

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE CÁRIE EM MOLARES DE RATOS
UTILIZANDO-SE DE UMA DIETA FORMULADA (NAN 2), COMPARADA À DIETA
CASEÍNA, COM E SEM ADIÇÃO DE SACAROSE NA PRESENÇA DE ÁGUA
FLUORETADA**

*EVALUATION OF PREVALENCE OF DECAY IN MOLARS OF MICE BEING USED OF A
FORMULATED DIET (NAN 2), COMPARED TO THE DIET CASEIN, WITH AND WITHOUT
ADDITION OF SUCROSE IN WATER FLUORETADA'S PRESENCE*

Ana Luisa Gomes COELHO¹
José Thadeu PINHEIRO²
Geraldo Bosco Lindoso COUTO³
Kátia Virgínia Guerra BOTELHO⁴
Maria do Carmo MEDEIROS⁵
Carolina F. N. DUARTE⁶

Endereço para correspondência:
Rua: Capitão Aurélio de Araújo, 325, 503, Iputinga,
Recife-Pe. E-mail: analuisa.coelho@pop.com.br

1. Aluna da graduação do curso de Odontologia da UFPE
2. Prof. Titular de Endodontia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da UFPE
3. Professor Adjunto de Odontopediatria da UFPE
4. Doutoranda do curso de Nutrição
5. Prof. ^a Adjunto do Departamento de Nutrição da UFPE
6. Aluna da graduação do curso de Odontologia da UFPE

RESUMO

O objetivo deste experimento foi determinar a prevalência de cárie em molares de ratos machos de 21 dias, utilizando-se uma dieta formulada NAN 2 (NESTLÉ®) comparada à dieta padrão caseína, acrescida ou não de açúcar na presença de água fluoretada. Durante 60 dias, 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), ingeriram “ad libitum” as seguintes dietas: Grupo 1: dieta formulada NAN 2 com sacarose + água fluoretada (1ppm); grupo 2: dieta formulada NAN 2 sem sacarose + água fluoretada (1ppm); grupo 3: dieta padrão caseína a 14 % com sacarose + água fluoretada (1ppm); grupo 4: dieta padrão caseína a 14% sem sacarose + água fluoretada (1ppm). Após o período experimental os animais foram sacrificados e os molares de suas mandíbulas e maxilas foram seccionados; as peças coradas pelo reativo de Schiff e observadas ao microscópio estereoscópico com aumento de 12,5 vezes. Os resultados demonstraram que todas as dietas utilizadas foram cariogênicas, mas a dieta padrão caseína sem açúcar e água fluoretada (grupo 4) produziu um menor número de lesões tanto em quantidade como em profundidade. Concluindo-se, portanto, que as dietas utilizadas foram cariogênicas, e que existiu uma acentuada redução da prevalência e severidade de cárie neste experimento devido tanto à ação protetora da caseína, bem como a utilização do flúor na água consumida pelos animais.

UNITERMOS: Cárie. Dieta. Flúor

ABSTRACT

This experiment's aim was to determine the decay prevalence in molars of a 21 days male rat, using a formulated diet NAN 2 (NESTLÉ®) compared to the standard casein diet, added or not to sugar in the presence of fluorinated water. For 60 days, 20 rats (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) ingested "ad libitum" the following diets: group 1: formulated diet NAN 2 with sucrose + fluorinated water (1ppm); group 2: formulated diet NAN 2 without sucrose + fluorinated water (1ppm); group 3: a 14% standard casein diet with sucrose + fluorinated water (1ppm); group 4: a 14% standard casein diet without sucrose + fluorinated water (1ppm). After the experimental period the animals were sacrificed and the molars of their jaws and jawbones were parted; the pieces were reddened by the Schiff reagent and observed by the stereoscopic microscope with a 12,5 times increase. The results demonstrated that all the used diets were cariogenic, but the standard casein diet without sugar and fluorinated water (group 4) produced a lesser number of lesions as in the amount as in the depth. Therefore, it was observed that the used diets were cariogenic, and that happened an accurate reduction of the decay prevalence and severity in this experiment because of the protecting action of the casein, as well as the use of the fluorine in the water consumed by the animals.

