélgica) em todos os escaneamentos.

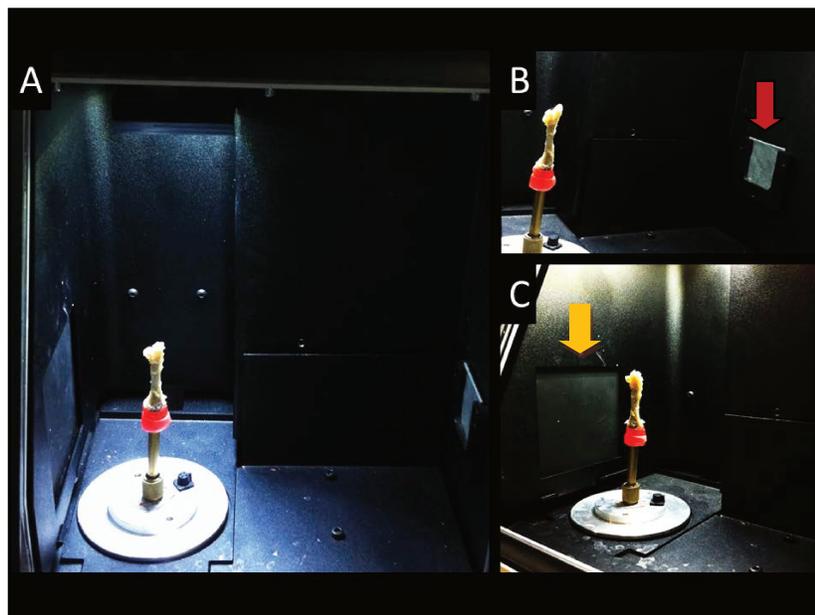


Figura 2 – A – Câmara de escaneamento / B – Fonte de radiação e filtro de alumínio indicado pela seta vermelha / C – Receptor de imagem indicado pela seta amarela

Os parâmetros estabelecidos nesse estudo para obtenção das imagens são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros para obtenção das imagens.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor Definido</b>
Potência do tubo de Raios X	50 kVp
Intensidade da corrente	800 $\mu$ A.s
Filtro de alumínio	0,5 mm
Tamanho do <i>voxel</i>	30,04 $\mu$ m
Número de <i>frames</i>	3
Grau de rotação	0,5°
Giro do aparelho	180°
Número de projeções	380

#### 4.3.1.2 Reconstrução das imagens por micro-CT

Antes de serem analisadas, todas as imagens obtidas de cada amostra foram submetidas ao processo de reconstrução por meio do software SkyScan NRecon<sup>®</sup> (Kontich, Bélgica). Durante esse processo, as ferramentas de correção de artefatos em anéis (*ring artifacts reduction*), suavização dos ruídos (*smoothing*) e correção de artefatos gerados pelo efeito de endurecimento do feixe de Raios X (*beam hardening correction*) (figura 3), além da demarcação superior (*top*) e inferior (*bottom*) (figura 4) das imagens a serem reconstruídas foram aplicadas individualmente em cada amostra de acordo com os parâmetros relacionados, conforme a Tabela 3.

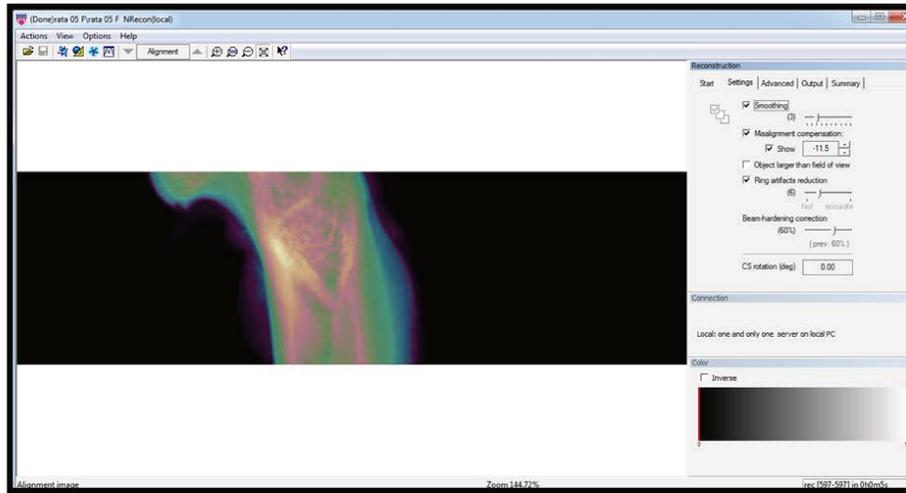


Figura 3 – Ajuste dos parâmetros de reconstrução: ring artifacts reduction, smoothing e beam hardening correction – interface do NRecon® (Kontich, Bélgica)

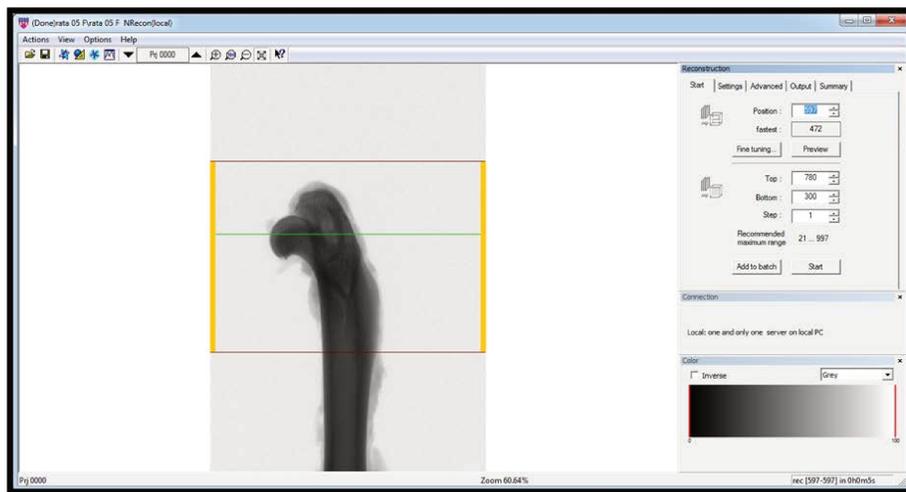


Figura 4 – Ajuste dos parâmetros de reconstrução: top e bottom – interface do NRecon® (Kontich, Bélgica)

Tabela 3 – Parâmetros de reconstrução.

