

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANA PAULA DEL BORTOLO RUENIS

FARMACÊUTICA

EFEITO DA CAFEÍNA E TEOFILINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE DENTAL,
EM RATOS.

Dissertação apresentada a Faculdade
de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área de Farmacologia.

PIRACICABA – SP

1998

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

*Este exemplar foi
invidamente corrigido
conforme resolução
C.C.P.G-036/83
Piracicaba, 22 de setembro de 1998
Pedro L. R.*

ANA PAULA DEL BORTOLO RUENIS

FARMACÊUTICA

**EFEITO DA CAFEÍNA E TEOFILINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE DENTAL,
EM RATOS.**

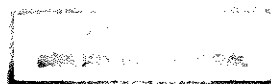
ORIENTADOR:

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN - FOP/UNICAMP

Dissertação apresentada a Faculdade
de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área de Farmacologia.

PIRACICABA - SP

1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
	R837e
V.	Ex
TOMBO	35735
PROC.	395/98
C	12
PREC.	R\$ 11,00
DATA	05/11/98
N.º CPD	

CM-0011B049-3

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

R837e Ruenis, Ana Paula del Bortolo.
 Efeito da cafeína e teofilina sobre o desenvolvimento de cárie dental, em ratos. / Ana Paula del Bortolo Ruenis. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.
 79f. : il.

Orientador : Pedro Luiz Rosalen.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Cafeína. 3. Teofilina (Farmacologia).
 4. Saliva – Exame. 5. Úlcera péptica. 6. Rato. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.



Piracicaba, 14 de julho de 1998

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em **14 de julho de 1998**, considerou a candidata **ANA PAULA DEL BORTOLO RUENIS** aprovada.

1. PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

2. PROFA. DRA. MARIA CRISTINA VOLPATO

3. PROFA. DRA. ELZA HELENA GUIMARÃES LARA

“Métodos contém sempre uma metafísica; inconscientemente, eles revelam conclusões que freqüentemente, afirmam ainda não conhecer.”

A. Camus.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Aparecida, pelo apoio incondicional e amor infinito, os quais sempre me fizeram seguir em frente.

Ao meu irmão Paulo José, à minha avó Amábile e aos familiares, pela confiança e incentivo.

Ao meu pai, Antonio José (in memorian) e á minha avó Laura (in memorian), com saudade.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen pela orientação segura, pelo exemplo de conduta como pesquisador e, especialmente, pela amizade, paciência e apoio durante toda a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e à Prof^a. Dra. Maria Cristina Volpato, pela colaboração na realização deste trabalho, pelo incentivo e amizade.

Aos Profs. Drs. Eduardo Dias de Andrade, Thales Rocha de Mattos Filho e José Ranali, por partilharem conhecimento e amizade durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

Aos amigos Ana Maria, Sinvaldo, Valdir e Marcos, companheiros do curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

À Maria Elisa dos Santos, secretária da Área de Farmacologia, pela valiosa colaboração e intensa dedicação.

Aos técnicos de Laboratório José Carlos e Ademir, e ao guarda mirim Jesse, pelo auxílio na execução deste trabalho.

À Luciane Coppi, hoje colega de Curso de pós graduação, e aos alunos de graduação Simone, Ricardo e Flávia, por toda a ajuda e pelos finais de semana perdidos.

Ao Prof. Marco Vinícius Chaud, mestre e amigo, e à Prof^a. Luciane Araújo, da Unimep, pelo incentivo ao ingresso na área acadêmica.

À bibliotecária Marilene, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo auxílio técnico prestado.

À Capes, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

A todos os amigos que compartilharam comigo apoio, incentivo e amizade sincera.

SUMÁRIO

	página
1. LISTAS	
1.1. Lista das tabelas presentes no texto	1
1.2. Lista das figuras e gráficos presentes no texto	2
1.3. Lista das abreviaturas presentes no texto	3
2. RESUMO	4
3. INTRODUÇÃO	6
4. REVISÃO DA LITERATURA	10
4.1 - A cárie dental.	10
4.2 - O modelo animal para pesquisa em cariologia.	15
4.3 - Cafeína.	21
4.3.1 - Farmacocinética.	22
4.3.2 - Ações farmacológicas.	26
4.3.3 - Cafeína e cárie dental.	28
4.4 - Teofilina.	31
4.4.1 - Farmacocinética	32
4.4.2 - Ações farmacológicas.	34
5. PROPOSIÇÃO	37
6. MATERIAL E MÉTODO	38
6.1. Experimento animal.	38
6.2. Saliva.	40
6.2.1 - Determinação do fluxo salivar.	40
6.2.2 - Ensaio para determinação de pH e capacidade tampão	41
6.3. Análise microbiológica.	41
6.4. Determinação do índice de cárie.	42
6.5. Análise de lesão gástrica.	43
6.6. Análise estatística.	43
7. RESULTADOS	45
8. DISCUSSÃO	54
9. CONCLUSÃO	63
10. ANEXOS	64
11. SUMMARY	67
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

3. LISTAS

1.1. Lista das tabelas presentes no texto.

	página
Tabela 1 Número de refeições consumidas diariamente.	45
Tabela 2 Ganho de peso (g) dos animais, após 5 semanas de experimento.	45
Tabela 3 Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade.	46
Tabela 4 Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de sulco e sua severidade.	48
Tabela 5 Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e cárie de sulco de primeiro molar.	49
Tabela 6 Influência dos tratamentos sobre as contagens de microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem de <i>S. sobrinus</i> .	50
Tabela 7 Influência dos tratamentos sobre os parâmetros salivares.	51
Tabela 8 Influência dos tratamentos sobre os índices de úlcera gástrica.	52

1.2. Lista das figuras e gráficos presentes no texto.

	página
Figura 1 Estrutura química da cafeína.	21
Figura 2 Cafeína e seus principais metabólitos.	24
Figura 3 Estrutura química da teofilina.	31
Gráfico 1 Número médio de refeições consumidas diariamente e ganho de peso (g) dos animais, após 5 semanas de experimento.	46
Gráfico 2 Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade.	47
Gráfico 3 Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de sulco e sua severidade.	48
Gráfico 4 Influência dos tratamentos sobre as contagens de microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem de <i>S. sobrinus</i> .	50
Gráfico 5 Influência dos tratamentos sobre os parâmetros salivares.	52
Gráfico 6 Influência dos tratamentos sobre os índices de úlcera gástrica.	53

1.3. Lista das abreviaturas presentes no texto:

ADE	água destilada esterilizada
AGL	ácidos graxos livres
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância
b.w.	body weight
Cmax	pico da concentração plasmática
COI	Comitê Olímpico Internacional
et al.	e outros (abreviatura de "et alli")
HPLC	high performance liquid chromatography
MG1	mucinas de alto peso molecular
MG2	mucinas de baixo peso molecular
MAS	meio Mitis Salivarius Agar
MSB	meio Mitis Salivarius Agar mais bacitracina
MSS	meio Mitis Salivarius Agar mais estreptomicina
PAE	película adquirida do esmalte
p.c.	peso corporal
pH	potencial hidrogeniônico
PRPs	proteínas ricas em prolina
p/v	peso por volume
SDW	sterile distilled water
SNC	sistema nervoso central
spf	specific pathogen free
UFC	unidades formadoras de colônia
v/v	volume por volume

2. RESUMO

Estudos prévios demonstraram que a cafeína administrada a ratos por via oral aumenta a susceptibilidade destes animais à cárie dental. A teofilina, outra xantina extensivamente utilizada no tratamento da asma, é biotransformada no fígado em cafeína. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da cafeína e teofilina sobre o desenvolvimento de cárie dental, em ratos submetidos a desafio cariogênico. Seis ratas Wistar (spf), livres de estreptococos do grupo mutans, foram obtidas do CEMIB/Unicamp, com seis filhotes machos cada. As mães foram infectadas com *Streptococcus sobrinus* 6715 e divididas em três grupos que receberam durante o período de lactação (22 dias): dieta 2000 e água destilada esterilizada (ADE) ad libitum; (2) dieta 2000 mais cafeína (2 mg/100 g p.c.) e ADE, ad libitum; (3) dieta 2000 mais teofilina (0,57 mg/100 g p.c.) e ADE ad libitum. Após o desmame, os filhotes foram infectados por *S. sobrinus* 6715; aos 25 dias de idade, foram colocados na máquina de alimentação programada König-Höfer, e receberam 17 refeições diárias, em intervalos de uma hora, de forma a terem a mesma dieta que suas mães, como descrito acima e ADE ad libitum, por 5 semanas. Os resultados da análise microbiológica, da determinação de fluxo salivar, de pH e da capacidade tampão da saliva, dos índices de cáries de Keyes e de úlcera gástrica foram analisados por ANOVA e teste de Tukey-Kramer HSD. A porcentagem de *S. sobrinus* em relação a microbiota total foi significativamente maior no grupo da teofilina do que nos grupos cafeína e controle: (1) 69,55; (2) 78,77; (3) 88,06. Os índices de cárie de superfície lisa total não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,09$), cujos valores foram: (1) 48,8 [43,75]; (2) 46,33 [39,42]; (3) 53,33 [48,08]. O índice de cárie total de sulco para o grupo da teofilina não foi estatisticamente diferente do grupo controle, porém maior que o grupo da cafeína, e estatisticamente diferente ($p < 0,01$). Os resultados para lesão leve (Ds) e moderada (Dm) de dentina para o grupo da teofilina foram maiores e

estatisticamente diferentes dos grupos cafeína e controle. Os valores de Ds e [Dm] foram, respectivamente: (1) 8,0 [0,5]; (2) 6,91 [0,5]; (3) 14,0 [3,5] para superfície lisa e (1) 25,5 [3,5]; (2) 19,66 [2,41]; (3) 32,83 [9,33] para sulco. Não houve diferença estatisticamente significativa no fluxo salivar, no pH e na capacidade tampão entre os grupos teofilina e controle; o grupo da cafeína apresentou pH maior e estatisticamente diferente dos demais grupos, e embora o fluxo salivar tenha sido menor que os outros grupos, não difere do grupo da teofilina. Ainda que os grupos cafeína e teofilina tenham sido estatisticamente diferentes entre si quanto à capacidade tampão da saliva, não diferiram estatisticamente do controle. Os valores de pH e [capacidade tampão] e {fluxo salivar em mL/min} foram, respectivamente: (1) 9,23 [8,37] {0,065}; (2) 9,41 [8,13] {0,040}; (3) 9,25 [8,55] {0,048}. Os resultados de índice de úlcera foram: (1) 0,5; (2) 3,0; (3) 2,0. Os índices de úlcera nos grupos cafeína e teofilina foram significativamente maiores que o grupo controle. Concluiu-se que a teofilina proporcionou aumento no potencial cariogênico da sacarose da dieta no modelo proposto, quando comparada à própria sacarose e à sacarose suplementada com cafeína, efeito possivelmente relacionado a alterações na secreção de proteínas salivares.

PALAVRAS-CHAVE: Cáries dentárias, cafeína, teofilina (farmacologia), saliva-exame, úlcera péptica, rato.

3. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença de origem bacteriana, resultante de um processo dinâmico que ocorre em função de eventos bioquímicos gerados pelos microrganismos de placa, após exposição a carboidratos fermentáveis (**GEDDES, 1995**). A produção de ácidos promovida por microrganismos como os estreptococos do grupo mutans e os lactobacilos, que são relativamente acidogênicos e acidúricos, leva à queda de pH, que promove um distúrbio físico-químico entre o esmalte dental e o fluído da placa circundante (**VAN HOUTE, 1994**).

Existe uma correlação positiva entre a frequência de ingestão e os intervalos de exposição à sacarose e os níveis de cárie, tanto em experimentos com animais como em humanos (**LARSON et al., 1962; KÖNIG et al., 1968; NEWBRUN & FROSTELL, 1978; BOWEN et al., 1980**). O modelo animal, de ratos submetidos a desafio cariogênico severo, tem sido amplamente utilizado em cariologia, para o estudo do potencial cariogênico ou anticariogênico de diferentes produtos (**BOWEN & PEARSON, 1992; OOSHIMA et al., 1993; NAKAMOTO et al., 1993; MUNDORFF-SHRESTHA et al., 1994; ROSALEN et al., 1997**).

O conceito de cárie dental pode ser ampliado quando consideramos o papel da saliva na manutenção das superfícies dentárias quando expostas ao processo de desmineralização provocada pela queda de pH da placa dental. Em situações fisiológicas ou patológicas onde o fluxo salivar encontra-se diminuído, a exposição a uma dieta potencialmente cariogênica predispõe as estruturas dentárias ao risco de cárie (**VAN HOUTE, 1994**).

A redução severa do fluxo salivar resulta na deterioração rápida da saúde oral, alterando consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes,

que apresentam dificuldade de mastigação, deglutição, fala, paladar alterado, trauma e ulceração da mucosa oral, infecções orais incluindo candidíase e desenvolvimento rápido de cárie dental (**WHELTON, 1996**).