UNITERMS: Tooth decay. Diet. Fluorine

INTRODUÇÃO

Em uma pesquisa com ratos, foi estudada a influência da macromolécula de caseína do leite sobre a incidência de cáries e a possível mudança da microbiota oral. Dietas contendo micelas de caseína tinham um pronunciado efeito também em toda clínica e nos parâmetros microbiológicos examinados. As formações de avanço na dentina e em superfícies lisas, ambas lesões de cárie, foram inibidas por dietas contendo micelas de caseína; este efeito cárie inibidor parece ser devido principalmente a modificações dentro da microbiota da placa bacteriana. Esta modificação da composição da microbiota da placa dental em ratos é um caminho para reduzir essa patologia em potencial (GUGGENHEIM *et al.*, 1999).

O leite bovino possui alguns componentes como lipídios e enzimas antibacterianas que apresentam potencial cariostático, bem como fosfoproteínas, em destaque a caseína, que são fortemente adsorvidas no esmalte *in vitro* e aparentemente apresentam capacidade de prevenir a dissolução do esmalte bovino *in situ* (DUARTE, M. P.; COPPI, L. C.; ROSALEM, 2000).

A caseína fosfopeptídeo estabiliza o fosfato de cálcio amorfo e pode ser usado para localizar este fosfato de cálcio na placa dental, mantendo um estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário, reduzindo sua desmineralização e aumentando a remineralização. A ligação caseína fosfopeptídeo - fosfato de cálcio amorfo à placa, irá promover um grande reservatório de cálcio dentro da placa e isto retardará a difusão do cálcio livre. Assim, deverá haver uma menor perda de minerais durante o episódio cariogênico, fornecendo uma fonte potente de cálcio para subsequente remineralização. Uma vez na placa, a ligação caseína fosfopeptídeo-fosfato de cálcio amorfo restringirá o processo de cárie (ROSE, 2000).

A fosfoproteína caseína é absorvida sobre a superfície do esmalte e pode impedir a desmineralização. Enzimas do leite podem ter um papel na redução do crescimento da placa bacteriana acidogênica. Há um consenso que o leite e produtos do leite sem adição de açúcar possibilitem benefícios para o dente. Um estudo com ratos mostrou um aumento na cariogenicidade com adição de somente 2% de açúcar ao leite e em estudo da placa intra-oral aumentou a produção de ácido da placa com 5% de açúcar no leite (LEVINE, 2001).

Foi realizada uma pesquisa com 24 ratos da linhagem *Wistar*, com o objetivo de avaliar a prevalência de cárie em molares. Os animais receberam as seguintes dietas: grupo a - dieta labina (ração confeccionada pela Purina®) e água destilada e o grupo b - dieta caseína (ração confeccionada pela Rhoster®) e água destilada. Os pesquisadores concluíram que a dieta labina quando comparada à caseína apresentou diferença significativa nos animais quanto à presença de cárie, porém a dieta caseína

mostrou-se menos cariogênica que a dieta labina, confirmando seu efeito protetor (SILVA; COUTO, 2003).

Os fatores apontados como prováveis responsáveis pelo declínio na prevalência de cárie no Brasil são: o aumento e a universalização da exposição das pessoas ao flúor em suas variadas formas de aplicação, com destaque especial para água de abastecimento e os dentifícios fluoretados (NARVAI; CASTELLANOS; FRAZÃO, 2000; OLIVEIRA, 1998; WINTER, 1990).

A fluoretação da água de abastecimento público tem sido reconhecida mundialmente, já que os benefícios de redução da cárie superam os riscos de fluorose dental, seu único efeito colateral (MENEZES *et al.*, 2002).

Sabe-se que o flúor é essencial no processo de remineralização do esmalte, contribuindo para uma diminuição na prevalência de cárie, quando utilizados animais de laboratório consumindo dieta cariogênica e água contendo flúor. Assim, o uso do flúor como medida preventiva deve estar associado a um processo educativo de necessidade individual em relação à dieta (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

As evidências suportam que a condição clínica conhecida como cárie dentária, usualmente entendida como as cavidades existentes nos dentes, é uma doença infecciosa oportunista, com caráter multifatorial, influenciada pelos carboidratos da dieta e pelos componentes salivares (BARATIERI *et al.*, 2001).

Um aumento na concentração de sacarose na dieta reduz a formação de dentina e aumenta a extensão da cárie de dentina, como também o número e severidade das lesões de cárie. Foi visto que a alimentação com 43% de sacarose na dieta resultou numa significativa redução na formação de dentina. O número e severidade das lesões de cárie claramente aumentaram, quando a concentração da sacarose da dieta foi aumentada (HUUMONEN; TJADERHANE; LARMAS, 1997).