Parâmetro	Valor Definido
<i>Ring artifacts reduction</i>	6
<i>Smoothing</i>	3
<i>Beam hardening correction</i>	60%
<i>Top</i>	780
<i>Bottom</i>	300

#### 4.3.1.3 Análise dos volumes adquiridos por micro-CT

A análise dos volumes reconstruídos foi realizada por meio do software Skyscan CT Analyser® (Kontich, Bélgica). Para avaliação da região de interesse do osso (*ROI*) esponjoso (espaços medulares e trabéculas ósseas), buscou-se o corte transversal mais superior da epífise proximal do fêmur direito. A partir deste corte inicial (*set of the top of selection*), contaram-se trezentas e cinquenta imagens subsequentes até a seleção do corte inferior (*set of the botton of selection*), sendo determinada assim a *ROI* inicial. Com o *ROI* inicial (figura 5), procedeu-se a seleção do *ROI* de interesse para análise das trabéculas ósseas e espaços medulares, em que cada corte transversal, a região do osso esponjoso foi desenhada manualmente utilizando-se a ferramenta *Interpolated ROI* (figura 6).

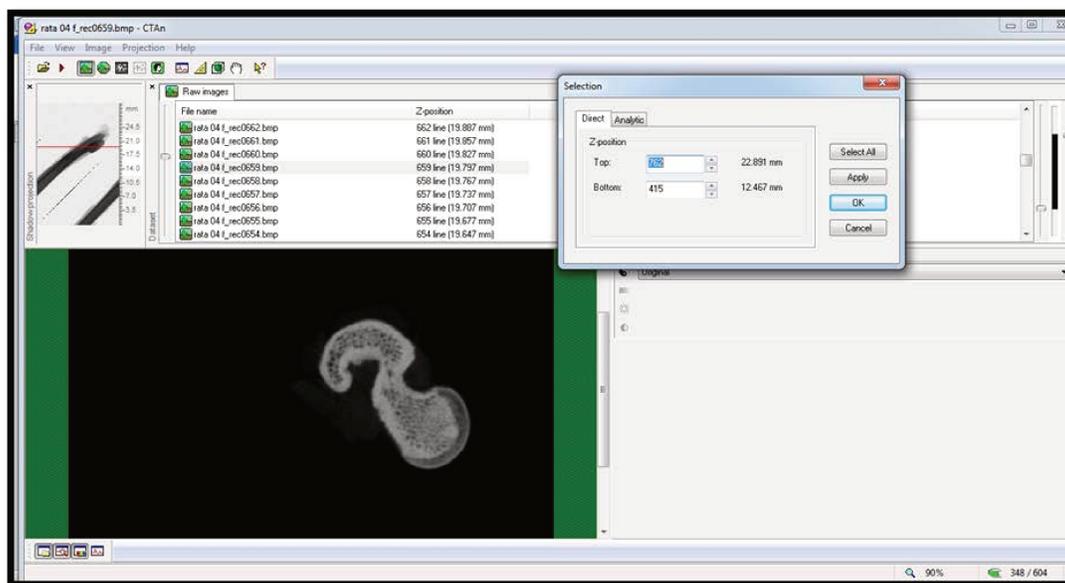


Figura 5 – Seleção do ROI inicial – interface do CTAn® (Kontich, Bélgica)

Uma vez desenhado o novo ROI, o mesmo foi salvo utilizando-se a ferramenta *save new dataset from ROI*, sendo este transformado em *VOI* (*volume of interest*). Sobre o *VOI* adquirido foi realizado a binarização de toda a região e a partir desse momento, todas as imagens ganharam tons binários pretos e brancos. As imagens binarizadas foram submetidas ao processo de limiarização

(*thresholding*), em que foi padronizada a faixa de valores de tons do volume que seriam analisados (40 e 170). Uma lista de tarefas (*task list*) (Tabela 4) personalizada para esse estudo foi aplicada e as imagens volumétricas foram analisadas pelo software, quando foram selecionados parâmetros para estudo da microarquitetura do osso esponjoso na região de interesse (Tabela 5).

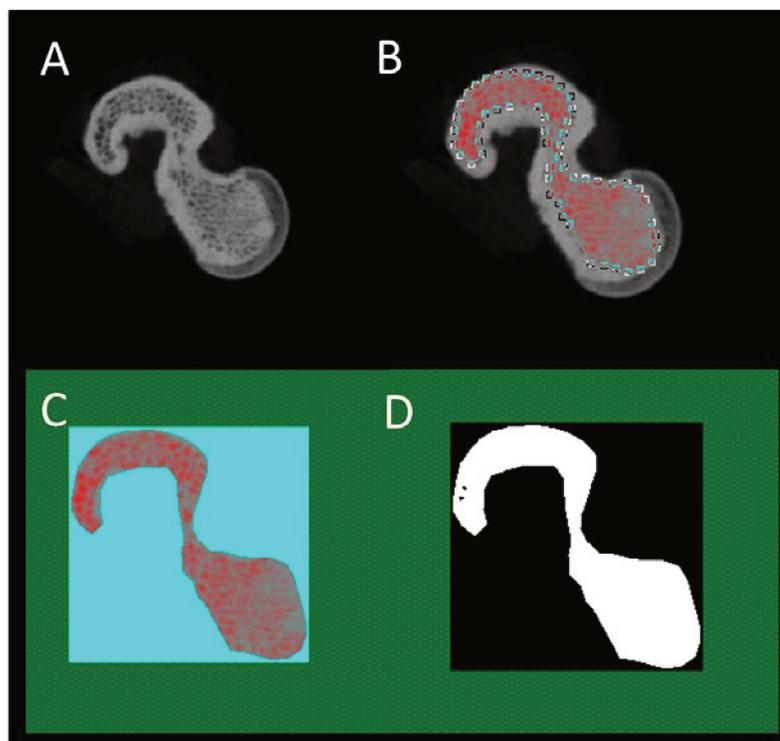


Figura 6 – A – ROI inicial / B – Seleção do ROI de interesse / C – ROI de interesse reconstruído / D – Binarização do ROI de interesse