A utilização de um grande número de medicamentos, especialmente por idosos, tem sido uma das principais causas de hipofunção das glândulas salivares e xerostomia. Diversas drogas que induzem a hipossalivação (**WHELTON, 1996**) podem interferir com a secreção autonômica, como o propranolol (**WATSON et al., 1990**).

Estudos relatam que drogas não prescritas, como a cafeína, também podem alterar a saúde oral (**NAKAMOTO et al., 1993**). A cafeína, ou 1,3,7-trimetilxantina, é uma das substâncias mais freqüentemente consumidas, pois está presente em uma série de produtos alimentícios como café, chá, refrigerantes de cola, e ainda em medicamentos de venda livre (**GRAHAM, 1978**). No Brasil, um estudo realizado na cidade de Campinas, indicou que a ingestão potencial média diária de cafeína pela população dessa cidade foi de 2,74mg/kg p.c., sendo o café a principal fonte de exposição à cafeína (**CAMARGO, 1996**).

A cafeína é um estimulante do SNC, e seus efeitos estão relacionados principalmente ao antagonismo aos receptores da adenosina (**BENOWITZ, 1990**). Os efeitos resultantes da estimulação central pela cafeína são redução da fadiga, melhora da concentração e fluxo de pensamento mais claro, observados após a ingestão de doses moderadas, de até 200 mg de cafeína/dia, ou o equivalente a três xícaras de café (**SERAFIN, 1996**). Outros efeitos farmacológicos da cafeína incluem aumento da diurese (**ROBERTSON et al., 1981**) e estimulação da secreção de ácidos pelo estômago (**MAROTTA & FLOCH, 1991**).

Estudos em animais demonstraram que a ingestão de cafeína pelas mães durante o período de lactação altera a composição mineral do primeiro molar de ratos recém-nascidos (**NAKAMOTO et al., 1985; HASHIMOTO et al., 1992; FALSTER et al., 1992; NAKAMOTO et al., 1993**). **BATIRBAYGIL et al.**, em **1985**, avaliando o efeito dessa droga administrada às mães lactantes e também aos filhotes lactentes, por intubação gástrica, não obtiveram resultado semelhante. A dose de cafeína utilizada nesses experimentos foi de 2 mg/100 g p.c., ou o equivalente à ingestão diária de 10 xícaras de café (**GILBERT & PISTEY, 1973**).

A teofilina (1,3-dimetilxantina), outra droga do grupo das xantinas, foi durante décadas utilizada como um potente broncodilatador para o tratamento de crises agudas de asma, como estimulante do centro respiratório medular e como adjuvante no tratamento de edema pulmonar agudo. Recentemente, tem sido usada para prevenir episódios de apnéia idiopática e bradicardia em recém-nascidos prematuros. (**HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996**). Atualmente, sua utilização mais importante é como um profilático no controle dos sintomas de asma crônica (**HENDELES, 1988**), sendo os sintomas noturnos aliviados com a administração de preparações de liberação prolongada (**SERAFIN, 1996**). Apresenta também efeitos sobre o sistema circulatório, melhorando a perfusão de alguns órgãos e aumentando a diurese.

Em adultos, cerca de 6% da teofilina administrada é convertida em cafeína, por metabolização hepática. Em crianças prematuras, cerca de 50% da dose de teofilina é excretada inalterada na urina, e o restante sofre N-desmetilação formando cafeína. Nestes pacientes, a cafeína pode atingir concentrações sangüíneas médias em torno de 30% da concentração inicial de teofilina, podendo porém ser substancialmente maior em alguns casos (**HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996**).

Este dado farmacocinético sugere a possibilidade da teofilina influenciar o desenvolvimento de cárie dental de forma semelhante à cafeína, ou de forma mais acentuada que esta, talvez devido ao seu efeito diurético. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho é avaliar o efeito da administração crônica destas xantinas sobre o desenvolvimento de cárie em ratos submetidos a uma dieta cariogênica.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 - A CÁRIE DENTAL

No início da década de 60, Paul Keyes captou com sucesso a idéia de cárie como um processo multifatorial, dependente da interação entre o hospedeiro e dentes susceptíveis, uma dieta rica em carboidratos, e uma microbiota cariogênica. **(TANZER, 1981)**.

A lesão de cárie ou cavidade resulta de um processo de desequilíbrio entre os fatores de proteção do dente, favorecendo a proliferação de microrganismos cariogênicos, como os estreptococos do grupo mutans e os lactobacilos, que fermentam os açúcares fornecidos pela dieta. Estes microrganismos produzem ácidos que diminuem o pH da placa dental até um ponto crítico, em torno de 5,5 **(LEGLER & MENAKER, 1980)**; neste ponto, começa a ocorrer perda mineral, o que funciona como efeito tampão.

Durante o platô ácido da curva de Stephan, a dissolução de mineral do dente ocorre para evitar queda de pH, até que se restabeleça o pH normal, e o processo de perda é revertido. Entretanto, se o pH atingir níveis abaixo de 4,0, a perda é irreversível **(LOESCHE, 1986)**, resultando em lesão.

Quanto ao hospedeiro, consideremos primeiramente a composição química dos dentes. O principal constituinte do esmalte dental é a hidroxiapatita. Esta substância incorpora íons com cargas positivas (sódio, potássio, zinco) ou negativas (carbonato e íon flúor), dependendo da presença destes no ambiente bucal. Tem sido demonstrado que a incorporação de íons carbonato à hidroxiapatita do esmalte dental torna-o mais solúvel, e é perdido nos estágios iniciais do processo carioso **(HALLSWORTH et al., 1973)**. Por outro lado, a maior presença de flúor no

esmalte reduz sua susceptibilidade à desmineralização (**TEN CATE & REMPT, 1986**).

Uma dieta rica em carboidratos fermentáveis fornece substrato para a produção de ácidos orgânicos pelas bactérias cariogênicas. A cariogenicidade dos alimentos tem sido extensivamente relatada. **LARSON et al., 1962** observaram que a atividade de cárie está relacionada à frequência e ao tempo de retenção do alimento (carboidrato fermentável) na cavidade oral.

Alguns alimentos apresentam um potencial cariogênico, ou seja, são capazes de contribuir para o início do processo cariioso. **EDGAR et al., 1975** realizaram um estudo em humanos sobre o potencial cariogênico de 54 alimentos industrializados, habitualmente consumidos entre as refeições (tipo "snacks"), e observaram diferentes resultados de queda de pH, o que dependeria não somente da concentração de carboidratos fermentáveis, mas também da natureza ácida de cada alimento.

Dentre os carboidratos, a sacarose tem sido mais freqüentemente relacionada à cárie dental; estudos revelaram que uma dieta contendo 0,1% de sacarose pode promover o desenvolvimento de cárie dental em humanos (**HAMADA & SLADE, 1980**).

A sacarose proveniente da dieta apresenta alta cariogenicidade não somente por ser metabolizada a ácidos orgânicos que irão promover a desmineralização, mas por servir como substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares. *Streptococcus mutans* sintetiza alguns polissacarídeos, denominados glucanos e frutanos, através da atividade de enzimas bacterianas conhecidas como glicosiltransferases e frutossiltransferases sobre a sacarose (**LOESCHE, 1993**).

Segundo **CARLSSON & HAMILTON, 1995** os glucanos são especialmente considerados como fator crítico importante na patologia da cárie porque promovem adesão entre bactérias e superfície dental (**LOESCHE, 1993**). Os glucanos apresentam duas frações: a fração solúvel que é composta de polissacarídeos com ligações predominantemente do tipo α (1 $\rightarrow$ 6), denominados dextranos e a fração insolúvel, que pode ser extraída em laboratório pelo uso de álcalis fortes, sendo representada pelos mutanos, polissacarídeos que apresentam ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 3) e que promovem a adesão de *S. mutans*.

Os estreptococos do grupo mutans são encontrados na placa dental, fermentam manitol e sorbitol, produzem glucanos extracelulares a partir da glicose e, com exceção do *Streptococcus ferus*, são cariogênicos em modelos animais. Oito sorotipos de estreptococcus do grupo mutans podem ser reconhecidos com base em antígenos de carboidratos, e estudos de DNA têm demonstrado a existência de quatro grupos genéticos, que foram elevados a espécie: *S. mutans* (sorotipos c/e/f), *S. rattus* (sorotipo b), *S. sobrinus* (sorotipos d/g) e *S. cricetus* (sorotipo a). Dentre as quase 300 espécies de microrganismos que podem ser isolados da placa dental, apenas os *S. mutans* e em menor extensão, os *S. sobrinus* e os *Lactobacillus casei* podem realmente estar relacionados à cárie dental (**LOESCHE, 1986**).

S. sobrinus é o estreptococo do grupo mutans mais freqüentemente isolado, com exceção do *S. mutans* (**LOESCHE, 1986; VAN HOUTE, 1994**). *S. sobrinus* têm sido extensivamente estudado em modelo animal devido a presença de glicosiltransferase, seu principal fator de virulência. A relação entre a sacarose da dieta, formação de placa, e o desenvolvimento de cárie dental pode estar associada com a presença ou ausência de várias glicosiltransferases e os produtos de sua atividade sobre a sacarose, os glucanos (**LOESCHE, 1986**).

S. sobrinus inicialmente se aderem à película adquirida do esmalte (PAE) de maneira inespecífica, e acumula-se, na presença de sacarose, pela formação de glucanos. **BOWEN et al., 1983** já haviam demonstrado que a frequência de consumo e o intervalo de tempo entre as exposições à sacarose afetam a implantação deste microrganismo.

Segundo ZICKERT et al., 1992 e ALALUUSA et al., 1990, citados por **BRATHALL & ERICSSON, 1995**, diversos estudos foram realizados com o propósito de correlacionar a prevalência de estreptococos do grupo mutans com o aparecimento de lesões cariosas, tendo sido verificado que indivíduos com alto índice de colonização por estes microrganismos (10^6 UFC/mL de saliva) tiveram muito mais lesões cariosas que os indivíduos sem nenhum ou com baixos níveis.

A saliva exerce um importante papel na regulação da exposição das superfícies dentárias aos carboidratos e aos ácidos da placa, e portanto, à microbiota, à queda de pH e ao potencial cariogênico da placa. É ainda proposto que a cárie dental ocorre preferencialmente em estruturas altamente expostas à carboidratos, com fluxo salivar diminuído (**VAN HOUTE, 1994**).

Assim, alterações do fluxo, da composição e do pH salivares podem ter efeitos marcantes sobre o desenvolvimento de cárie dental. A saliva é um conjunto de secreções das glândulas parótida, submandibular e sublingual, glândulas salivares menores e fluido gengival, que banha constantemente a mucosa oral e os dentes, constituída de fluido e macromoléculas, as proteínas salivares (**WHELTON, 1996**).

O fluido salivar é constituído de água e eletrólitos, dentre eles cálcio, sódio, potássio, fosfato e bicarbonato, sendo este o principal responsável

pela capacidade tampão da saliva (**WHELTON, 1996**). A secreção de fluido é controlada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático, que estimula as glândulas salivares a produzir uma secreção predominantemente aquosa. Em indivíduos normais, o fluxo varia de 0,3 mL/min para saliva não estimulada até 1-2 mL para saliva estimulada (**WHELTON, 1996**).

O pH salivar depende dos ácidos e bases secretados, mais notadamente dos íons bicarbonato. No plasma, a concentração de bicarbonato é de 24 mM (**TENOVUO & LAGERLÖF, 1995**); a concentração na saliva não estimulada varia de 1 a 2 mM, indicando a reabsorção deste íon ao longo dos ductos estriados das glândulas salivares. Porém, a concentração deste íon pode atingir até 60 mM em fluxo salivar aumentado (**WHELTON, 1996**). Assim, o pH pode variar de 5,6 para a saliva não estimulada a 7,8 em situações de fluxo muito intenso (**TENOVUO & LAGERLÖF, 1995**), sendo o valor médio de pH, em torno de 6,7 (**WHELTON, 1996**).

A secreção de macromoléculas ocorre em resposta à estimulação do sistema nervoso autônomo simpático. As proteínas salivares como as imunoglobulinas, histatinas, glicoproteínas, lisosimas, peroxidases, lactoferrinas e aglutininas têm funções lubrificantes, digestivas e antimicrobianas, aspectos importantes na modulação da colonização microbiana dos dentes e tecidos orais e na proteção contra toxinas e carcinógenos (**HAY & BOWEN, 1996**).

As estaterinas e as proteínas ricas em prolina (PRPs) são necessárias para inibir a precipitação espontânea dos sais de fosfato e cálcio nas glândulas salivares e suas secreções, exercendo também ações antimicrobianas importantes (**JENSEN et al., 1994**).

As histatinas constituem um grupo de proteínas ricas em histidina, com funções bacteriostáticas e fungistáticas (**TROXLER et al., 1990**), e secundariamente inibem a precipitação de sais de fosfato de cálcio.