Fórmulas infantis são usadas como suplementação nutricional para bebês e crianças. Estudos têm mostrado que essas fórmulas infantis são acidogênicas, induzem aumento de bactérias e dissolvem o mineral do esmalte (ERIKSON *et al.*, 1998).

Algumas fórmulas infantis foram usadas como suplemento nutritivo para bebês e crianças. Os estudos recentes mostraram que as fórmulas infantis são acidogênicas. Embora os resultados de muitos estudos focalizassem no papel protetor do leite de bovídeos no desenvolvimento da cárie, uma pesquisa adicional é necessária para compreender inteiramente o relacionamento entre as fórmulas e a deterioração de dentes infantis da boca do bebê (ROSALEN, 2001).

Em sua pesquisa para avaliar o potencial cariogênico de fórmulas infantis e do leite bovino, Peres *et al.* (2002) utilizaram 60 ratas *wistar* infectadas com *Streptococcus sobrinus* e dessalivadas e dividiram em 6 grupos os quais receberam *ad libitum*: 1) água

destilada e esterilizada (ADE) com 5% de sacarose; 2) leite bovino tipo A; 3) NAN 2â, 49 Nestogeno 2â; 5) Ninho coadjuvante de crescimento e 6) ADE. Eles observaram que o leite bovino não apresentou cariogenicidade e as fórmulas infantis tinham potencial cariogênico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) do sexo masculino, com 21 (vinte um) dias de idade. Estes animais foram divididos ao acaso em 4 (quatro) grupos, os quais receberam, durante 60 (sessenta) dias os seguintes tratamentos: grupo 1: 10 (dez) ratos, dieta formulada NAN 2 com sacarose + água fluoretada; grupo 2: 10 (dez) ratos, dieta formulada NAN 2 sem sacarose + água fluoretada; grupo 3: 10 (dez) ratos, dieta padrão caseína a 14% com sacarose + água fluoretada; grupo 4 (quatro): 10 (dez) ratos, dieta padrão com caseína a 14% sem sacarose + água fluoretada.

Os passos da seqüência experimental foram realizados no laboratório integral de pesquisa de Mestrado em Odontologia da UFPE. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais sob os cuidados do funcionário responsável pela sua alimentação e troca de água. A fonte protéica da dieta padrão foi a caseína comercial a 14%. Já alimentação do grupo experimental consistiu na dieta formulada NAN 2 com a mesma composição qualitativa do leite NAN 2 (NESTLE®) para o rato em crescimento em todos os seus macro e micro nutrientes, segundo as recomendações da AIN-93. Foram confeccionadas fichas para a anotação do peso dos animais e etiquetas para identificação das gaiolas. A pesagem dos animais foi realizada semanalmente durante os 60 dias do experimento, bem como foi registrado o consumo hídrico de cada animal.

Após 60 dias, os ratos foram submetidos ao sacrifício utilizando-se o medicamento Tiopental sódico (Thiopentax – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos) na dose de 50mg/kg de peso do animal. Depois de sacrificados, os seguimentos ósseos mandibulares e maxilares foram retirados, dissecados para posterior fixação das peças.

Os molares de cada hemi mandíbula e hemi maxila foram seccionados no plano sagital mesio-distal. Uma vez cortadas, as peças foram coradas pelo reativo de Schiff para posterior leitura das cáries dos molares, através de microscópio estereoscópico com aumento de 12,5 vezes, sendo anotadas em fichas padronizadas. De acordo com a profundidade das lesões, a cárie foi classificada em: E- cárie somente em esmalte, DS- cárie em dentina superficial, DP- cárie em dentina profunda.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis e quando

significante empregado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para comparar as proporções de cáries nos grupos considerando-se a ocorrência de cárie nos elementos e tecidos dentários. Os testes foram bilaterais, levando-se em consideração o nível de significância de 5 % de confiabilidade.

RESULTADOS

O resultado do teste de Kruskal-Wallis (Tabela 1) indica que as dietas exerceram influência diferenciada sobre a profundidade alcançada pela cárie, ($p < 0,001$). No quadro 1, um maior posto médio está associado a um maior poder cariogênico.