Tabela 4 – Task list.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<i>Reload</i>	Recarregar imagens ou ROI
<i>Thresholding</i>	Segmentação das imagens binarizadas
<i>Despeckle</i>	Remover pontos indesejáveis das imagens
<i>3D analysis</i>	Calculo dos parâmetros 3D das imagens binarizadas
<i>3D model</i>	Criação da superfície 3D das imagens binarizadas

Tabela 5 – Apresentação e descrição dos parâmetros selecionados para análise da microarquitetura óssea trabecular.

<b>Abreviação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Unidade Padrão</b>
TV	Volume de tecido	mm <sup>3</sup>
BV	Volume ósseo	mm <sup>3</sup>
BV/TV	Relação do volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse	%
TS	Superfície de tecido	mm <sup>2</sup>
BS	Superfície óssea	mm <sup>2</sup>
Tb.N	Medida da média do número de trabéculas por unidade de comprimento	1/mm
Tb.Th	Medida da espessura trabecular, analisada utilizando o método direto 3D	mm
Tb.Sp	Distância média entre as trabéculas, analisada utilizando o método direto 3D	mm
Po.V(cl)	Volume de poros fechados	mm <sup>3</sup>
Po.V(op)	Volume de poros abertos	mm <sup>3</sup>
Po(tot)	Total de porosidade	%

Ao final do processo de análise, o software forneceu listas com todos os valores supracitados para cada amostra analisada.

### 4.3.2 Análise da resistência óssea

As amostras foram submetidas ao ensaio de resistência à flexão de três pontos numa máquina universal de ensaios mecânicos (Modelo 4411; Instron Corporation, Canton, MA, EUA). As dimensões de cada amostra foram verificadas com um paquímetro digital (Mitutoyo, Japan), com precisão de 0,01 mm, e as mesmas posicionadas sobre dois suportes metálicos, com distância de 20 mm entre eles. O ensaio foi realizado a velocidade de 1,3 mm/min., com a carga sendo aplicada perpendicularmente sobre a diáfise do fêmur até ocorrer a fratura. A força máxima necessária para a ruptura completa do fêmur foi expressa em Newton (N) (figura 7).

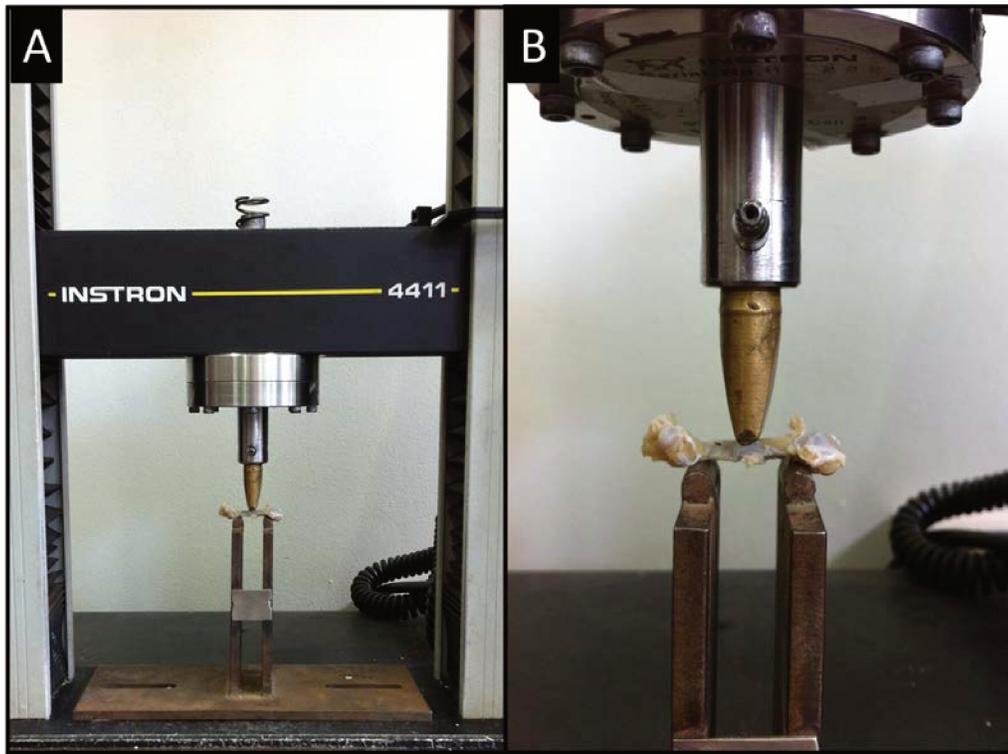


Figura 7 – A – Máquina de ensaio universal (Modelo 4411; Instron Corporation, Canton, MA, EUA) / B- Posicionamento do fêmur

#### **4.4 Análise dos dados**

Os dados foram submetidos à Análise de Variância, com teste post-hoc de Tukey em nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação dos dados gerais da pesquisa

Durante todo o transcorrer da parte experimental do presente estudo, foi monitorado o consumo diário dos líquidos introduzidos à alimentação (café e refrigerantes à base de cola e guaraná) além de monitoramento semanal do peso corporal em todos os grupos de estudo (Tabelas 6 e 7, respectivamente).

Tabela 6 – Médias do consumo diário de líquidos (ml) e desvio padrão.