Têm sido demonstrado que as mucinas promovem a agregação bacteriana, facilitam o clearance de microrganismos da cavidade oral por deglutição (**HAY & BOWEN, 1996**) e, opostamente, promovem a formação de placa dental, agindo como receptores de adesão bacteriana à película adquirida de esmalte (PAE) e à placa, e ainda como substrato nutritivo para o crescimento e divisão bacteriana na placa (**SCANNAPIECO & LEVINE, 1995**).

4.2 O MODELO ANIMAL PARA PESQUISA EM CARIOLOGIA.

KRASSE, 1981, fez um breve histórico sobre a utilização de modelos animais em cariologia: no início da década de 50, uma série de experimentos conduzidos por Shaw e colaboradores demonstrou que o desenvolvimento de cárie depende da presença de carboidratos na cavidade oral. Na mesma época, foi confirmada a necessidade da participação de microrganismos no desenvolvimento de cárie, em estudos conduzidos por Orland e colaboradores. Fitzgerald e Keyes demonstraram de forma conclusiva o papel dos estreptococos em cárie experimental em hamsters: até então, acreditava-se que a microbiota comensal sofreria alterações qualitativas e quantitativas, tornando-se cariogênica após a introdução de uma dieta rica em açúcar.

Em **1958a**, **KEYES**, descreveu as lesões cariosas em ratos tratados com dietas ricas em carboidratos por um período de 50 dias e classificou-as em: sulcal, proximal, bucal, lingual, morsal e cervical ou de raiz. Em um

RUENIS, A.P.D.B. Efeito da cafeína e teofilina sobre o desenvolvimento de cárie dental, em ratos.

trabalho complementar, descreveu um método de diagnóstico e índice de lesões nas várias superfícies, incluindo fotografias e diagramas para auxiliar as determinações; este método tornou-se amplamente difundido para estudos em cariologia (**KEYES, 1958b**).

No início da década de 60 foi demonstrada a etiologia da cárie como uma doença infecciosa através de estudos animais: observou-se que uma ninhada de hamsters proveniente de uma linhagem cárie-ativa tratada com uma ração suplementada com penicilina não apresentava lesões cariosas. Para demonstrar que a cárie dental é transmissível, filhotes de uma mãe cárie-inativa foram alojados com uma ninhada de mãe cárie ativa, e desenvolveram cárie rampante (**KEYES, 1960**).

KÖNIG et al., 1968, demonstraram uma correlação positiva entre a frequência de ingestão de sacarose e a incidência de cárie em animais. Foi desenvolvida uma máquina de alimentação programada com gaiolas individuais, cada qual com bandejas giratórias para conter as dietas ou tratamentos, controladas por um dispositivo programável.. Este aparelho foi especialmente projetado para o estudo de cárie dental em animais, com o objetivo de eliminar efeitos inespecíficos de variações na ingestão da dieta.

Diferentes condições experimentais não permitiam comparações entre os trabalhos descritos na literatura, o que motivou **LARSON et al, 1977**, a estabelecer um protocolo experimental usando ratas Sprague-Dawley nascidas no mesmo dia, infectadas ou não aos 24 dias de idade por *S. mutans* 6715-15 resistente à estreptomicina 200 µg/mL (*S. sobrinus*), e alimentadas com dieta MIT 200 por 56 dias, ad libitum; o índice de cáries foi determinado pelo método de Keyes. Este protocolo foi desenvolvido simultaneamente por seis laboratórios, cujos resultados demonstraram padrões semelhantes de desenvolvimento de cárie dental: maior número de

lesões nos sulcos, menor nas superfícies bucal e lingual, e maior crescimento de *S. mutans* nas superfícies proximais. Desta forma, foi possível demonstrar que os principais fatores que influenciam o desenvolvimento de cárie em ratos poderiam ser controlados.

O estudo de **LARSON et al., 1977**, não avaliou a influência do tempo de exposição à sacarose e da frequência de ingestão sobre o desenvolvimento de cárie dental, aspecto já demonstrado por **KÖNIG et al., 1968**. **BOWEN et al., 1980**, utilizou um modelo semelhante ao de **LARSON et al., 1977**, introduzindo um método de avaliação do potencial cariogênico de alimentos, onde os animais tiveram sua nutrição essencial fornecida por intubação gástrica e a frequência de ingestão dos alimentos teste controlada através da máquina programadora de alimentação de **KÖNIG et al., 1968**. Os animais que não tiveram contato com alimento na cavidade bucal permaneceram livres de cárie. Os animais apresentaram índices de cárie de superfície lisa somente quando alimentados 14 ou 17 vezes por dia, o que favoreceu a capacidade do *S. mutans* em colonizar as estruturas dentárias e demonstrou uma correlação positiva entre frequência de alimentação e aparecimento de lesões. Estes resultados foram confirmados em trabalho posterior de **BOWEN et al., 1983**.

Modificações no método de determinação de índice de cárie de Keyes foram introduzidas por **LARSON, 1981**. Além de alterações na técnica de preparo das estruturas dentárias, Larson dividiu o escore de cárie em duas etapas: na primeira, seriam analisadas as superfícies bucal, lingual, proximal e morsal, e após coloração e secção dos dentes, a superfície sulcal. Cada superfície sofreria avaliação linear do esmalte, descrita como número de lesões (L) e área de lesão (E), e profundidade de lesão na dentina, variando entre leve (Ds), moderada (Dm) ou extensa (Dx).

Experimentos avaliando outros aspectos relacionados à cárie dental foram realizados. **BOWEN et al., 1988**, avaliaram o efeito da hipossalivação sobre o desenvolvimento de cárie em ratos. Animais que tiveram suas glândulas submandibulares e sublinguais removidas e o ducto das parótidas ligado cirurgicamente aos 36 dias de idade foram infectados com *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus mutans* (sobrinus) 6715 e alimentados com uma dieta 2000 modificada. Cada grupo foi sacrificado em períodos diferentes, imediatamente, uma, duas, três, quatro, cinco e seis semanas após a infecção e exposição à dieta cariogênica. Os resultados demonstraram que os índices de cárie aumentaram progressivamente ao longo do tempo, e uma maior recuperação de *S. sobrinus* foi obtida após um período de três semanas, podendo-se concluir que seria desnecessária a continuação do experimento por um período de tempo maior.

O período experimental pode ser reduzido pelo aumento do desafio cariogênico imposto aos animais. Um estudo de **MADISON et al., 1989**, demonstrou que animais dessalivados aos 25 dias de idade, são mais susceptíveis à infecção por *S. sobrinus* transmitido de um animal intacto.

O modelo animal tem sido adotado para a avaliação do potencial cariogênico ou anticariogênico de diferentes produtos. **OOSHIMA et al., 1992**, demonstraram que o maltitol, um dissacarídeo alcoólico, inibiu o desenvolvimento de cárie dental em ratos spf. **KAWANABE et al., 1992**, observaram a não cariogenicidade de um outro poliálcool, o eritritol, em modelo animal.

Duas substâncias naturais utilizadas como adoçantes, o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A foram testadas em ratos Sprague-Dawley infectados com *S. sobrinus*, alimentados com dieta 2000 suplementada ou não com essas substâncias por um período de 5 semanas. A avaliação dos índices de cárie

segundo Keyes permitiu aos pesquisadores determinar estes produtos como não cariogênicos (**DAS et al., 1992**). Utilizando protocolo experimental semelhante, **OOSHIMA et al., 1993**, observaram índice de cárie menor em animais tratados com chá de folhas de *Camellia sinensis*.

MUNDORFF-SHRESTHA et al., 1994, avaliaram a cariogenicidade de alguns alimentos, incluindo entre outros, iogurtes, gelatinas, chocolate, pão e granola, oferecidos a grupos de ratos Sprague-Dawley por um período total de 5 semanas. Além do índice de cárie de Keyes e ensaios microbiológicos, testes adicionais para determinação do fluxo salivar e capacidade total da saliva foram realizados. Os resultados indicaram correlação positiva entre o número de *S. sobrinus* e o desenvolvimento de lesão cariosa de superfície lisa, entre o fluxo salivar aumentado e inibição de cárie de superfícies bucal, lingual e sulcal, e ainda entre maior capacidade tampão e inibição do número e severidade de lesões de sulco.

Animais submetidos a desafio cariogênico severo foram utilizados para o estudo dos efeitos de íons sobre o desenvolvimento de cárie dental. **ROSALEN et al., 1996a**, verificaram que o cobre co-cristalizado com sacarose em uma faixa de concentração entre 75 a 300 ppm atua como um agente cariostático eficaz.

Com o objetivo de explorar os efeitos de combinações de cobre, ferro e fluoreto incorporados a sacarose por co-cristalização no desenvolvimento de cárie dental, **ROSALEN et al., 1996b**, utilizaram o modelo de ratos dessalivados. Foi verificado que esses íons reduzem o potencial cariogênico da sacarose. A combinação de pequenas doses desses três íons apresentou um efeito cariostático aditivo.

No Brasil, **ROSALEN et al., 1997**, iniciaram a implantação do modelo animal para o estudo da cariogenicidade de uma farinha de mandioca típica da região amazônica. Foram utilizadas ratas Wistar spf, infectadas aos 21 dias de idade com *S. sobrinus* e dessalivadas aos 26 dias de idade. A nutrição essencial (NCP#2) foi administrada por intubação gástrica, e os animais tiveram contato apenas com as substâncias teste: sacarose, farinha de mandioca e amido, fornecidas em 17 refeições diárias pela máquina programadora de alimentação König-Höfer. Constatou-se que a farinha de mandioca possui potencial cariogênico intermediário entre sacarose e amido, resultado preocupante para a população que a utiliza como principal fonte de carboidratos.

O modelo animal permite uma série de adaptações para o estudo dos mais diferentes produtos, fornecendo resultados que, salvas as devidas precauções, podem ser sugeridas como hipóteses a serem confirmadas em humanos. Portanto, este modelo de estudo se constitui na fase preliminar aos estudos em seres humanos.

4.3 CAFEÍNA

A cafeína é um derivado metilado de bases purínicas estruturalmente identificadas como 1,3,7-trimetilxantina, cuja ocorrência natural está sempre associada à teofilina, 1,3-dimetilxantina e à teobromina. É altamente solúvel em água e determinados solventes orgânicos à temperatura ambiente. A cafeína pura é inodora, com sabor amargo, sendo estável a variações de temperatura e pH, normalmente encontrados durante o processamento de alimentos (**GRAHAM, 1978**).

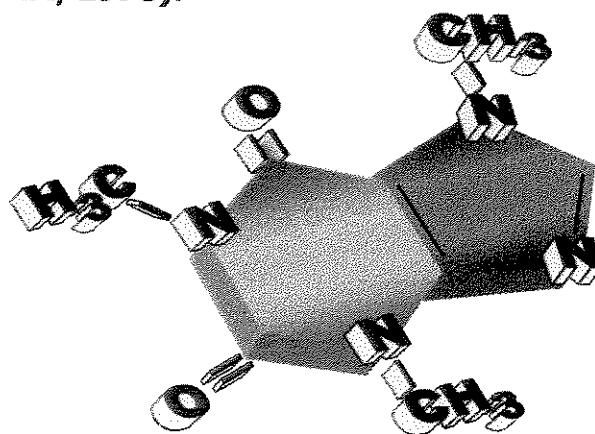


Figura 1 – Estrutura química da cafeína.

A cafeína é encontrada tanto em alimentos como café (*Coffea arabica*), chá (*Thea sinensis*), produtos de chocolate (sementes de cacau, *Theobroma cacao*), mate (*Ilex paraguayense*) e refrigerantes à base de cola (*Cola acuminata*) quanto em medicamentos como anoréticos, diuréticos, estimulantes e analgésicos (**BARONE & ROBERTS, 1993**).

O consumo de cafeína entre as diferentes populações varia em função de seus hábitos alimentares distintos. **BARONE & ROBERTS, 1993**, basearam-se em dados fornecidos pela USDA Nationwide Food Consumption Survey (NFCS) de 1987-1988 e do Market Research Corporation of America Menu Census (MRCA) de 1989 para estimar o consumo de cafeína nos

Estados Unidos. A estimativa para a ingestão diária de cafeína, considerando todas as fontes e idades foram em média 2,8 e 1,9 mg/kg de peso corporal (segundo a USDA e MRCA, respectivamente). Os mesmos autores citam um consumo médio total de 4,2 mg/kg de peso corporal (p.c.) na Inglaterra.

Estimativas feitas para consumidores adultos americanos e europeus mostraram uma ingestão média diária de 2,5 e 3,5 mg/kg p.c., respectivamente **(STAVRICK, 1988)**. Entre crianças e adolescentes americanos, foi estimado um consumo de cafeína de 1,5 mg/kg p.c. para a faixa etária de 10 a 17 anos e 4,0 mg/kg p.c. para crianças com idade entre 1 e 4 anos, sendo os refrigerantes, seguidos de chá e produtos de chocolate, as principais fontes de cafeína **(ARBEIT et al., 1988)**.