Tabela 1. Distribuição da profundidade da cárie, de acordo com a dieta:

Dieta	Camadas de tecido dentário									
	DH		E		DS		DP		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	52	43,4	25	20,8	36	30,0	7	5,8	120	100,0
2	64	53,4	33	27,5	22	18,3	1	0,8	120	100,0
3	107	89,2	10	8,3	3	2,5	-	-	120	100,0
4	110	91,7	9	7,5	1	0,8	-	-	120	100,0
Total	333	69,4	77	16,0	62	12,9	8	1,7	480	100,0

DH = dente hígido; E = esmalte; DS = dentina superficial; DP = dentina profunda.

Notas referentes a tabela 1:

Dieta 1= NAN 2 com sacarose e água fluoretada

Dieta 2= NAN 2 sem sacarose e água fluoretada

Dieta 3= Caseína com sacarose e água fluoretada

Dieta 4= Caseína sem sacarose e água fluoretada

Quadro 1. Classificação das dietas, segundo a ordem crescente de seus respectivos postos médios:

Dietas	4	3	2	1
Posto médio	184,7	190,9	276,3	310,1

O resultado do teste de comparações múltiplas de Dunn revela que as seguintes dietas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

As informações provenientes do teste de comparações múltiplas de Dunn e do quadro 1 permitem concluir que as dietas 1 (NAN 2 com sacarose + água fluoretada) e 2 (NAN 2 sem sacarose + água fluoretada) foram as mais cariogênicas, mas sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). A dieta 3 (dieta padrão caseína a 14 % com sacarose + água fluoretada) e 4 (dieta padrão

caseína a 14% sem sacarose + água fluoretada) foram menos cariogênicas, mas também sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). As dietas 1 (NAN 2 com sacarose + água fluoretada) e 2 (NAN 2 sem sacarose + água fluoretada) foram, cada um de per si, significativamente mais cariogênicas do que a dieta 3 (dieta padrão caseína a 14 % com sacarose + água fluoretada) e a dieta 4 (dieta padrão caseína a 14% sem sacarose + água fluoretada).

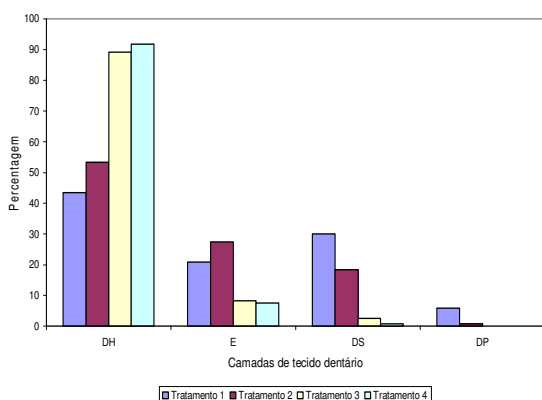


Gráfico 1: percentual dos tecidos afetados de acordo com a dieta.

DISCUSSÃO

Os efeitos inibidores da caseína, que pode agir modificando a composição da microbiota da placa bacteriana e impedir a adesão dessa placa aos dentes, também atua sobre o metabolismo do cálcio, auxiliando na sua adsorção sobre o esmalte, reduzindo assim sua desmineralização e promovendo sua remineralização, conforme afirmam Guggenheim *et al.* (1999); Duarte; Coppi; Rosalen, (2000); Rose, (2000); Levine, (2001) e Silva e Couto (2003) corroborando com os resultados encontrados neste experimento onde as dietas com caseína tiveram menor prevalência de cárie (Tabela 1).

Nesta pesquisa, os animais consumiam água fluoretada, Winter (1990); Oliveira (1998); Narvai; Castellanos; Frazão, (2000); Vasconcelos *et al.* (2001); Menezes *et al.* (2002) concordam que o flúor exerce um papel protetor sobre a estrutura dentária principalmente quando presente nos fluidos bucais em contato direto com o esmalte dos dentes, diminuindo assim a prevalência de cáries.

Huomonen; Tjaderhane; Larmas (1997); Baratieri *et al.* (2001) concordam que a sacarose é o principal substrato para a fermentação bacteriana e que um alto consumo de carboidratos é o principal causador da cárie dentária. Estas afirmações foram verificadas nos resultados do presente trabalho

conforme observado na tabela 1 onde as dietas com sacarose apresentaram maior quantidade de cárie e a dieta NAN 2 com sacarose + água fluoretada (grupo 1) apresentou maior quantidade e profundidade das lesões de cárie em dentina.