Consumo médio diário (ml)				
	Machos		Fêmeas	
	Líquido Teste	Água	Líquido Teste	Água
<b>Controle</b>	-	213,90 ± 65,16 Bc	-	302,50 ± 58,76 Ac
<b>Cola</b>	467,68 ± 56,33 Aa	105,52 ± 53,65 Cd	441,41 ± 28,22 Bb	98,85 ± 54,69 Cd
<b>Guaraná</b>	453,07 ± 27,21 Ab	96,25 ± 49,29 Cd	457,29 ± 27,82 Aa	76,98 ± 52,13 Cd
<b>Café</b>	177,29 ± 80,49 Ad	153,13 ± 57,38 Cd	188,75 ± 37,03 Ad	138,13 ± 63,11 Cd

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Ao se analisar a Tabela 6, observa-se que houveram diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,05$ ), entre o consumo de água nos grupos controles machos e fêmeas, sendo esse maior para o grupo das fêmeas e também diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,05$ ) entre o consumo de refrigerante à base de cola entre ambos os sexos, sendo a maior média de consumo no grupo dos machos. Ao se avaliar os grupos experimentais dentro do próprio sexo, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre todas as substâncias em relação a ingestão de água, tendo os refrigerantes à base de cola e guaraná a maior média de consumo em relação aos grupos controles. O grupo do café apresentou a menor média de consumo em relação aos grupos controles que faziam ingestão de água. Observaram-se ainda diferenças estatisticamente

significantes ( $p \leq 0,05$ ) entre o consumo dos refrigerantes à base de cola e guaraná e café entre si, em ambos os sexos.

Tabela 7 – Avaliação do peso corporal (%).

<b>Ganho Peso Corporal (%)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	38,73	26,52
<b>Cola</b>	39,06	23,06
<b>Guaraná</b>	36,45	25,90
<b>Café</b>	39,52	27,81

Ao se avaliar o peso corporal, notou-se ganho de peso entre 36,45 % a 39,52% para os machos e 23,06% a 27,81% para as fêmeas, sendo a maior média de peso corporal ao final da parte experimental para os machos e fêmeas que receberam dieta a base de café e a menor média de peso corporal nos machos para o grupo que recebeu administração de refrigerante à base de guaraná e nas fêmeas para o grupo que recebeu refrigerante à base de cola.

Além disso, foi observado durante o experimento diferença comportamental nos grupos dos machos e fêmeas que receberam dieta à base de café e refrigerantes de cola e guaraná, tendo esses, comportamento mais agitado e ativo em relação aos animais dos grupos controles.

## **5.2 Parâmetros morfométricos da microarquitetura do osso esponjoso analisados por micro-CT**

A avaliação da microarquitetura óssea do osso esponjoso baseou-se na análise dos seguintes parâmetros: volume de tecido, volume ósseo, relação do volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse, superfície de

tecido, superfície óssea, medida da média do número de trabéculas por unidade de comprimento, medida da espessura trabecular, distância média entre as trabéculas, volume de poros fechados, volume de poros abertos e total de porosidade.

Ao ser avaliado o volume de tecido, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre todos os grupos quando foi comparado os machos e fêmeas, tendo o volume de tecido dos machos maior média em  $\text{mm}^3$  em relação ao volume de tecido das fêmeas. Dentro dos grupos de fêmeas, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando foi comparado o volume de tecido nos animais do grupo cola em relação aos do grupo controle tendo o grupo cola maior média de volume de tecido ( $50,75\text{mm}^3$ ). Notou-se ainda diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), quando foi comparado o volume de tecido entre os grupos cola e guaraná, tendo este último, a menor média ( $46,58 \text{ mm}^3$ ) de volume de tecido em relação ao grupo cola (Tabela 8).

Ao ser analisado o volume de tecido nos grupos dos machos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando comparado os volumes de tecidos dos animais do grupo cola com os volumes de tecido dos animais do grupo controle, tendo o grupo cola a maior média de tecido  $70,61 \text{ mm}^3$  (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise de volume de tecido – TV (mm<sup>3</sup>).

<b>Volume de Tecido (mm<sup>3</sup>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	61,44 ± 6,55 Ab	44,31 ± 3,02 Bb
<b>Cola</b>	70,61 ± 8,45 Aa	50,75 ± 4,29 Ba
<b>Guaraná</b>	64,76 ± 6,10 Aab	46,58 ± 3,64 Bb
<b>Café</b>	64,39 ± 5,68 Aab	46,74 ± 4,35 Bab

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação á análise do volume ósseo, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), entre os machos e fêmeas, com a maior média de volume ósseo para os grupos dos machos. Ao analisar-se isoladamente os grupos dos machos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando foi comparado o volume ósseo do grupo cola com o grupo controle, tendo o grupo cola a maior média de volume ósseo em relação ao grupo controle (Tabela 9).

Ao avaliar-se o volume ósseo dentro do grupo de fêmeas, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) ao se comparar o grupo cola com o grupo controle, e entre os grupos guaraná e café, tendo o grupo cola a maior média de volume ósseo em relação aos mesmos (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise do volume ósseo – BV (mm<sup>3</sup>).

<b>Volume Ósseo (mm<sup>3</sup>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	46,65 ± 4,62 Ab	34,53 ± 2,46 Bb
<b>Cola</b>	53,67 ± 7,63 Aa	40,02 ± 3,89 Ba
<b>Guaraná</b>	47,99 ± 5,76 Aab	36,01 ± 2,81 Bb
<b>Café</b>	48,82 ± 4,32 Aab	35,97 ± 3,68 Bb

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando foi analisado a relação entre o volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse (BV/TV), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ( $p \geq 0,05$ ), entre os machos e fêmeas, e entre os grupos experimentais do próprio gênero (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da relação do volume ósseo segmentado pelo volume total da região de interesse - BV/TV (%).

<b>% Volume Ósseo (TV/BV)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	76,01 ± 2,01 Aa	77,96 ± 2,54 Aa
<b>Cola</b>	75,88 ± 3,69 Aa	78,94 ± 2,83 Aa
<b>Guaraná</b>	74,07 ± 3,63 Aa	77,32 ± 1,79 Aa
<b>Café</b>	75,86 ± 2,77 Aa	76,92 ± 2,34 Aa

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para a análise da superfície de tecido, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os machos e fêmeas, com maior média de superfície de tecido para os grupos dos machos, além de diferença

estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando foi comparado os grupos cola, guaraná e café dentro do gênero feminino em relação ao grupo controle, tendo o grupo controle a menor média de superfície de tecido ( $153,67 \text{ mm}^2$ ). Nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) foi observada entre os grupos dos machos (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise da superfície de tecido – TS ( $\text{mm}^2$ ).