No Brasil, uma pesquisa realizada na cidade de Campinas, S.P. durante o verão de 1993 utilizou uma amostra de 600 indivíduos com idade entre 9 e 80 anos, questionados quanto ao seu consumo de café, chá, refrigerantes e produtos de chocolate, a fim de estimar o consumo de cafeína por essa população. Os níveis de cafeína de cada produto foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados indicaram que a ingestão potencial média diária de cafeína pela população de Campinas foi de 2,74 mg/kg p.c., sendo o café a principal fonte de exposição à cafeína, seguido em ordem decrescente pelo chá, refrigerantes, achocolatados e chocolates em barra **(CAMARGO, 1996)**. Não há dados disponíveis sobre o consumo de cafeína em medicamentos.

4.3.1 FARMACOCINÉTICA DA CAFEÍNA

A cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, com biodisponibilidade de $100 \pm 13\%$, atingindo o pico da concentração plasmática em uma hora. Apresenta ampla distribuição por todos os compartimentos

corporais, incluindo a saliva, a placenta e o leite materno, com um volume aparente de distribuição de $0,61 \pm 0,02$ L/kg; a ligação a proteínas plasmáticas é da ordem de $36 \pm 7\%$.

NEWTON et al., 1981, avaliaram a farmacocinética da cafeína no homem, comparando as concentrações salivares e plasmáticas, medidas através de cromatografia gasosa. Praticamente toda a cafeína é eliminada por metabolização hepática, sendo que apenas 5% é encontrada na urina na forma inalterada. A metabolização ocorre por desmetilação e oxidação na posição 8, formando principalmente paraxantina (1,7-dimetilxantina), que origina seus principais metabólitos hidrossolúveis excretados pela urina, a 1-metilxantina e o ácido 1-metilúrico, e em menor escala, teofilina e teobromina. A Figura 2 mostra os caminhos metabólicos da cafeína.



Vários fatores podem alterar a meia-vida plasmática da cafeína, que no homem varia de 3 a 7 horas (**SERAFIN, 1996**). Um fator importante é a idade: crianças prematuras apresentam meia-vida de até 50 h, recém-nascidos de 3-4 dias, não havendo porém diferenças entre o adulto normal e idosos (**VON BORSTEL, 1983**).

PARSONS & PELLETIER, 1982, avaliaram a eliminação da cafeína em gestantes, utilizando amostras de saliva. Foi demonstrado que a meia-vida plasmática da cafeína durante a gravidez correspondia a 21,5 h para não fumantes e 9,6 h para fumantes, uma vez que o fumo aumenta a liberação de enzimas metabolizadoras da cafeína. Segundo **VON BORSTEL, 1983**, a meia-vida plasmática da cafeína pode chegar a 18 horas durante a gravidez, a 10,7 h com o uso de contraceptivos orais, sugerindo que estes dados farmacocinéticos sejam modificados devido às alterações hormonais.

A cafeína se equilibra rapidamente com o sangue placentário. Em humanos, a eliminação de cafeína é diminuída provavelmente devido à inibição do sistema misto citocromo-oxidase hepático. No final da gestação, os níveis de cafeína na mãe e no feto podem aumentar em até três vezes, (**PARSONS & PELLETIER, 1982**), o que pode ser preocupante, especialmente no caso de bebês prematuros, nos quais a meia-vida é aumentada (**SERAFIN, 1996**).

Um estudo conduzido por **CHESTON et al., 1984**, avaliou a presença de cafeína na saliva e no leite de 15 mães durante o período de amamentação, utilizando técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography - HPLC). As mães foram instruídas a consumir bebidas contendo cafeína em quantidades usuais, sendo as concentrações de cafeína ingeridas individualmente quantificadas por detecção da substância nas amostras dos produtos. Foi possível detectar a

presença de cafeína no leite e na saliva já nos primeiros 15 minutos após a ingestão e o pico da concentração foi atingido em uma hora, com valores máximos de 7,17 µg/mL no leite e 9,22 µg/mL na saliva. Os valores médios da meia-vida de eliminação foram $4,0 \pm 3,7$ h e $6,1 \pm 4,4$ h respectivamente para saliva e leite. Supondo que cada bebê ingira 90 mL de leite a cada 3 horas por 24 horas, estima-se que 0,06 a 1,5% da dose materna atinja o lactente. Desta forma, o consumo moderado de cafeína (até 336 mg em dose única) por mães lactantes não traria nenhum prejuízo ao lactente. Entretanto, a ingestão de doses superiores a 150 mg em intervalos de tempo inferiores à meia-vida média de eliminação (6 horas) podem levar ao acúmulo de cafeína nos bebês (**CHESTON et al., 1984**).

4.3.2 AÇÕES FARMACOLÓGICAS

Três mecanismos têm sido propostos para explicar as ações farmacológicas das metilxantinas, incluindo a cafeína: a inibição da fosfodiesterase, o antagonismo à adenosina, e ainda a mobilização de cálcio intracelular.

A inibição da fosfodiesterase, enzima responsável pelo metabolismo intracelular da adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), causa um aumento nas concentrações intracelulares desta substância. O AMPc funciona como um segundo mensageiro intracelular, iniciando uma cascata de eventos que promovem a ação broncodilatadora e os efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos (**SERAFIN, 1996**). No músculo esquelético e adipócitos, pode estimular a glicogenólise e a lipólise (**DENADAI, 1995**).

Entretanto, segundo uma revisão de **NEHLIG & DEBRY, 1994**, a concentração plasmática de cafeína necessária para promover a inibição da

fosfodiesterase seria de 1 mM. Uma vez que as concentrações usualmente encontradas no sangue são de 100 µM, a dose de cafeína necessária para inibir a enzima isolada estaria muito acima da faixa de consumo.

Os efeitos estimulantes sobre o SNC estariam relacionados principalmente ao antagonismo aos receptores da adenosina (A1 e A2). A adenosina inibe a adenilciclase através dos receptores de alta afinidade (A1) ou estimula a adenilciclase através dos receptores de baixa afinidade. Em nível pré-sináptico, a adenosina inibe a liberação de neurotransmissores centrais; assim, a inibição competitiva destes receptores pela cafeína resulta na liberação de noradrenalina, dopamina e serotonina pelo SNC e um aumento das catecolaminas plasmáticas, segundo **BENOWITZ, 1990**.

Os efeitos resultantes da estimulação central pela cafeína são redução da fadiga, melhora da concentração e fluxo de pensamento mais claro, observados após a ingestão de doses moderadas, de até 200 mg de cafeína/dia, ou o equivalente a três xícaras de café (**SERAFIN, 1996**).

A cafeína possui fraca ação diurética, resultante de um aumento na taxa de filtração glomerular e redução da reabsorção nos túbulos renais. Parece haver tolerância aos efeitos farmacológicos da cafeína, principalmente sobre a diurese (**ROBERTSON et al., 1981**).

Tem sido demonstrado que a mobilização do cálcio intracelular pela cafeína pode iniciar e potencializar a contração muscular. In vitro, a cafeína diminui o limiar de excitabilidade e prolonga a duração do período de contração muscular (**DENADAI, 1995**).

Existe consenso que a cafeína é capaz de modificar o desempenho em exercícios físicos. Segundo uma revisão de **DENADAI, 1995**, o efeito

ergogênico da cafeína é resultante de uma maior mobilização e utilização de ácidos graxos livres (AGL), economizando glicogênio, e/ou pela diminuição da percepção do esforço. Isto foi particularmente observado durante atividades submáximas de curta duração, tendo porém pouco efeito durante os exercícios de alta intensidade de curta e média duração.

A utilização terapêutica da cafeína é bastante limitada. Algumas especialidades farmacêuticas apresentam formulações onde a cafeína é associada ao ácido acetil salicílico ou à ergotamina, com a finalidade de produzir vigília levemente agradável (**SERAFIN, 1996**).

Desde 1984, a cafeína foi incluída na lista de agentes dopantes, ou seja capazes de modificar o desempenho físico. O COI (Comitê Olímpico Internacional) considera ilegal a concentração de 12 µg/mL de cafeína na urina, equivalente a ingestão de 897 a 1065 mg de cafeína, ou aproximadamente 9 copos de café num período de duas horas (**DENADAI, 1995**).

O papel da cafeína na etiologia da úlcera péptica foi revisto por **MAROTTA & FLOCH, 1991**. Dentre os gastroenterologistas entrevistados, 95% concordaram que o café estimula a secreção ácida e causa dispepsia, devendo portanto ser evitado por pacientes com problemas gástricos. Entretanto, foi demonstrado que bebidas descafeinadas também apresentam os mesmos efeitos, tornando a relação entre a ingestão de cafeína e o aparecimento de úlcera ainda questionável.

4.3.3 CAFEÍNA E CÁRIE DENTAL

A literatura relata os efeitos da cafeína sobre o desenvolvimento de cárie dental em uma série de experimentos. Em **1985, NAKAMOTO et al.,**

avaliaram a possível interação entre o estado nutricional e a ingestão de cafeína por ratas em período de lactação. Para tal, as ratas receberam dietas contendo 6, 12 e 20% de proteína (controle) e as mesmas dietas suplementadas com cafeína na dose de 2 mg/100 g de peso corporal. Aos 15 dias de idade, os filhotes destas mães foram pesados e sacrificados. Demonstrou-se que filhotes cujas mães foram alimentadas com dieta normal (20% de proteína) suplementada com cafeína apresentaram peso corporal diminuído. O conteúdo de cálcio nos primeiros molares foi menor em todos os grupos que ingeriram cafeína. O peso dos primeiros molares foi menor nos animais mal nutridos (dieta com 6% de proteínas), com ou sem suplementação de cafeína. Os resultados indicam que os efeitos da cafeína sobre os pesos dos germes dentais de primeiros molares foi determinado principalmente pelo estado nutricional das mães.

Em estudo conduzido por **BATIRBAYGIL et al., 1985** ratas lactantes foram alimentadas com dietas contendo 6 ou 20% de proteínas, e seus filhotes, divididos em grupos que receberam cafeína na dose de 2 mg/100 g de peso corporal dissolvida em 0,1 mL de soro fisiológico ou apenas soro fisiológico, via intubação gástrica, em dias alternados, por um período total de 15 dias. Os resultados de peso corporal confirmaram a tendência anterior. O peso dos primeiros molares foi menor no grupo 20% proteína mais cafeína, bem como a quantidade de cálcio presente nestas estruturas.

NAKAMOTO & SHAYE, 1986, analisaram os efeitos do consumo de cafeína durante a gestação e o estado nutricional das mães sobre o peso corporal e o desenvolvimento das mandíbulas e ossos longos de seus filhotes. O peso corporal de filhotes de mães alimentadas com dieta normal e cafeína foi maior. Isto deve-se em parte à maior ingestão de proteínas, bem como ao maior conteúdo de cálcio das mandíbulas e ossos longos apresentado pelos grupos que receberam cafeína. Sugere-se, portanto que a

caféina aumentaria a deposição de cálcio nestas estruturas, independentemente do estado nutricional das mães.

Constatado que a caféina diminuiria o conteúdo de cálcio do primeiro molar (**NAKAMOTO et al., 1985**) em condições nutricionais normais, **HASHIMOTO et al., 1992**, conduziram uma pesquisa onde as mães foram alimentadas com uma dieta normal (20% de proteínas), suplementada ou não com caféina na dose de 2 mg/100 g de peso corporal, durante o período de lactação. Aos 22 dias de idade, os filhotes foram sacrificados, para retirada dos quatro primeiros e segundos molares de cada animal, seguida de uma análise detalhada do esmalte. Radiografias não mostraram diferenças na densidade do esmalte entre os grupos; portanto, não seria possível detectar possíveis alterações de esmalte promovidas pela ingestão de caféina por observação clínica. Entretanto, testes de resistência ao ataque ácido detectaram maior dissolução de cálcio, fósforo e magnésio nos primeiros molares do grupo da caféina, sem no entanto apresentar diferenças significativas quanto à dissolução de minerais de segundos molares entre caféina e controle. A caféina ingerida no período pós-natal poderia ter influenciado a formação da matriz e/ou os estágios de mineralização do esmalte dental, marcadamente no primeiro molar.

Amostras de primeiros molares do experimento anterior submetidos ou não ao ataque ácido foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura, difratometria de raios-X e análise com micro sonda eletrônica (**FALSTER et al., 1992**). Este conjunto de testes permitiu afirmar que a ingestão de caféina durante a primeira fase de crescimento do animal (período de lactação) aparentemente afeta a superfície de esmalte do primeiro molar, por impedir a mineralização.

Finalmente, em **1993**, **NAKAMOTO et al.**, submeteram os filhotes de mães que ingeriram dieta normal, suplementada ou não com cafeína (2mg/100 g peso corporal) a um modelo de desafio cariogênico em animais. Após o desmame, os filhotes foram alimentados com dieta cariogênica, baseada na composição da dieta 2700, por mais três semanas. Os resultados mostraram maior índice de cárie de esmalte de primeiros molares para o grupo da cafeína, sem diferença estatisticamente significativa para dentina. Como esperado, não houve diferença significativa nos índices de cárie de esmalte e dentina para segundos molares.

