

EFEITOS *IN VITRO* DA CAFEÍNA NA CARTILAGEM DE CRESCIMENTO DE RATOS

IN VITRO EFFECTS OF CAFFEINE IN GROWTH CARTILAGE OF RATS

AMANDA MARIA SENA REIS¹, RAQUEL VIANA RAAD¹, NATÁLIA DE MELO OCARINO¹, ROGÉRIA SERAKIDES¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos *in vitro* da cafeína na proliferação, apoptose e expressão de transcritos gênicos de diferenciação condrogênica na cartilagem de crescimento. **Método:** As epífises cartilaginosas de fêmures de ratos neonatos foram divididas em dois subgrupos: os tratados com cafeína e o grupo controle, ambos observados nos tempos de 0, 7, 14 e 21 dias. As epífises cartilaginosas de fêmures de cada subgrupo e de cada tempo foram submetidas à histomorfometria, análise imunohistoquímica, técnica de túnel e RT-PCR em tempo real. **Resultado:** A diminuição da atividade proliferativa e o aumento de condroblastos em apoptose aos 21 dias foram encontrados em ambos os subgrupos. Entretanto a diminuição da proliferação celular causada pela cafeína foi menor quando comparada ao grupo controle e aumentou significativamente a expressão de transcritos gênicos para diferenciação condrogênica, representada pelo SOX-9 e pelo RUNX-2. Entretanto o cultivo *in vitro* com cafeína demonstrou efeitos antagônicos: apesar dos efeitos positivos na proliferação e diferenciação de condroblastos, cafeína aumentou a apoptose, caracterizada pelo aumento da expressão de caspase-3 e do número de células em apoptose ($p < 0.05$). **Conclusão:** A cafeína apresenta efeitos antagônicos *in vitro* na cartilagem em crescimento, aumentando a proliferação, diferenciação e apoptose celular. **Estudo experimental.**

Descritores: Cafeína. Cartilagem. Proliferação de células. Diferenciação celular. Apoptose.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the *in vitro* effects of caffeine on proliferation, apoptosis and gene transcripts expression of chondrogenic differentiation in growth cartilage. **Methods:** The cartilaginous epiphyses of femurs of newborn rats, were divided into two subgroups: treated with caffeine and control group, both observed over the time periods of 0, 7, 14 and 21 days. The cartilaginous epiphyses of femurs of each subgroup and each time span were subjected to histomorphometrics, immunohistochemical analysis, tunnel technique and RT-PCR in real time. **Results:** The decrease in proliferative activity and the increase of apoptotic chondroblasts at 21 days were found regardless of the subgroup. However, the decrease in cell proliferation caused by caffeine was lower than in the control group and significantly increased the expression of gene transcripts for chondrogenic differentiation, represented by SOX-9 and RUNX-2. However, the *in vitro* culture with caffeine revealed antagonistic effects: despite the positive effect on chondroblasts proliferation and differentiation, caffeine increased apoptosis, characterized by increased expression of caspase-3 and of the number of cells undergoing apoptosis ($p < 0.05$). **Conclusion:** Caffeine presents antagonistic effects *in vitro* on growth cartilage, increasing the proliferation, differentiation and cell apoptosis. **Experimental Study.**

Keywords: Caffeine. Cartilage. Cell proliferation. Cell differentiation. Apoptosis.

Citação: Reis AMS, Raad RV, Ocarino NM, Serakides R. Efeitos *in vitro* da cafeína na cartilagem em crescimento de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):307-9. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Reis AMS, Raad RV, Ocarino NM, Serakides R. *In vitro* effects of caffeine in growth cartilage of rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):307-9. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A cafeína é uma metilxantina encontrada em diversos alimentos, sendo amplamente consumida pela população humana. Por isso, vários dos seus efeitos e mecanismos têm sido amplamente estudados em diversos tecidos. Mas, apesar de alterar o crescimento ósseo pós-natal, há poucos estudos sobre seu efeito nas cartilagens de crescimento. No osteoblasto, a cafeína atua negativamente, reduzindo a viabilidade celular e aumentando a apoptose dessa célula, além de diminuir a síntese protéica e a expressão de genes como o colágeno, fosfatase alcalina, osteo-