<b>Superfície de Tecido (<math>\text{mm}^2</math>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	227,16 $\pm$ 32,86 Aa	153,67 $\pm$ 6,62 Bb
<b>Cola</b>	243,16 $\pm$ 25,01 Aa	192,03 $\pm$ 9,99 Ba
<b>Guaraná</b>	248,29 $\pm$ 30,69 Aa	182,66 $\pm$ 11,91Ba
<b>Café</b>	246,03 $\pm$ 32,86 Aa	181,03 $\pm$ 15,74 Ba

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para a análise da superfície óssea, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os machos e fêmeas, tendo os grupos dos machos, maior média de superfície óssea em relação aos grupos das fêmeas. Ao comparar os grupos dos machos, nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) foi observada. Porém, foram observadas diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos cola, guaraná e café do gênero feminino, em relação ao respectivo grupo controle, tendo o grupo controle a menor média de superfície óssea (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise da superfície óssea – BS (mm<sup>2</sup>).

<b>Superfície Óssea (mm<sup>2</sup>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	372,11 ± 46,60 Aa	230,85 ± 21,35 Bb
<b>Cola</b>	438,35 ± 88,16 Aa	282,44 ± 16,79 Ba
<b>Guaraná</b>	404,62 ± 50,17 Aa	272,33 ± 16,27 Ba
<b>Café</b>	386,49 ± 44,67 Aa	273,34 ± 23,70 Ba

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação ao número de trabéculas por milímetro, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os machos e fêmeas, tendo os grupos dos machos, a maior média de número de trabéculas ósseas por milímetro (Tabela 13).

Quando foi avaliado isoladamente o número de trabéculas ósseas dentro dos sexos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), entre o número de trabéculas por milímetro do grupo café dos machos em relação ao seu respectivo grupo controle, tendo este, uma redução do número de trabéculas por milímetro. Dentro dos grupos de fêmeas, observou-se diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando comparado o grupo cola em relação ao grupo café, tendo o grupo café, uma menor média de trabéculas por milímetros. (Tabela 13)

Tabela 13 – Análise do número de trabéculas por milímetro.

<b>Número de Trabécula (/mm)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	1,81 ± 0,10 Aa	1,45 ± 0,20 Bab
<b>Cola</b>	1,75 ± 0,16 Aab	1,43 ± 0,09 Ba
<b>Guaraná</b>	1,74 ± 0,18 Aab	1,42 ± 0,10 Bab
<b>Café</b>	1,64 ± 0,07 Ab	1,32 ± 0,09 Bb

Média e desvio padrão seguidos de letras maiúsculas nas horizontais e minúsculas na vertical diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) utilizando Anova/Tukey

Na avaliação da espessura das trabéculas ósseas, observou-se diferença estaticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os machos e fêmeas, tendo as fêmeas, maior média de espessura de trabécula óssea. Ao avaliar os grupos experimentais dentro dos grupos de machos, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando foi comparada a espessura de trabéculas ósseas do grupo com dieta à base de café com o grupo controle (tabela 14), sendo maior no grupo café.

Dentro dos grupos de fêmeas, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) do grupo com dieta à base de refrigerante de cola em relação aos grupos com dieta à base de guaraná e café, o grupo cola apresentou a maior espessura de trabécula em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise da espessura de trabéculas ósseas em milímetros.

<b>Espessura de Trabécula (mm)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	0,42 ± 0,02 Bb	0,54 ± 0,09 Aac
<b>Cola</b>	0,43 ± 0,04 Bab	0,54 ± 0,04 Aa
<b>Guaraná</b>	0,43 ± 0,06 Bab	0,48 ± 0,03 Ac
<b>Café</b>	0,46 ± 0,02 Ba	0,50 ± 0,04 Ac

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação à separação entre as trabéculas ósseas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os sexos e tão pouco entre os grupos experimentais ( $p \geq 0,05$ ) (Tabela 15).

Tabela 15 – Análise da separação entre as trabéculas ósseas (mm).

<b>Separação entre as Trabéculas (mm)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	0,85 ± 0,08 Aa	0,92 ± 0,06 Aa
<b>Cola</b>	0,74 ± 0,22 Aa	0,86 ± 0,11 Aa
<b>Guaraná</b>	0,89 ± 0,10 Aa	0,89 ± 0,06 Aa
<b>Café</b>	0,91 ± 0,09 Aa	0,87 ± 0,06 Aa

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Ao se avaliar o volume de poros fechados, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os sexos apenas dos grupos controles, em que os machos apresentaram a maior média de poros fechados por  $\text{mm}^3$ . Dentro dos grupos de machos, observou-se diferença estatisticamente

significante ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando foi comparado o volume de poros fechados do grupo com dieta à base de refrigerante de guaraná com o grupo controle. Analisando o grupo das fêmeas, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos cola e café em relação ao grupo controle, tendo esses, médias superiores de volume de poros fechados em relação ao grupo controle (Tabela 16).

Tabela 16 – Análise do volume de poros fechados ( $\text{mm}^3$ ).

<b>Volume de Poros Fechados (<math>\text{mm}^3</math>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	0,70 ± 0,19 Aa	0,46 ± 0,09 Bb
<b>Cola</b>	0,61 ± 0,16 Aab	0,57 ± 0,10 Aa
<b>Guaraná</b>	0,54 ± 0,11 Ab	0,52 ± 0,10 Aab
<b>Café</b>	0,64 ± 0,19 Aab	0,57 ± 0,12 Aa

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação ao volume de poros abertos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando foram comparadas as dietas entre os grupos de machos e fêmeas, os grupos de machos apresentaram a maior média de volume de poros abertos em relação aos grupos das fêmeas (Tabela 17).