4.4 TEOFILINA

A teofilina é um derivado dimetilado da xantina (1,3-dimetilxantina), e assim como a cafeína, é encontrada em uma série de produtos naturais e industrializados, como chá, café, chocolates e refrigerantes (**BARONE & ROBERTS, 1984; CAMARGO, 1996**). A solubilidade da teofilina em água é baixa, sendo bastante solúvel em álcool, clorofórmio e éter. A aminofilina, complexo formado entre a teofilina e a etilenodiamina, é altamente solúvel, e contém de 78-86% de teofilina anidra (**HENDELES, 1988**).

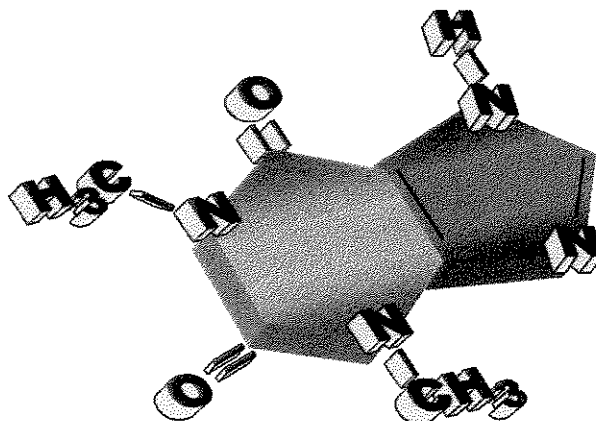


Figura 3 – Estrutura química da teofilina.

4.4.1 FARMACOCINÉTICA

A teofilina é normalmente bem absorvida por via oral, dependendo da forma farmacêutica na qual é administrada. O pico da concentração plasmática (C_{max}) é atingido em 1 hora para soluções, 2 h para comprimidos comuns, sem metabolismo de primeira passagem. A presença de alimento pode, em algumas situações, retardar a absorção da teofilina, sem no entanto alterar sua biodisponibilidade **(HENDELES, 1988)**.

Comprimidos com revestimento entérico atingem concentrações máximas em 5h, sendo desaconselhável sua indicação clínica **(HENDELES, 1988)**. Um grande número de formulações de liberação sustentada estão disponíveis no mercado farmacêutico, cuja C_{max} é atingida de 4 a 7 h para proporcionar intervalos de doses de 8, 12 ou 24 h, com pouca flutuação nas concentrações terapêuticas **(HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996)**. A taxa de absorção ideal deveria ser constante (ordem zero), com 8,3% da dose absorvida a cada hora, para um intervalo de dose de 12 h **(HENDELES, 1988)**.

A distribuição da teofilina é ampla, atingindo todos os compartimentos corporais; atravessa a placenta e é encontrada no leite materno. O volume aparente de distribuição varia de 0,3 a 0,7 l/kg ou 30 a 70% do peso corporal ideal **(HENDELES, 1988)**; em indivíduos normais, a média é de 0,45 l/kg tanto para crianças quanto adultos, cuja taxa de ligação a proteínas plasmáticas é de 60% **(SERAFIN, 1996)**. O volume médio de distribuição em bebês prematuros, adultos com cirrose hepática e idosos é um pouco maior, uma vez que a taxa de ligação a proteínas plasmáticas nestes pacientes é diminuída a cerca de 40% **(HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996)**.

A teofilina atravessa a barreira hematoencefálica mais lentamente que a cafeína, porém atinge concentrações no fluido cerebrospinal próximas a 90% em prematuros e 50% em crianças. Na saliva, a concentração média é de 60% dos níveis plasmáticos **(HENDELES, 1988)**.

A principal via de eliminação da teofilina é a hepática, sendo cerca de 85-90% da dose metabolizada por enzimas do citocromo P₄₅₀; isto ocorre paralelamente em diversas vias, tanto por processos de primeira ordem quanto de cinética de saturação **(HENDELES, 1988)**. O metabólito principal, ácido 1,3-dimetilúrico é formado pela hidroxilação na posição C-8; da n-desmetilação resultam a 3-metilxantina e a 1-metilxantina, esta rapidamente convertida a ácido 1-metilúrico pela xantina-oxidase. Cerca de 6% da dose de teofilina em adultos é convertida em cafeína por N-desmetilação, formando a seguir paraxantina **(HENDELES, 1988)**. Cerca de 15% da dose é excretada inalterada na urina.

Em crianças prematuras, cerca de 50% da dose de teofilina é excretada inalterada na urina, e o restante sofre N-desmetilação formando cafeína e hidroxilação na posição C-8. A conversão de teofilina a cafeína em neonatos e crianças até três meses de idade é clinicamente mais relevante, devido a meia-vida média prolongada da cafeína nestes pacientes. A cafeína pode atingir concentrações plasmáticas de até 30% da concentração inicial de teofilina, mas este valor pode ser substancialmente maior em alguns casos **(HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996)**. Entretanto, a monitorização dos níveis de cafeína são necessárias somente na presença de efeitos adversos.

Estudos anteriores descreveram a farmacocinética da cafeína como de primeira ordem, pois as concentrações terapêuticas parecem apresentar um declínio log-linear. Entretanto, foi demonstrado que a depuração total parece ser linear, mas as vias de conversão de cada metabólito são não-lineares. A

depuração renal da teofilina depende da taxa de fluxo urinário: em altas concentrações após dose única (10 µg/mL), a teofilina induz a diurese e a depuração renal de droga inalterada é elevada, embora a taxa de formação de metabólitos seja relativamente lenta. Em concentrações mais baixas, a depuração metabólica é mais rápida, mas o efeito diurético diminui, juntamente com a depuração de droga inalterada. Após doses múltiplas, ocorre tolerância ao efeito diurético **(HENDELES, 1988)**, tanto em adultos como crianças.

4.4.2 AÇÕES FARMACOLÓGICAS

Assim como a cafeína e outras xantinas, a teofilina apresenta os seguintes mecanismos de ação celular: inibição da fosfodiesterase, com aumento dos níveis intracelulares de AMPc; efeitos diretos na concentração de cálcio intracelular; efeitos indiretos na concentração de cálcio via hiperpolarização da membrana celular; desacoplamento entre os elementos de contração muscular e aumento do cálcio intracelular e antagonismo aos receptores da adenosina, sendo este o principal fator responsável pelos efeitos farmacológicos da teofilina **(SERAFIN, 1996)**.

A teofilina exerce seus efeitos farmacológicos em diferentes órgãos do corpo humano. Estes efeitos incluem relaxamento da musculatura lisa, especialmente a brônquica; estimulação do SNC podendo levar a convulsões quando administrada em altas doses; estimulação do centro respiratório medular, efeito importante no tratamento da respiração de Cheyne-Stokes e apnéia de recém-nascidos prematuros, e ainda na depressão respiratória provocada por opióides **(HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996)**.

Os efeitos da teofilina sobre o sistema circulatório foram bastante explorados para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, devido à

leve vasodilatação periférica e à diurese promovidas por esta droga. A teofilina aumenta a diurese por aumento da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, efeito relacionado a sua ação antagonista sobre os receptores da adenosina (**HENDELES, 1988**).

HENDELES, 1988 relatou que pacientes tratados com infusões de teofilina, e que atingiram concentrações plasmáticas de 10 a 20 µg/mL apresentaram sinais de aumento da força contrátil cardíaca e diminuição da resistência vascular periférica. Em altas concentrações, a teofilina pode produzir taquicardia e arritmias.

Têm sido relatados sinais de intoxicação quando concentrações séricas de 15 a 20 µg/mL são atingidas. Os sintomas mais comuns incluem cefaléia, palpitação, náusea, vômitos, hipotensão e dor (**HENDELES, 1988; SERAFIN, 1996**).

A utilização terapêutica da teofilina em preparações de liberação prolongada para o alívio dos sintomas de asma noturna tem sido bastante difundida. O tratamento inicia-se com a administração de 12 a 16 mg/kg por dia da base livre da teofilina, até um máximo de 400 mg por pelo menos 3 dias, a fim de minimizar os efeitos colaterais primários de náusea, vômito, nervosismo e insônia. A dosagem é então aumentada em dois estágios sucessivos, para uma faixa entre 16 e 18 mg/kg e 18 a 20 mg/kg diários, até atingir dose máxima de 800 mg/dia para um indivíduo adulto normal de 70 kg. Em crianças menores de 1 ano de idade, a dose é calculada em mg/dia segundo a fórmula $0,2 \times (\text{idade em semanas}) + 5,0$ (**SERAFIN, 1996**).

Recém-nascidos prematuros com episódios de apnéia por mais de 15 segundos têm sido tratados com a administração intravenosa de metilxantinas. Normalmente são necessárias concentrações séricas próximas a 13 µg/mL para produzir um padrão respiratório normal, obtidas pela

administração de um dose de ataque de 5 mg/kg de teofilina e pode ser mantida com 2 mg/kg p.c. administrados em intervalos de 12 ou 24 horas **(SERAFIN, 1996)**.

As concentrações salivares de teofilina têm sido utilizadas como parâmetros para a monitorização desta droga. **KHANNA & SOMANI, 1980**, demonstraram que a concentração de teofilina encontrada na saliva varia de 76 a 80% da concentração sérica em crianças prematuras. Nestes pacientes, parte da dose de teofilina é metabolizada em cafeína, que pode atingir concentrações plasmáticas médias em torno de 30% da concentração de inicial de teofilina **(HENDELES, 1988)**. Embora os efeitos da cafeína sobre a mineralização do esmalte dental já tenham sido demonstrados, não existem dados disponíveis na literatura sobre uma possível influência da teofilina no desenvolvimento de cárie dental.

WESTENBERG & GEIGER, 1987, constataram que os efeitos do estresse sobre o desenvolvimento de úlcera gástrica em ratos poderiam ser reduzidos pela administração de um análogo da adenosina. Uma vez que a teofilina inibe os receptores centrais da adenosina, foi demonstrado por esses autores que a administração central e periférica de análogos da teofilina, 8-sulfofenilteofilina e 8-fenilteofilina antagonizam o efeito protetor da ação da adenosina sobre a mucosa gástrica.

5. PROPOSIÇÃO**OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência da cafeína e teofilina sobre o desenvolvimento de cárie dental, em ratos submetidos a desafio cariogênico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar os efeitos da cafeína e teofilina sobre os índices de cárie dental;
- 2) Verificar os efeitos da cafeína e teofilina sobre a microbiota bucal;
- 3) Determinar os efeitos da cafeína e teofilina sobre o fluxo salivar, o pH e a capacidade tampão da saliva;
- 4) Verificar alterações gástricas após exposição prolongada a cafeína e teofilina.

6. MATERIAL E MÉTODO

6.1 Experimento animal

Para a realização deste experimento, foram obtidas 6 ratas Wistar spf (specific pathogen free ou livres de patógenos específicos), cada uma com 6 filhotes, provenientes do CEMIB - Centro de Bioterismo da Unicamp. As mães foram avaliadas quanto à presença de estreptococos do grupo mutans, através de semeadura de material proveniente da cavidade bucal em placas de MSA (Mitis Salivarius Agar, Difco Laboratórios) e MSB (Mitis Salivarius Agar, Difco Laboratórios acrescido de bacitracina, Sigma, na concentração de 200 unidades/litro, segundo **GOLD et al., 1973**). Uma vez constatada a ausência de microrganismos deste grupo, as mães foram infectadas oralmente com uma cultura de *Streptococcus sobrinus* 6715 resistente a estreptomicina, re-isolada de um rato dessalivado, em fase exponencial de crescimento (**BOWEN et al., 1980**). O inóculo foi preparado em meio líquido de baixo peso molecular (low molecular weight medium, segundo **SCHILLING & BOWEN, 1988**) e a fase exponencial de crescimento verificada espectrofotometricamente (espectrofotômetro modelo Spectronic 20, Bausch & Lomb), em comprimento de onda de 700 nm.

Na primeira fase do experimento, as mães foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais, cada qual com 2 mães que receberam:

- Grupo 1: dieta 2000 (**KEYES, 1959**)
- Grupo 2: dieta 2000 e cafeína (Sigma Chemical Cop.), dose de 2 mg/100 g de peso corporal (**NAKAMOTO et al., 1993**)
- Grupo 3: dieta 2000 e teofilina (Sigma Chemical Cop.), dose de 0,57 mg/100 g de peso corporal (p.c.).

A dose de teofilina para os animais foi calculada a partir de uma dose

de 400 mg diárias da base livre para um indivíduo de 70 kg (**SERAFIN, 1996**).

As mães receberam os tratamentos acima e água destilada esterilizada (ADE) ad libitum, durante todo o período de lactação. Os filhotes foram desmamados aos 22 dias de idade e divididos randomicamente entre seus respectivos grupos, cada qual com 12 animais:

- Grupo 1: dieta 2000 e ADE;
- Grupo 2: dieta 2000 mais cafeína (2 mg/100 g p.c.) e ADE;
- Grupo 3: dieta 2000 mais teofilina (0,57 mg/100 g p.c.) e ADE.