calcina, osteopontina, histona e CBFA1/RUNX2.¹⁻⁴ Devido a esses efeitos no osso, a cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose e para a doença periodontal.⁵ No entanto, embora, existam vários estudos que analisaram os efeitos *in vitro* desse xantina sobre as células ósseas, ainda há carência de informações sobre os efeitos *in vitro* da cafeína nas células cartilaginosas de indivíduos em crescimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos *in vitro* da cafeína sobre a proliferação, apoptose e expressão de transcritos gênicos da diferenciação condrogênica na cartilagem de crescimento.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Trabalho realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Correspondência: Rogéria Serakides. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Avenida Antônio Carlos, 6627 - São Francisco, 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil. serakidesufmg@gmail.com

Artigo recebido em 26/11/2012, aprovado em 08/08/2013.

Acta Ortop Bras. 2013;21(6):307-9

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as epífises cartilaginosas de 80 fêmures de ratos Wistar neonatos, que foram divididas em dois grupos, ou seja, cultivado com cafeína na dose de 2 mMol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e controle nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias. As epífises cartilaginosas de quatro fêmures de cada grupo e de cada tempo foram submetidas ao exame histomorfométrico, imunohistoquímico para avaliação da proliferação celular e da técnica de túnel, para avaliação da apoptose. As epífises cartilaginosas de seis fêmures foram submetidas aos ensaios de RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão de caspase-3, Forward 5' TGGAG GAG GC TGACCGG-CAA'3 e reverse 5' CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT'3; Runx-2, Forward 5' GCGT CAACA CCATCATTCTG'3 e reverse 5' CAGAC-CAGCAGCACTCCATC'3; e Sox-9, Forward 5' CCCGATCTGAAGA-AGGAGAGC'3 e reverse 5' GTTCTTACC GA C TTCCTCCG'3. O delineamento foi fatorial (2X4), ou seja, dois grupos e quatro períodos. Para cada variável foi determinado a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo n 177-2010).

RESULTADOS

Tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com cafeína, a morfologia dos condroblastos foi semelhante durante a maior parte do período de cultivo. A porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur foi aumentando significativamente ao longo do tempo de cultivo. Já a porcentagem de lacunas de condroblastos com núcleos picnóticos aumentou no dia sete de cultivo, mantendo-se assim até os 21 dias de cultura em comparação ao dia zero. No entanto, aos 21 dias de cultivo o grupo tratado com cafeína apresentou número de lacunas vazias de condroblastos significativamente menor em comparação ao grupo controle. (Tabelas 1 e 2, Figura 1)

No grupo controle, a taxa de proliferação celular, caracterizada pela expressão de CDC-47, reduziu significativamente ao longo de todo o período de cultivo em comparação ao dia 0. No grupo tratado com cafeína, a taxa de proliferação celular também reduziu significativamente aos sete dias em comparação ao dia zero, mas manteve-se assim até os 21 dias de cultivo, ao contrário do grupo controle que apresentou uma queda progressiva da proliferação celular. Aos 21 dias, apesar da expressão de CDC-47 ser maior no grupo tratado com cafeína, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos períodos. (Tabela 3 e Figura 2)

Tabela 1. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	6,26±6,61C a	13,37±11,0C a	36,8±11,7 B a	50,7±15,56 A a
Cafeína	6,26±6,61C a	28,5±9,57 B b	45,4±8,81A a	24,2±7,56B b

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ($P \geq 0,05$).

Tabela 2. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas de condroblastos com núcleo picnótico nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	9,40±4,036 B a	23,37±10,18 A a	19,25±5,47 A a	30,57±12,16 A a
Cafeína	9,40±4,036B a	17,4±10,32A a	24,71±7,95A a	28,7±13,12A a

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman-Keuls (SNK) ($P \geq 0,05$).

Tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado com cafeína, o número de corpos apoptóticos aumentou significativamente durante todo o período de cultivo. No entanto, aos sete e 21 dias de cultivo a apoptose foi mais intensa nas epífises cartilaginosas cultivadas com cafeína. (Tabela 4 e Figura 3)

Semelhante ao número de corpos apoptóticos, a expressão de caspase 3 também aumentou significativamente em ambos os grupos aos 21 dias de cultivo em comparação ao dia 0. No entanto, aos 21 dias, a expressão do transcripto gênico para caspase 3 foi significativamente maior no grupo tratado com cafeína em comparação ao grupo controle neste mesmo período. (Tabela 5) Somente no grupo tratado com cafeína, a expressão de SOX-9 aumentou significativamente aos 21 dias de cultivo em comparação ao dia zero, sendo também maior em comparação ao grupo controle aos 21 dias de cultivo. (Tabela 5) A expressão de RUNX-2 reduziu significativamente no grupo controle aos 21 dias de cultivo, em comparação ao dia zero. Mas, no grupo tratado com cafeína, a expressão de Runx-2, aos 21 dias, não diferiu em relação ao dia zero, mas foi significativamente superior a do grupo controle. (Tabela 5)

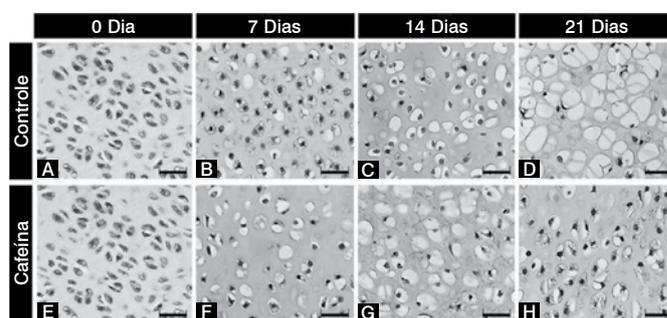


Figura 1. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivada em meio com ou sem cafeína (controle). HE, Bar = 23, 64 μ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente.

Tabela 3. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de condroblastos com expressão de CDC-47 nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	384,62±28,15 A a	245,4±82,4B a	267,87±46,7 B a	162±37,86 C a
Cafeína	384,62±28,1A a	283,7±98,8B a	248,5±57,64B a	228,6±65,16B a

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ($P \geq 0,05$).

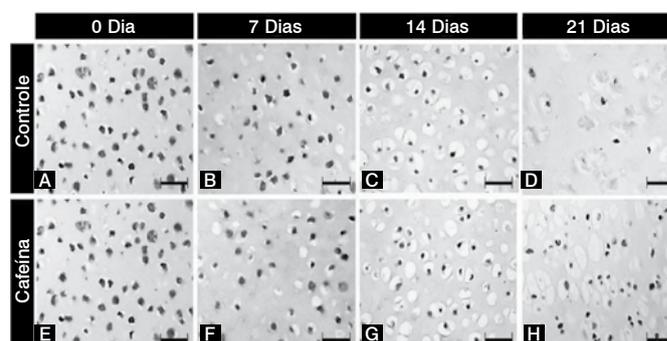


Figura 2. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivada em meio com ou sem cafeína (controle). Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracoloração pelo *Metil green*. Expressão nuclear de CDC-47. Bar = 23, 64 μ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente.

Tabela 4. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de condroblastos apoptóticos/campo marcado pela técnica de túnel nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	20,6±8,12 D a	95,18±21,32 C b	198,33±61,34B a	262,95±54,28 A b
Cafeína	20,6±8,12 D a	171,71±59,39 C a	224,51±36,623 B a	360,55±54,49A a

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ($P \geq 0,05$).