Tabela 17 – Análise do volume de poros abertos (mm<sup>3</sup>).

<b>Volume de Poros Abertos (mm<sup>3</sup>)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	14,08 ± 2,40 Aa	9,30 ± 1,41 Ba
<b>Cola</b>	16,32 ± 2,96 Aa	9,93 ± 1,16 Ba
<b>Guaraná</b>	16,22 ± 3,63 Aa	10,03 ± 1,19 Ba
<b>Café</b>	14,93 ± 2,58 Aa	10,19 ± 1,35 Ba

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando foi avaliado o total de porosidade em porcentagem, nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) foi observada entre os sexo e entre os grupos experimentais, dentro do próprio sexo (Tabela 18).

Tabela 18 – Análise do total de porosidade (%).

<b>Total de Porosidade (%)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	23,98 ± 2,01 Aa	22,83 ± 1,09 Aa
<b>Cola</b>	24,11 ± 3,69 Aa	21,04 ± 2,68 Aa
<b>Guaraná</b>	25,92 ± 5,63 Aa	22,66 ± 1,79 Aa
<b>Café</b>	24,13 ± 2,77 Aa	23,06 ± 2,34 Aa

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3 Resistência óssea

Ao serem avaliados os dados de resistência à flexão de três pontos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos de

machos e fêmeas, sendo necessário à aplicação de maior força (N) nos grupos experimentais dos machos em relação aos grupos experimentais de fêmeas. Dentro do grupo de machos nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os grupos experimentais foi observada (Tabela 19). Já entre os grupos experimentais compostos por fêmeas observou-se diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com dieta à base de cola e café em relação ao grupo controle, sendo necessária menor aplicação de força (N) para promover a fratura óssea nesses grupos.

Tabela 19 – Valores médios de resistência à flexão de três pontos (N).

<b>Teste de Flexão (N)</b>		
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<b>Controle</b>	131,36 ± 10,34 Aa	115,28 ± 12,83 Ba
<b>Cola</b>	123,58 ± 7,05 Aa	103,19 ± 8,87 Bb
<b>Guaraná</b>	134,99 ± 16,71 Aa	109,05 ± 19,40 Bab
<b>Café</b>	127,82 ± 8,09 Aa	100,07 ± 15,06 Bb

Médias e desvio padrão seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O estilo de vida das pessoas é comandado por aquilo que seu meio proporciona. Em virtude disso, cada vez mais, as pessoas vêm consumindo alimentos industrializados. Dentro deste contexto, há um crescente consumo de bebidas que têm em sua constituição substâncias que podem ser nocivas ao organismo. Assim, o presente estudo teve como finalidade avaliar o efeito de três substâncias em alguns parâmetros do tecido ósseo. As substâncias utilizadas foram escolhidas devido aos seus elevados níveis de consumo: refrigerantes à base de cola e guaraná e outra bebida à base de cafeína, o café.

Os animais foram então submetidos a uma dieta à base dessas substâncias, sendo monitorados diariamente. Dessa forma pode-se observar o consumo e também o comportamento do peso corporal dos mesmos.

Com relação ao consumo, observou-se que houve drástica redução no consumo de água em todos os grupos experimentais. A água foi deixada na gaiola para que os animais tivessem outra opção de bebida, observando-se que quando era o único líquido presente na gaiola, seu consumo apresentou-se normal, mas quando existia a opção das substâncias teste, estas, a exceção do café, foram mais consumidos que a água, sendo esse consumo maior do que a quantidade de água ingerida pelos animais do grupo controle. Essa diferença entre o consumo de água e o líquido teste foi estatisticamente significativa. Ogur et al. (2007) também relataram em seu estudo que o consumo de água pelos animais, de ambos os gêneros, diminuiu ao longo do período experimental, havendo um aumento no consumo total de líquido teste, evidenciando uma substituição da água pelo refrigerante à base de cola. O fato de duas substâncias conterem açúcar em sua composição pode explicar esse maior consumo. Isso se torna mais evidente quando se observa o consumo do café que foi menos consumido, talvez por não conter açúcar.

Ao acompanhar semanalmente o peso corporal, observou-se uma maior média de peso corporal em todos os grupos de machos quando comparados aos grupos das fêmeas, sem grandes variações entre os grupos do mesmo gênero, fator que demonstra a ausência de interferências das substâncias testadas sobre o peso corporal, contradizendo o trabalho desenvolvido por Ogur et al. (2007) que relataram diferenças estatísticas significantes, em relação ao peso corporal, com aumento do peso corporal no grupo de machos que recebeu dieta à base de refrigerante de cola e diminuição do peso corporal no grupo de fêmeas que receberam a mesma dieta. A variação de peso corporal entre os gêneros pode ser explicada pelo fator fisiológico, onde os machos têm tendência ao ganho de peso corporal em idade adulta quando comparados às fêmeas, e esta tendência se inverte em idade senil, quando devido a fatores hormonais, as fêmeas possuem maior tendência ao ganho de peso corporal quando comparadas as machos.

Outro fator importante observado na presente pesquisa, embora não tenha sido objetivo da mesma, foi o fato de que os animais dos grupos onde foram administrados os líquidos testes apresentaram aumento na atividade motora e ansiedade, evidenciados pela agitação dos mesmos dentro das gaiolas, bem como aumento no nível de estresse durante a manipulação. Estes fatores são explicados baseados no trabalho desenvolvido por Celec e Behuliak (2010) onde os autores observaram alterações endócrinas em ratos que receberam dieta à base de cola, como por exemplo, o aumento no nível sérico de estradiol e testosterona, e a ligação da cafeína aos receptores de adenosina. Vale ressaltar que a adenosina é responsável pela diminuição da atividade cerebral, uma vez que a cafeína se liga aos seus receptores, impede a diminuição desta atividade mantendo o cérebro em constante funcionamento.

Os principais parâmetros avaliados na presente pesquisa foi o efeito das substâncias teste no tecido ósseo, tanto na sua microarquitetura, quanto na resistência óssea. Autores como Garcia-Contreras et al. (2000), Kristensen et al.