Ainda aos 22 dias de idade os filhotes foram verificados quanto à presença de *S. sobrinus* e infectados em três dias sucessivos (23, 24 e 25 dias de idade) com uma cultura em fase exponencial de crescimento de *Streptococcus sobrinus* 6715, como descrito acima. Neste período os animais receberam dieta 2000, ração e água contendo 5% de sacarose (p/v) para favorecer a implantação do microrganismo. A infecção foi confirmada através da semeadura de material coletado da cavidade bucal com cotonetes esterilizados, em placas de MSS (*Mitis Salivarius Agar*, Difco Laboratórios mais estreptomomicina, Sigma, na concentração de 200 unidades/mL, segundo **KEYES, 1960**) incubadas por 48 horas, a 37°C, sob atmosfera de 10% de CO₂.

Aos 26 dias de idade, os animais foram colocados em uma máquina de alimentação programada König-Höfer (**KÖNIG et al., 1968**), para controlar o consumo e a frequência de ingestão da dieta e das drogas. As dietas de cada grupo experimental foram oferecidas das 16:00 às 9:00h, num total de 17 refeições diárias. Os animais também receberam ADE ad libitum. Esta fase teve duração de 5 semanas, sendo verificados o consumo de dieta de cada grupo diariamente, e o peso dos animais, semanalmente.

6.2 Saliva

A coleta de saliva foi feita no dia anterior ao sacrifício, 2 horas após a última refeição, para minimizar os possíveis efeitos resultantes da ação local de resíduos alimentares **(MUNDORFF-SHRESTHA et al., 1994)**, que poderiam interferir nos resultados dos ensaios para determinação de fluxo salivar, pH e capacidade tampão da saliva.

6.2.1 Determinação do fluxo salivar

A determinação do fluxo salivar foi feita no dia anterior ao sacrifício, 2 horas após a última refeição. Os filhotes foram anestesiados com quetamina (Ketalar®, Ketamine HCl inj. USP 100mg/ml, Parke-Davis), por via intraperitoneal, na dose de 90 mg/kg de peso corporal **(MUNDORFF-SHRESTHA et al., 1994)**.

Constatada a anestesia, os animais receberam administração via intraperitoneal de pilocarpina 0,2% em solução de NaCl 0,9% (Pilocarpine Hydrochloride, Sigma) na dose de 10 mg/kg p.c. **(MUNDORFF-SHRESTHA et al., 1994)**. Após um minuto foram colocados sobre um suporte de madeira, em decúbito ventral, com a cabeça inclinada sobre copos plásticos previamente pesados e marcados, sob refrigeração em banho de gelo. A saliva foi coletada durante um período de 15 minutos para determinação do fluxo salivar. Os resultados foram expressos em mL/minuto. A coleta de saliva prosseguiu por mais 15 minutos, a fim de obter volume de saliva suficiente para determinação de pH e capacidade tampão.

6.2.2 Ensaio para determinação de pH e capacidade tampão da saliva

6.2.2.1 Determinação do potencial hidrogeniônico da saliva.

As amostras de saliva de 15 e 30 minutos foram homogeneizadas. Foram tomadas alíquotas de 0,5 mL e a verificação do pH obtida através de um potenciômetro Procyon® SA 720.

6.2.2.2 Determinação da capacidade tampão da saliva.

Alíquotas de 0,25 mL de saliva foram colocadas em tubos de vidro contendo 0,75 mL de HCl 5 mM e agitadas por 15 segundos. Após 5 minutos, o pH foi determinado utilizando-se um potenciômetro Procyon® SA 720, e os valores expressos como capacidade tampão da saliva.

6.3 Análise microbiológica

Após 5 semanas de experimento, os animais foram sacrificados por asfixia utilizando éter etílico, e imediatamente decapitados. As mandíbulas foram seccionadas assepticamente, e a metade esquerda de cada mandíbula, imersa em 5,0 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% esterilizada, sendo então submetida a banho de ultrassom (Thornton T50, 200watts), em pulsos de 10 segundos com intervalos de 5 segundos, por um período total de 20 minutos (**BOWEN et al., 1980**). O ensaio microbiológico foi feito com a suspensão resultante, distribuindo 0,1 mL de suspensão total e 0,1 mL de uma diluição 1:100 em meio MSS para recuperação de *S. sobrinus* e em ágar sangue (Blood Agar Base, Difco mais 5% de sangue desfibrinado de carneiro), por distribuição de 0,1 mL de diluições 1:100 e 1:1000, para contagem de microbiota total. As placas de MSS e ágar sangue, feitas em duplicata, foram incubadas anaerobicamente

em atmosfera de 10% de dióxido de carbono, a 37°C por 48 horas. As placas de ágar sangue foram adicionalmente incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera normal.

6.4 Determinação do índice de cárie

Inicialmente, as mandíbulas e maxilas foram autoclavadas por 15 minutos a 120°C, dissecadas e coradas com solução de murexida para análise de cárie pelo método de Keyes modificado por Larson (**KEYES, 1958b; LARSON, 1981**).

A determinação do índice de cáries foi realizada em duas fases: na primeira, correspondente às lesões de superfície lisa, foram somadas as lesões das superfícies bucal, lingual e proximal. Na segunda fase, as lesões de sulco foram avaliadas após coloração e seccionamento dos dentes, e o resultado foi constituído pela soma das lesões de sulco e superfície morsal.

Na primeira fase foram avaliadas as lesões de superfície lisa bucal, lingual, proximal e morsal. Inicialmente, foram contados os pontos em que aparecem lesões cariosas, resultando em um número total de lesões (L). Prosseguiu-se uma avaliação linear feita em unidades que representam uma porção da superfície do dente, sendo que o máximo de unidades que podem ser designadas a uma superfície é predeterminada pelo seu tamanho. Além da extensão, foi avaliada a profundidade de lesão na dentina. A designação dos valores registrados envolve julgamento da extensão linear e profundidade da lesão, constituindo portanto uma avaliação bidimensional das estruturas dentárias.

A aparência das lesões cariosas pode ser descrita como:

E - somente esmalte, esmalte branco e opaco;

Ds - lesão leve da dentina, superfície do esmalte seca ou quebradiça;

Dm - lesão modearada da dentina, com exposição da mesma;

Dx - lesão extensa da dentina, que está mole, destruída ou escura.

Para a avaliação de cárie de sulco, mandíbulas e maxila foram coradas com murexida 0,024% em etanol água (7:3 v/v); as estruturas dentárias foram mantidas em contato com o corante por um período máximo de 17 horas, e então seccionadas. Também foram avaliadas a extensão e a profundidade das lesões, conforme descrito no Diagrama 1 em Anexo 2. Para a visualização das lesões foi necessária a utilização de um microscópio estereoscópico modelo Stemi SV6 (Zeiss Inc., Germany).

6.5 Análise de lesão gástrica.

Imediatamente após o sacrifício, o estômago de cada animal foi removido, cortado ao longo da curvatura maior e aberto. A mucosa foi lavada em água destilada e soro fisiológico, sendo que o número e a severidade das lesões foram observados através de um microscópio estereoscópico modelo Stemi SV6 (Zeiss Inc., Germany).

Os índices de úlcera foram calculados a partir do número de lesões, avaliando-se parâmetros como tamanho da lesão, incidência de hemorragias, edema e petéquias conforme descrito no Anexo 3, segundo **SOUZA-FORMIGONI et al., 1991**.

6.6 Análise estatística

Este estudo foi realizado de forma cega.

Através do teste de Shapiro-Wilk verificou-se a distribuição normal dos dados, que então foram submetidos à análise paramétrica. Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer HSD foram aplicados a todos os dados, utilizando um programa estatístico JMP versão 3.1 (SAS Institute Inc., 1995).

Os dados microbiológicos sofreram transformação por aplicação do logaritmo natural, para minimizar a variabilidade dos dados, antes da aplicação da análise paramétrica, embora o teste de Shapiro-Wilk já tivesse demonstrado normalidade na distribuição dos dados.

Os índices de cárie de superfície lisa e de sulco foram expressos como proporções de seus valores máximos possíveis (124 e 56, respectivamente), aos quais foi aplicada a transformação do seno inverso. Estudos anteriores indicaram que esta transformação estabiliza o desvio-padrão dos resultados dentro de cada grupo **(ROSALEN et al., 1996 a,b)**.

7. RESULTADOS

Os animais permaneceram saudáveis durante todo o experimento, apresentando boa aparência e responsividade a estímulos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de refeições consumidas diariamente entre os grupos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de refeições consumidas diariamente.

	Grupos		
	controle	caféina	teofilina
Número de refeições consumidas/dia	16,48 (0,47) ^a	16,13 (0,42) ^a	16,63 (0,53) ^a

n=12; média (desvio padrão); Valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,01$

Houve ganho de peso em todos os grupos, embora o grupo da caféina tenha apresentado ganho de peso menor e este valor foi estatisticamente diferente dos grupos teofilina e controle. Os resultados estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Ganho de peso (g) dos animais, após 5 semanas de experimento.

	Grupos		
	controle	caféina	teofilina
Ganho de peso (g)	55,52 (4,42) ^a	42,46 (9,16) ^b	54,76 (10,97) ^a

n=12; Valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; média (desvio padrão); $p < 0,01$

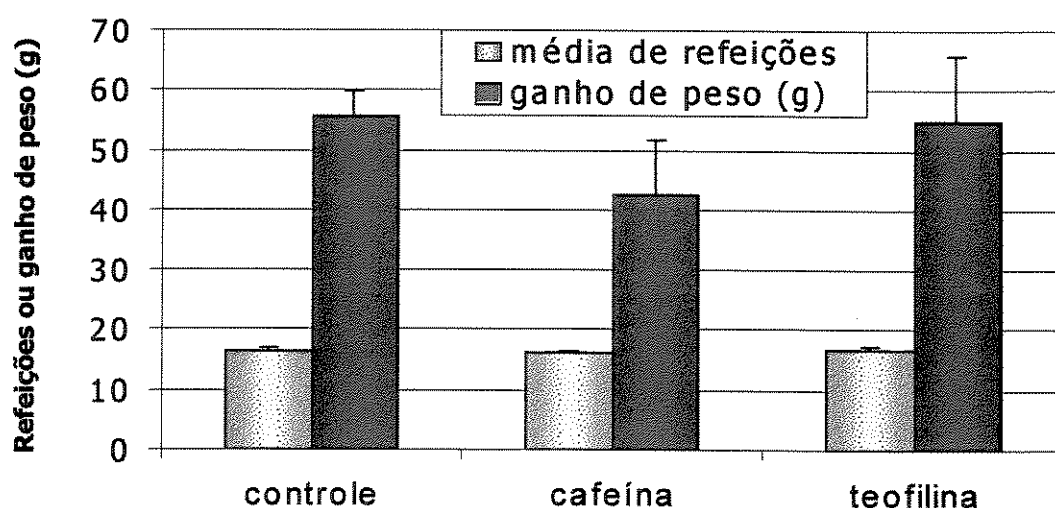


Gráfico 1 – Número médio de refeições consumidas diariamente e ganho de peso (g) dos animais, após 5 semanas de experimento.

Os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade estão demonstrados na Tabela 3. Os índices de lesão de esmalte (E) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os maiores índices de lesão leve (Ds) e moderada de dentina (Dm) foram apresentados pelo grupo da teofilina, sendo estes valores estatisticamente diferentes dos demais grupos. A cafeína não diferiu estatisticamente do controle em severidade de lesão de dentina (Ds e Dm).

Tabela 3 - Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade.

Índice de cárie de superfície lisa	<i>Grupos</i>		
	<i>controle</i>	<i>cafeína</i>	<i>teofilina</i>
(E)*	48,8 (9,08) ^a	46,33 (7,8) ^a	53,33 (6,41) ^a
(Ds)	8,0 (2,41) ^a	6,91 (4,54) ^a	14,0 (7,28) ^b
(Dm)	0,5 (0,9) ^a	0,5 (0,67) ^a	3,5 (3,0) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,09^*$; $p < 0,01$. E – somente esmalte; Ds – lesão leve de dentina; Dm – lesão moderada de dentina.