Os resultados mostraram que as dietas utilizadas são cariogênicas e, ao se analisar a profundidade de penetração da cárie para cada dieta a cárie em dentina, tanto superficial como profunda, mostra diferenças significativas entre os grupos sendo mais presente nas dietas NAN 2 com e sem sacarose confirmando o efeito indutor de fermentação bacteriana dos carboidratos, também presentes no leite formulado.

Os resultados desta pesquisa confirmaram os estudos que mostram que essas fórmulas infantis são acidogênicas, induzem aumento de bactérias e dissolvem o mineral do esmalte segundo Erikson *et al.* (1998); Rosalen (2001); Peres *et al.* (2002).

CONCLUSÕES

Após análises dos dados pode-se concluir que:

1. As dietas contendo caseína confirmaram seu efeito protetor em relação à prevalência de cárie quando comparada às outras dietas que apresentaram lesões profundas em dentina;
2. As dietas experimentais NAN 2 com e sem sacarose confirmam o efeito indutor de fermentação presente nestes leites, devido à grande presença de cárie em esmalte e dentina superficial encontrados neste experimento, com as respectivas dietas;
3. Os resultados mostram que é importante realizar programas de educação em saúde e de prevenção, alertando todas as pessoas que utilizam os leites formulados na alimentação de crianças e bebês, principalmente acrescidos de açúcar, para seu potencial cariogênico.

Apoio: PIBIC-CNPQ / UFPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 - Baratieri LN *et al.* Odontologia Restauradora: fundamentos e Possibilidades. São Paulo; Santos; p. 3-29, 2001.
- 2 - Duarte MP, Coppi LC, Rosalem PL. Cariogenicidade e propriedades cariostáticas por diferentes tipos de leite. Arch. Latinoam. Nutri. 2000; 50(2):113-120.
- 3 - Erikson PR, McClintock KL, Green N, LaFleur J. Estimation of the caries-related risk associated with infant formulas. Pediatr. Dent. 1998; 20:395-403.
- 4 - Guggenheim B, Schimid R, Aeschlimann JM, Berrocal R, Neeser JR. Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by Streptococcus sobrinus and dental caries in rats: a basis for the caries-protective effect of dairy products. Caries Res. 1999; 33(6):446-454.
- 5 - Huomonen S, Tjaderhane L, Larmas M. Greater concentration of dietary sucrose decreases dentin

formation and increases the area of dentinal caries in growing rats. J. Nutr. 1997; 127:226-230.

6 - Levine RS. Milk, flavoured milk products and caries. British Dental Journal 2001; 191(1):20.

7 - Menezes LMB, Sousa MLR, Rodrigues KA, Cury JA. Autopercepção da fluorose pela exposição a flúor pela água e dentifrício. Rev. Saúde Pública 2002; 36(6):1-5.

8 - Narvai PC, Castellanos RA, Frazão P. Prevalência de cárie em dentes permanentes de escolares do Município de São Paulo, SP, 1970-1996. Revista de Saúde Pública 2000; 34:196-200.

9 - Oliveira AGRC. Perfil Epidemiológico de saúde Bucal no Brasil 1986-1996. Disponível em URL: <http://www.angelonline.cjb.net>. 1998. (Setembro de 1998).

10 - Peres RCR, Coppi LC, Franco EM, Volpato MC, Groppo FC, Rosalen PL. Cariogenicidade de diferentes tipos de leite – Estudo experimental usando modelo animal. Braz. Dent. J. 2002; 13(1):27-32.

11 - Rosalen PL. Cariogenicidade dos Diferentes Tipos de Leite: Um Estudo Experimental Usando o Modelo Animal. 2001. Disponível em URL: <http://www.forp.usp.br> (2004 Mar 17).

12 - Rose RK. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. Arch Oral Biol. 2000; 45(7):569-575.

13 - Silva AH, Couto GBL. Análise comparativa da prevalência de cárie em molares de ratos utilizando-se uma dieta com caseína e uma dieta cariogênica. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco. CCS Odontologia, 2003. 59p.

14 - Vasconcelos MMVB, Medeiros MC, Bion FM, Pessoa DCNP. Cariogenicidade de dietas utilizadas em animais de experimentação (ratos). Anais Faculdade de Odontologia da UFPE 2001; 11(1-2): 69-73.

15 - Winter GB. Epidemiology of dental caries. Archives of Oral Biology 1990; 35(1):7.