(2005), Hallstrom et al. (2006), Tsuang et al. (2006), Tucker et al. (2006), Ogur et al. (2007), Libuda et al. (2008), Teófilo et al. (2010), Lacerda et al. (2010) e Liu et al. (2011) desenvolveram estudos onde buscaram observar a relação da ingestão de bebidas a base de refrigerantes de cola, cafeína e seus derivados com o tecido ósseo, principalmente no que diz respeito à densidade mineral óssea e resistência óssea. Em todos esses estudos, sejam eles em modelos animais ou estudos observacionais em diversas populações, foram utilizados como método de avaliação da estrutura óssea exames por dupla absorção de Raios X – DEXA, análises bioquímicas de componentes do sangue e urina, e análises histológicas. Muller et al. (1998) desenvolveram um estudo morfométrico onde compararam cortes histológicos e a microtomografia computadorizada na análise da microarquitetura óssea. A partir dos resultados encontrados os autores garantiram à microtomografia computadorizada potencial para análise da microarquitetura óssea, sendo este um exame não invasivo, rápido e de alta precisão. Também Tjong et al. (2012) quando compararam a tomografia computadorizada periférica de alta resolução e a microtomografia computadorizada observaram que a primeira somente é eficaz quando é utilizado o menor voxel possível e que portanto, a microtomografia computadorizada corresponde ao padrão ouro para a análise da microarquitetura óssea. Os estudos de Klintstrom et al (2013) e de Hsu et al (2013) também citam ser a microtomografia computadorizada padrão ouro para a avaliação da microarquitetura óssea.

O presente trabalho buscou apresentar nova metodologia de avaliação da estrutura óssea, utilizando a microtomografia computadorizada, a fim de se conhecer as reais alterações que acometem a microarquitetura óssea em animais que receberam dieta a base de refrigerantes de cola, guaraná e café.

Ao analisarem-se os resultados apresentados pela microtomografia computadorizada, observou-se aumento no valor de alguns parâmetros como: volume de tecido e volume ósseo para os grupos com dieta a base de refrigerante de cola em ambos os gêneros; além de aumento na superfície de tecido no grupo

cola para as fêmeas e da superfície óssea nos grupos cola, guaraná e café também nos grupos de fêmeas. O aumento de volume e superfície de osso e tecido pode ser explicado baseado no estudo de Cadore et al. (2005) onde descreveram o impacto da atividade física sobre a densidade mineral óssea, sendo a atividade física responsável pelo aumento da massa óssea. Nos grupos experimentais do presente estudo, um dos fatores observados, como já descrito, foi o aumento da atividade motora dos animais, sendo esta atividade motora, um fator a ser considerado como atividade física e por conseqüente, pode ser responsável pelo aumento nos parâmetros analisados, fato que não representa a qualidade, apenas o ganho estrutural, uma vez que ao analisar-se a resistência óssea, observou-se redução estatisticamente significativa desta nos grupos de fêmeas que receberam as dietas a base de refrigerante de cola e café, com redução também para o grupo guaraná, apesar de não ter sido estatisticamente significativa. Deve-se ressaltar que a resistência óssea não está associada ao volume do osso e sim à qualidade deste tecido. Sendo assim, apesar de ter-se um aumento no volume ósseo não se podia esperar que houvesse também um aumento na resistência óssea.

Analisando-se somente superfície óssea entre os dois gêneros, observa-se diferença estatística entre estes, em que as fêmeas apresentaram menor média. A superfície óssea está relacionada com a atividade dos osteoclastos e osteoblastos e esta relação pode ser alterada por fatores hormonais, em que as fêmeas são mais susceptíveis a alterações que os machos, conforme citam Theill et al. (2002) e também Lacerda et al. (2010). O mesmo raciocínio pode ser seguido para o número e separação de trabéculas.

Ainda em relação às análises obtidas por meio da microtomografia computadorizada, foi possível observar no grupo que recebeu a administração de café, em ambos os gêneros, redução do número de trabéculas e redução da espessura das mesmas, porém com diferenças estatísticas apenas para o grupo das fêmeas. Esse dado corrobora com os dados do teste de resistência mecânica,

onde o grupo de fêmeas que recebeu administração de café obteve o menor valor de resistência óssea, aumentando significativamente o risco de fraturas ósseas. O consumo da substância à base de café também é citada por Hallstrom et al. (2006) e Tsuang et al. (2006), como potenciais substâncias que em elevado consumo aumenta o risco à fratura. Liu et al. (2011) citam que a cafeína aumenta a diferenciação de células da medula óssea em osteoclastos, células cuja função é absorver tecido ósseo, como relatam Robinson et al. (1997). Se nos reportarmos para o consumo das substâncias teste, nota-se que dentre as três substâncias, o café apresentou a menor média e mesmo assim, o seu consumo causou danos significantes em relação ao número e espessura de trabéculas e na resistência, todos esses parâmetros nas fêmeas. Também foi observada nos machos a redução nesses parâmetros, mas não significativa. Podemos, portanto, supor que se os animais apresentassem um consumo de café semelhante aos refrigerantes à base de cola e guaraná, os efeitos seriam mais substanciais ainda.

O risco aumentado para fraturas ósseas também foi observado no grupo de fêmeas que recebeu a dieta a base de refrigerante de cola, tendo valores com diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle. Esse risco também foi observado nos machos, embora sem diferença estatística. Esses resultados estão de acordo com os achados de Garcia-Contrerar et al. (2000); Heaney & Fafferty (2001); Kinney (2002); e Teófilo et al. (2010), que citam ser o elevado consumo de refrigerantes à base de cola, um dos fatores para o aumento de risco de fratura.

Em síntese, dentro das condições experimentais utilizadas, a administração de uma dieta a base de café e refrigerantes de cola e guaraná pode causar na microarquitetura óssea de fêmures em ratos de ambos os gêneros. Devido à ausência de estudos na literatura nesta linha de pesquisa, tendo a microtomografia como método de avaliação, faz-se necessário o desenvolvimento de novos trabalhos a fim de aprimorar o conhecimento sobre as alterações ósseas em decorrência desses processos e a consolidação dos parâmetros de análise.