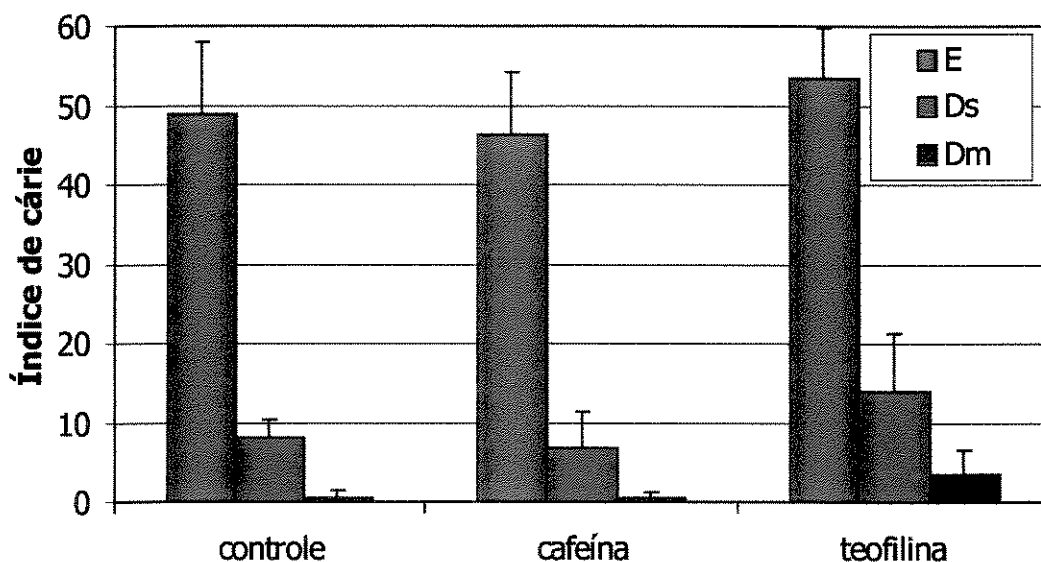


Gráfico 2 - Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade.

Os grupos cafeína e teofilina não diferiram estatisticamente do controle quanto aos índices de cárie de sulco total e esmalte (E), embora tenham apresentado diferença estatisticamente significativa entre si. O mesmo padrão demonstrado para os índices de severidade de superfície lisa foi observado nos índices de cárie de sulco, ou seja, maior severidade de lesões leve (Ds) e moderada (Dm) de dentina obtidas pelo grupo da teofilina, valores estatisticamente diferentes dos demais grupos. A Tabela 4 ilustra esses resultados.

Tabela 4 - Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de sulco e sua severidade.

Índice de cárie de sulco	<i>Grupos</i>		
	<i>controle</i>	<i>caféina</i>	<i>teofilina</i>
Total	43,75 (4,59) ^{ab}	39,92 (4,39) ^a	48,08 (5,12) ^b
(E)*	36,08 (4,44) ^{ab}	33,16 (4,54) ^a	40,25 (4,8) ^b
(Ds)	25,50 (4,75) ^a	19,66 (7,11) ^a	32,83 (8,65) ^b
(Dm)	3,5 (2,31) ^a	2,41 (2,5) ^a	9,33 (6,54) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,01$.

E – somente esmalte; Ds – lesão leve de dentina; Dm – lesão moderada de dentina.

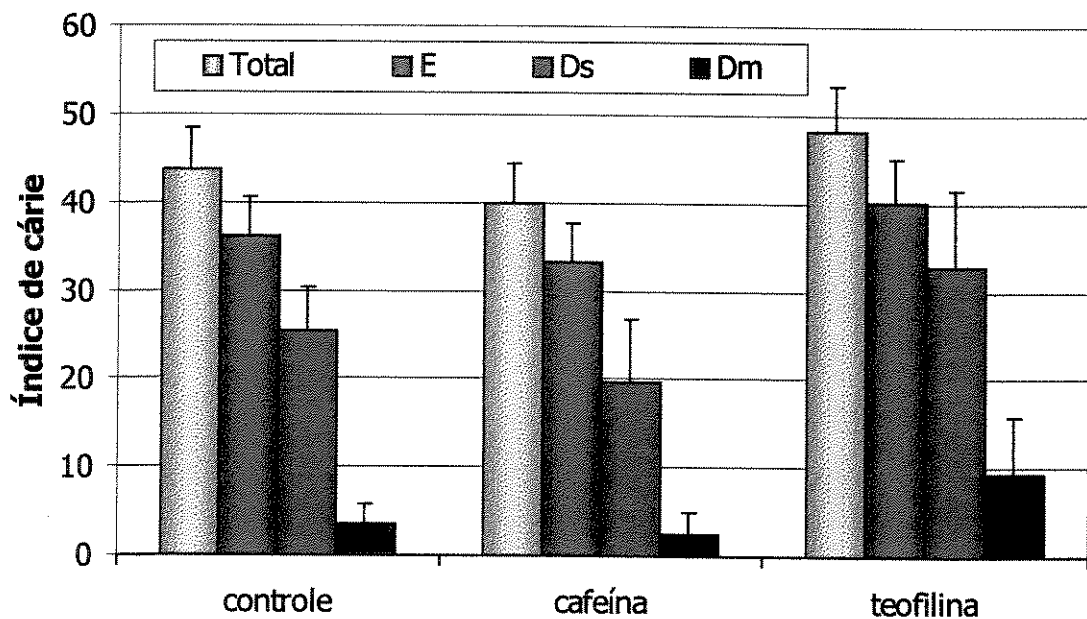


Gráfico 3 - Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de sulco e sua severidade.

Foram analisados os índices totais de cárie de superfície lisa e de cárie de sulco de primeiros molares, conforme ilustrados na Tabela 5.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os índices de cárie de superfície lisa entre os grupos.

Os grupos cafeína e teofilina apresentaram índices de cárie de sulco significativamente diferentes entre si, e os maiores valores foram obtidos pelo grupo da teofilina. Entretanto, estes grupos não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 5 - Influência dos tratamentos sobre os índices de cárie de superfície lisa e cárie de sulco de primeiro molar.

Índice de cárie	Grupos		
	controle	cafeína	teofilina
superfície lisa	22,16 (5,92) ^a	20,08 (2,75) ^a	23,16 (4,34) ^a
sulco	19,58 (1,83) ^{ab}	17,5 (2,50) ^a	21,0 (3,28) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,01$.

Os dados microbiológicos não mostraram diferença estatisticamente significativa para os valores de contagem de microbiota total, para população de *S. sobrinus* e a porcentagem deste microorganismo entre os grupos cafeína e controle.

O grupo da teofilina diferiu estatisticamente dos demais grupos quanto aos valores de microbiota total ($p < 0,04$) e população de *S. sobrinus* ($p < 0,01$).

A maior porcentagem de *S. sobrinus* foi obtida pelo grupo da teofilina, com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos, o que poderia sugerir que a teofilina facilitaria a colonização por *S. sobrinus*.

Tabela 6 - Influência dos tratamentos sobre as contagens de microbiota total, *S. sobrinus* e porcentagem de *S. sobrinus*.

Microbiota	Grupos		
	controle	caféina	teofilina
total (10^6) UFC/mL ¹	8,21 (3,87) ^a	9,21 (1,5) ^a	10,99 (2,02) ^b
<i>S. sobrinus</i> (10^6) UFC/mL ²	5,69 (2,67) ^a	7,23 (1,75) ^a	9,64 (1,74) ^b
% <i>S. sobrinus</i> ³	69,55 (17,6) ^a	78,77 (16,28) ^a	88,06 (7,17) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p^1 < 0,04$; $p^2 < 0,01$; $p^3 < 0,03$.

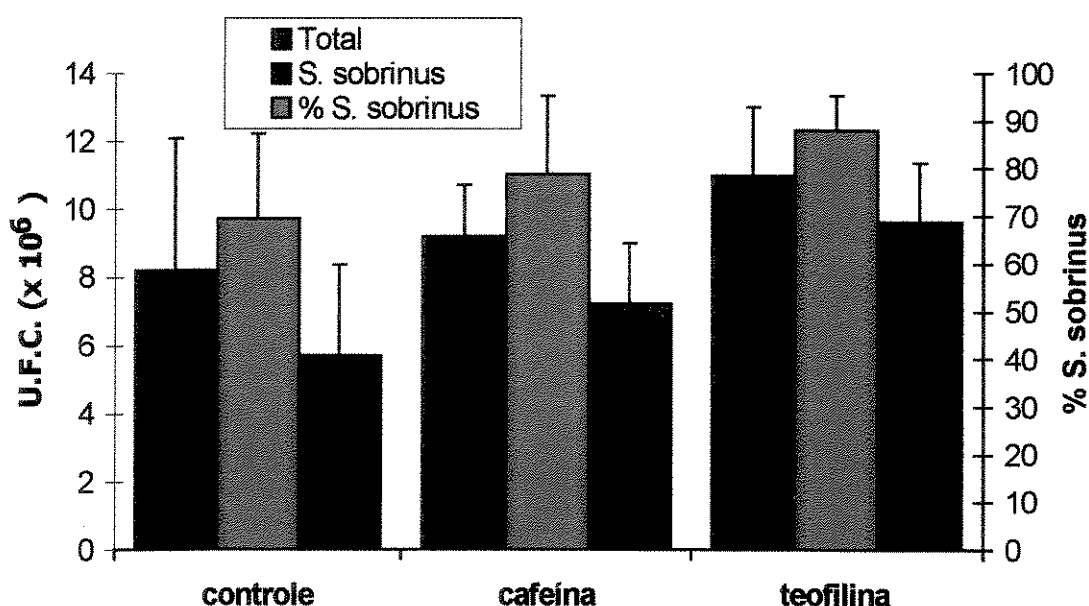


Gráfico 4 - Influência dos tratamentos sobre as contagens de microbiota total, *S. sobrinus* e porcentagem de *S. sobrinus*.

Os parâmetros salivares podem ser observados na Tabela 7.

O grupo da teofilina não apresentou valores de pH estatisticamente diferentes do controle. A cafeína apresentou valores de pH estatisticamente superiores aos demais grupos.

O maior resultado de fluxo salivar foi obtido pelo grupo da teofilina, embora não difira estatisticamente dos demais grupos. Os grupos cafeína e controle, no entanto, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

Tabela 7 - Influência dos tratamentos sobre os parâmetros salivares.

	Grupos		
	controle	cafeína	teofilina
pH	9,23 (0,07) ^a	9,41 (0,24) ^b	9,25 (0,05) ^a
fluxo salivar (mL/min)	0,065 (0,014) ^a	0,040 (0,018) ^b	0,048 (0,02) ^{ab}
Capacidade tampão	8,37 (0,33) ^{ab}	8,13 (0,04) ^a	8,55 (0,3) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,01$; $p^* < 0,03$.

Em relação à capacidade tampão da saliva, os grupos cafeína e teofilina não diferiram estatisticamente do controle, embora tenham apresentado diferença estatisticamente significativa entre si.

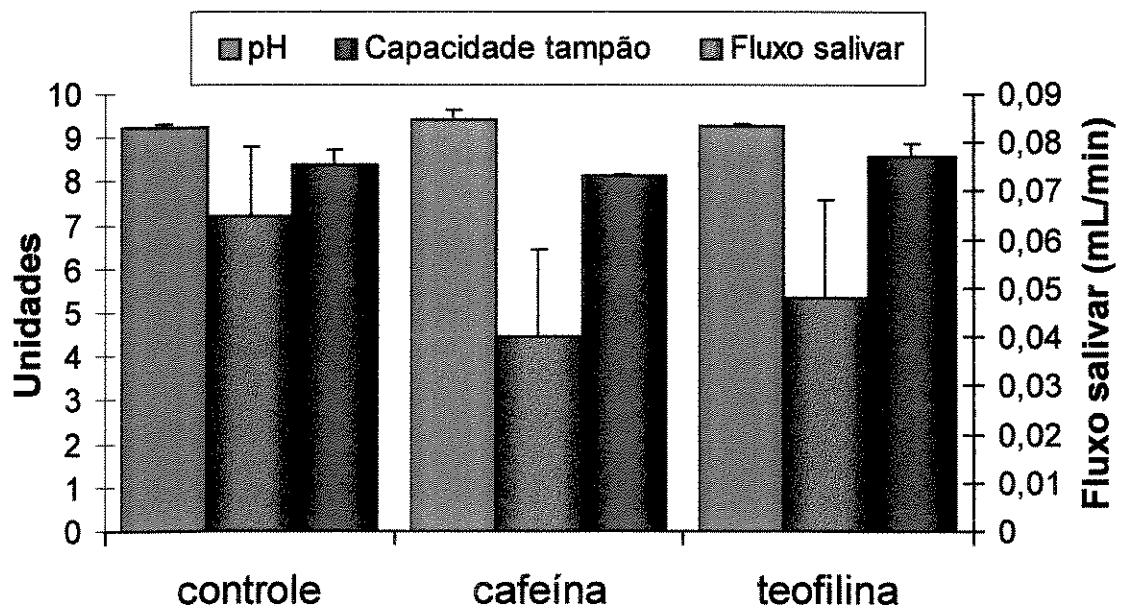


Gráfico 5 - Influência dos tratamentos sobre os parâmetros salivares.

Os índices de úlcera para os grupos cafeína e teofilina não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, mas foram superiores ao controle e estatisticamente diferentes deste. A Tabela 8 ilustra esses resultados.

Tabela 8 - Influência dos tratamentos sobre os índices de úlcera.

	<i>Grupos</i>		
	<i>controle</i>	<i>cafeína</i>	<i>teofilina</i>
Índice de úlcera	0,5 (0,79) ^a	3,0 (2,25) ^b	2,0 (0,95) ^b

n=12; média (desvio padrão); valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente; $p < 0,01$.