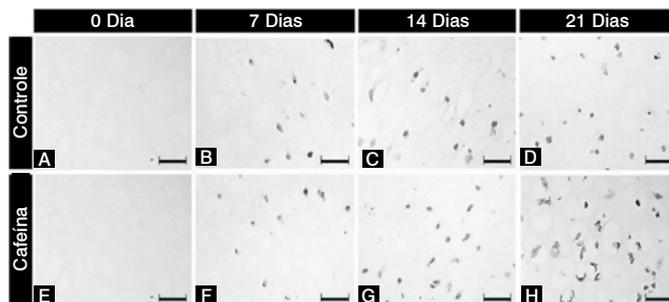


Figura 3. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivada em meio com ou sem cafeína (controle). Técnica de túnel, contra-coloração pelo metil green. Bar = 23, 64 µm. (A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. (E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente.

Tabela 5. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da expressão de transcriptos gênicos para caspase-3, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle) no dia zero e aos 21 dias de cultivo.

Transcriptos Gênicos	Controle Dia 0	Controle 21 dias	Cafeína 21 dias
Caspase	0,804±0,09 B	2,04±1,34 B	4,22±2,09 A
Sox-9	1,45±1,58 B	2,72±1,22 B	8,35±3,36 A
Runx-2	0,87±0,29A	0,35±0,11B	0,73±0,22 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ($P \geq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *J Bone Miner Res.* 1991;6(10):1029-36.
- Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res.* 2006;1:7.
- Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2008;9(5):698-718.
- Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Br J Pharmacol.* 2010; 161(7):1542-52.
- Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). *J Periodontol.* 1999;70(3):283-8.

DISCUSSÃO

O presente experimento teve como objetivo verificar mais profundamente os mecanismos de ação *in vitro* da cafeína sobre o tecido cartilaginoso. Mas, os resultados demonstraram em parte um efeito diferente aos observados *in vivo*, uma vez que as epífises cartilaginosas tratadas com cafeína apresentaram maior viabilidade celular e maior expressão de fatores da diferenciação condrogênica. Mas, por outro lado a cafeína também resultou em aumento da apoptose com maior número de condroblastos apoptóticos e maior expressão do transcripto gênico para caspase 3. Pode ser que esse efeito apoptótico da cafeína sobre as células cartilaginosas *in vitro* seja a razão pela qual observa-se morte celular *in vivo* nas cartilagens de crescimento tanto de neonatos quanto de filhotes após o desmame.⁶ Porém *in vitro*, foi observado um efeito antagônico, onde a cafeína aumentou o número de células apoptóticas e a expressão do transcripto para caspase-3, mas também manteve as células em proliferação e viáveis por mais tempo com aumento dos transcriptos gênicos da diferenciação celular, representados pelo SOX-9 e pelo RUNX-2. Esses resultados mostram que os efeitos da cafeína *in vitro* podem ser diferentes dos efeitos *in vivo*. Mas, os efeitos antagônicos da cafeína parecem também ocorrer em folículos pilosos. Enquanto que a cafeína *in vitro* estimula o crescimento de folículos pilosos humanos⁷ e tem sido adicionada ao tratamento local da calvície,⁸ filhotes de ratos tratadas com cafeína apresentam alopecia decorrente da menor atividade proliferativa das células do folículo piloso.⁹ Essa diferença nos resultados pode ser explicada, uma vez que *in vitro* o modelo experimental é simplificado, e não é possível reproduzir um ambiente com todos os fatores e moléculas de sinalização que agem *in vivo*. Embora, existam vários estudos que analisaram os efeitos *in vitro* da cafeína sobre as células ósseas,^{4,5} o efeito da cafeína no modelo aqui utilizado parece ter sido a primeira tentativa de se estudar os efeitos *in vitro* dessa metilxantina nas células cartilaginosas de indivíduos em crescimento.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a cafeína *in vitro* apresenta efeitos antagônicos sobre o tecido cartilaginoso, aumentando a apoptose, mas ao mesmo tempo, aumentando a viabilidade celular, impedindo a queda do índice proliferativo e aumentando a expressão de transcriptos gênicos da diferenciação celular representados pelo SOX-9 e pelo RUNX-2.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e CNPq pelo apoio financeiro concedido ao projeto.