## **7 CONCLUSÃO**

A ingestão das substâncias avaliadas causou alteração na microarquitetura óssea; além disso, a ingestão de café e de refrigerante à base de cola aumentou o risco à fratura óssea nas fêmeas.

## REFERÊNCIAS\*

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast in vivo. *Bone*. 1996; 19(1): 35-40.

Boyd SK, Davison P, Müller R, Gasser J a. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone*. 2006; 39(4): 854–62.

Cadore EL, Arias M, Fernando L, Krueel M. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(51): 373–9.

Celec P, Behuliak M. Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. *J Psychopharmacol*. 2010; 24(10): 1569–72.

Caliri A, De Filippis L, Bagnato GL, Bagnato GF. Osteoporotic fractures: mortality and quality of life. *Panminerva Med*. 2007; 49(1): 21-7.

Cooper D, Turinsky A, Sensen C, Hallgrimsson B. Effect of voxel size on 3D micro-CT analysis of cortical bone porosity. *Calcif Int Tissue*. 2007; 80(3): 211–9.

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

de Oliveira RCG, Leles CR, Lindh C, Ribeiro-Rotta RF. Bone tissue microarchitectural characteristics at dental implant sites. Part 1: identification of clinical-related parameters. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(8): 981–6.

Derks P, Nigg AL, Bosman FT et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone.* 1998; 22(4): 367-73

El Khassawna T, Böcker W, Govindarajan P, Schliefer N, Hürter B, Kampschulte M, et al. Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PloS One.* 2013; 8(8): e71665.

García-Contreras F, Paniagua R, Avila-Díaz M, Cabrera-Muñoz L, Martínez-Muñiz I, Foyo-Niembro E, et al. Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Arch Med Res.* 2000; 31(4): 360–5.

Hallström H, Wolk a, Glynn a, Michaëlsson K. Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women. *Osteoporos Int.* 2006; 17(7): 1055–64.

Heaney RP, Rafferty K. Carbonated beverages and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(3): 343–7.

Hsu J-T, Wang S-P, Huang H-L, Chen Y-J, Wu J, Tsai M-T. The assessment of trabecular bone parameters and cortical bone strength: a comparison of micro-CT and dental cone-beam CT. *J Biomech.* 2013; 46(15): 2611–8.

Jha RM, Mithal A, Malhotra N, Brown EM. BioMed Central Pilot case-control investigation of risk factors for hip fractures in the urban Indian population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010; 14(11): 49-55.

Kinney M. Does consumption of cola beverages cause bone fractures in children? *Mayo Clin Proc.* 2002; 77(3): 1005–6.

Klintström E, Smedby O, Moreno R, Brismar TB. Trabecular bone structure parameters from 3D image processing of clinical multi-slice and cone-beam computed tomography data. *Skeletal Radiol.* 2013; 43(2): 197–204.

Kristensen M, Jensen M, Kudsk J, Henriksen M, Mølgaard C. Short-term effects on bone turnover of replacing milk with cola beverages: a 10-day interventional study in young men. *Osteoporos Int.* 2005; 16(12): 1803–8.

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(3): 199–204.

Libuda L, Alexy U, Remer T, Stehle P, Schoenau E, Kersting M. Association between long-term consumption of soft drinks and variables of bone modeling and remodeling in a sample of healthy. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(6):1670–7.

Liu SH, Chen C, Yang R Sen, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res.* 2011; 29(6): 954–60.

Muller R, Campenhout H VAN, Damme B VAN, Perre G VAN DER, Dequeker J, Hildebrand, et al. Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies : A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections. *Bone.* 1998; 23(1): 59–66.

Odgren PR, Kim N, van Wesenbeeck L et al. Evidence that the rat osteopetrotic mutation toothless (tl) is not in the TNFSF11 (Trance, Rankl, ODF, OPGL) gene. *Int J Dev Biol.* 2001; 45(8): 853-9.

Ogur R, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, et al. Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100(5): 334–8.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature,

symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(6): 595-610.

Perilli E, Briggs AM, Kantor S, Codrington J, Wark JD, Parkinson IH, et al. Failure strength of human vertebrae: Prediction using bone mineral density measured by DXA and bone volume by micro-CT. *Bone.* 2012; 50(6): 1416–25.

Sarazin M, Alexandre C, Thomas T. Influence on bone metabolism of dietary trace elements, protein, fat, carbohydrates, and vitamins. *Joint Bone Spine.* 2000; 67(5): 408-418.

Teófilo JM, Leonel DV, Lamano T. Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res.* 2010; 24(2): 177–81.

Tjong W, Kazakia GJ, Burghardt AJ, Majumdar S. The effect of voxel size on high-resolution peripheral computed tomography measurements of trabecular and cortical bone microstructure. *Med Phys.* 2012; 39(4): 1893–903.

Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84(4): 936–42.

Tsuang Y-H, Sun J-S, Chen L-T, Sun SC-K, Chen S-C. 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.

Turner CH. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. *Bone.* 1991; 12(3): 203-7.

Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. Rank-L and Rank:T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20(1): 795-823.

Robinson JA, Harris SA, Riggs BL et al. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology.* 1997; 138(7): 2919-27.

ANEXO



UNICAMP

CEUA/Unicamp

---

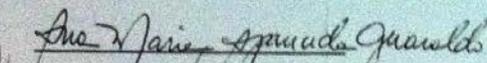
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

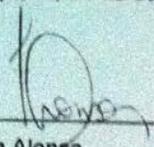
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da qualidade óssea em ratos submetidos à dieta diária com café e refrigerantes à base de cola e guaraná" (protocolo nº 2458-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Plauto Christopher Aranha Watanabe / Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho / Maria Beatriz Carrazzone Cal Alonso / Amaro Ilídio Vespasiano Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de junho de 2011.

Campinas, 05 de outubro de 2011.  
2ª VIA

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6369  
E-mail: [comsib@unicamp.br](mailto:comsib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>