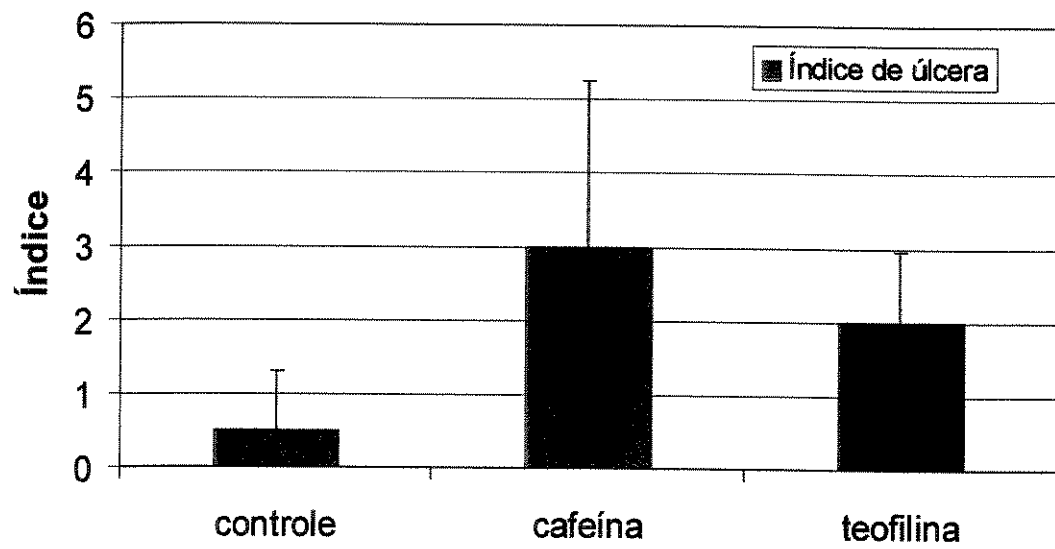


Gráfico 6 - Influência dos tratamentos sobre os índices de úlcera.

8. DISCUSSÃO

Em nosso experimento, houve ganho de peso em todos os grupos, e embora o grupo da cafeína tenha apresentado ganho de peso menor, isto aparentemente não interferiu no desenvolvimento dos animais. Estes resultados são compatíveis com os achados de **NAKAMOTO et al., 1985** e **BATIRBAYGIL et al., 1985**, que demonstraram que filhotes cujas mães foram alimentadas com dieta normal (20% de proteína), suplementada com cafeína, tiveram peso corporal diminuído, e isso foi atribuído a uma diminuição do tecido mineral, supostamente causado pela cafeína. Este efeito pode ter sido acentuado em nosso experimento, pois os animais foram expostos à cafeína por um período longo (5 semanas), além do período de amamentação.

Os animais cuja dieta foi suplementada com cafeína tiveram os maiores índices de úlcera gástrica, e isto pode estar relacionado ao menor ganho de peso apresentado por este grupo, devido ao estresse ao qual estes animais foram submetidos. Os resultados de índice de úlcera serão posteriormente discutidos.

Uma vez que as dietas foram dispensadas por meio da máquina de alimentação programada König-Höfer (**KÖNIG et al., 1968**), proporcionando o controle da frequência de ingestão de sacarose e o número de refeições cariogênicas consumidas, fatores esses diretamente relacionados aos níveis de cáries obtidos (**BOWEN et al., 1986**), pode-se garantir ainda que os animais foram expostos aos tratamentos (cafeína e teofilina) e ao desafio cariogênico de forma controlada e constante. Este controle foi ainda reforçado através da monitorização diária do consumo de dieta que permitiu determinar a quantidade necessária de cada droga para a manutenção da dosagem estabelecida no experimento.

Tendo o consumo e a frequência de exposição à sacarose controlados e estatisticamente iguais para os três grupos tratados (Tabela 1), foi possível proporcionar, pelo uso da máquina König-Höfer, o mesmo desafio cariogênico para todos os animais sob experimentação, permitindo assim que se estabeleçam as comparações entre os grupos. Contrariamente, outros trabalhos **NAKAMOTO et al., 1985** e **BATIRBAYGIL et al., 1985**, **NAKAMOTO et al., 1993**, não estabeleceram um controle sobre o consumo e a frequência de ingestão de sacarose, através da dieta cariogênica, quando avaliaram o efeito da cafeína no desenvolvimento de cárie dental em animais.

Em nosso trabalho, com o objetivo de avaliar a influência das xantinas (cafeína e teofilina) sobre o desenvolvimento de cárie dental, a microbiota oral e os parâmetros salivares, as drogas foram administradas a ratos desde a amamentação, suplementando a dieta das mães, até o final do experimento, de forma a atingir os diferentes estágios de formação do dente. Em outros estudos, que demonstraram a cariogenicidade da cafeína (**NAKAMOTO et al., 1985; HASHIMOTO et al., 1992, FALSTER et al., 1992, NAKAMOTO et al., 1993**), o delineamento experimental foi feito a fim de verificar o efeito desta droga fornecida a animais somente no período de lactação. **BATIRBAYGIL et al., 1985**, utilizando mães e filhotes que receberam cafeína administrada via intubação gástrica, na dose de 1 mg/100 g p.c. por um período de 15 dias, não encontraram alterações significativas na composição mineral do esmalte dos filhotes.

A cafeína não apresentou índices de cárie de esmalte de superfície lisa diferentes dos grupos controle e teofilina (Tabela 3). Os índices de cárie de esmalte em sulco não diferiram estatisticamente do controle, embora tenham sido estatisticamente diferentes e menores que do grupo da teofilina (Tabela 4). Isto difere dos resultados observados por **NAKAMOTO et al., 1993**, que

encontraram maiores índices de cárie de esmalte nos ratos tratados com cafeína apenas no primeiro molar, não tendo sido determinados os valores totais que incluem segundos e terceiros molares, de acordo com o método de Keyes (**KEYES, 1958b**), modificado por Larson (**LARSON, 1981**). Em nosso estudo, quando determinou-se o índice de cárie de superfície lisa e sulco somente para os primeiros molares (Tabela 5), foram observados os mesmos padrões de cárie de superfície lisa e de sulco demonstrados nas Tabelas 3 e 4.

NAKAMOTO et al., 1985 e **FALSTER et al., 1992**, sugerem que a maior susceptibilidade de primeiros molares verificada em seus trabalhos deve-se ao período da gestação no qual as mães foram expostas à cafeína (a partir do 13º dia de gestação, correspondente à amelogênese deste dente). No estudo de **NAKAMOTO et al., 1993**, os autores discutiram que a cafeína ingerida no período pós-natal poderia ter influenciado a formação da matriz e/ou os estágios de mineralização do esmalte dental, marcadamente no primeiro molar. Nossos resultados (Tabela 5) não demonstraram esse efeito da cafeína no índice de cárie e isto pode estar relacionado ao fato de que esses trabalhos não controlaram o consumo e a frequência de ingestão de sacarose, que foi oferecida ad libitum aos animais.

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao índice total de cárie de superfície lisa entre os grupos. Porém, os índices de severidade de lesão leve e moderada de dentina (Ds e Dm) foram significativamente maiores para o grupo da teofilina, em relação aos demais grupos. Da mesma forma, a teofilina causou uma maior severidade de cárie de sulco (Ds e Dm) que nos demais grupos. Estes resultados estão relacionados à colonização por *S. sobrinus*, que foi significativamente maior para o grupo teofilina em relação aos grupos controle e cafeína.

O papel dos microrganismos na etiologia da cárie dental foi discutido por **VAN HOUTE, 1994**, o qual propõe uma relação dinâmica entre a microbiota da placa dental, dieta contendo carboidratos, saliva, a queda de pH e o potencial cariogênico da placa, com o hospedeiro. Os *S. sobrinus* apresentam alta cariogenicidade em experimentos com animais expostos à sacarose, podendo observar-se lesões em todas as superfícies dentárias. Portanto, a colonização por *S. sobrinus* (Tabela 6), aproximadamente 20% maior que o grupo controle, pode ter sido responsável pela maior severidade de lesões apresentada pelo grupo da teofilina.

Também, o efeito cariogênico apresentado pela teofilina na severidade de cárie poderia estar relacionado ao seu efeito diurético. Seria esperado que o efeito diurético das xantinas alterasse de forma significativa o fluxo salivar dos animais. As metilxantinas, em especial a teofilina, aumentam a diurese, e os padrões de excreção aumentada de água e eletrólitos são semelhantes aos dos diuréticos tiazídicos. Em muitos estudos animais, a teofilina aumentou a taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal, efeitos relacionados ao antagonismo da droga aos receptores da adenosina (**SERAFIN et al., 1996**). Sugere-se que, sendo o efeito diurético da teofilina mais acentuado que o da cafeína, haveria diminuição do fluxo salivar e, portanto, aumento do risco de cárie. **DENADAI, 1995**, relata haver tolerância aos efeitos diuréticos da cafeína, o que não ocasionaria alterações potencialmente significativas no fluxo salivar.

Não houve, em nosso experimento, diferença estatisticamente significativa no fluxo salivar, no pH e na capacidade tampão (Tabela 7) entre os grupos teofilina e controle. Verificamos ainda que o grupo da cafeína apresentou pH maior e estatisticamente diferente dos demais grupos; embora o fluxo salivar não tenha sido estatisticamente diferente do grupo da teofilina, porém estatisticamente diferente e menor que o grupo controle. A

capacidade tampão frente a um volume conhecido de ácido não diferiu estatisticamente do grupo controle.

Sabe-se que o aumento no fluxo salivar causa aumento do pH e da capacidade tampão da saliva, devido à menor reabsorção de bicarbonato pelas células do ducto estriado das glândulas salivares (**WHELTON, 1996**). A cafeína apresentou fluxo salivar menor que os demais grupos, o que acarretaria em maior reabsorção de bicarbonato (principal sistema tampão da saliva). Entretanto, este efeito não interferiu no valor de pH, que foi significativamente maior que os demais grupos, porém ocasionou uma diminuição da capacidade tampão do grupo da cafeína em relação ao grupo teofilina sem, no entanto, diferir do grupo controle.

O efeito diurético da teofilina não alterou significativamente o fluxo salivar dos animais, não havendo conseqüentemente diminuição na capacidade tampão. Tem sido proposto que a manutenção da concentração terapêutica da teofilina durante um intervalo de doses de 12 h depende de uma taxa de absorção ideal constante, de cerca de 8,3% a cada hora, segundo **HENDELES, 1988**. Este autor afirma ainda que doses múltiplas promovem tolerância aos efeitos diuréticos.

Em nosso experimento, a teofilina e a cafeína foram administradas de forma contínua a cada 1 h, por um período total de 17 h diárias, o que poderia ter ocasionado a tolerância ao efeito diurético da teofilina, e portanto não foram observadas alterações no fluxo salivar. Estes resultados sugerem que a teofilina poderia promover alterações nos componentes orgânicos da saliva, e não nas concentrações de bicarbonato.

Estudo de **WATSON et al., 1990** relata que a administração de um β -bloqueador adrenérgico, o propranolol, a ratos submetidos a desafio

cariogênico, não altera o fluxo salivar, mas diminui a expressão de proteínas ricas em prolina (PRPs) e conseqüentemente aumenta sua susceptibilidade à cárie dental, efeito confirmado em estudos posteriores (**NEDERFORS et al., 1994; JENSEN et al., 1994**), que ainda detectaram alterações na secreção de outros fatores de proteção salivares, como as estaterinas e as histatinas.

Uma vez constatada a importância dos receptores β -adrenérgicos na secreção de macromoléculas, estudos com fármacos β -agonistas como o isoproterenol, demonstraram um aumento na secreção de mucina pelas glândulas salivares de camundongos (**DENNY et al., 1992**). A teofilina, assim como o isoproterenol, aumenta as concentrações intracelulares de AMPc, podendo ter efeitos semelhantes sobre as concentrações salivares dessa proteína.

As mucinas são glicoproteínas cujas funções principais são promover a agregação bacteriana e facilitar a eliminação de microrganismos da cavidade oral por deglutição (**HAY & BOWEN, 1996**), e, opostamente, promover a formação de placa dental, agindo como receptores de adesão bacteriana à película adquirida de esmalte (PAE) e à placa, e ainda como substrato nutritivo para o crescimento e divisão bacteriana na placa (**SCANNAPIECO & LEVINE, 1995**).

A saliva humana contém dois tipos de mucinas, as de alto peso molecular, denominadas MG1 e as de baixo peso molecular, denominadas MG2. **IONTCHEVA et al., 1997**, detectaram a presença de complexos heterotípicos formados pela interação das mucinas tipo MG1 com outras proteínas salivares, como a amilase, as PRPs, histatinas e estaterinas. Estudos imunológicos realizados por AL HASHIMI & LEVINE, 1989, citados por **IONTCHEVA et al., 1997**, mostraram que MG1, amilase, PRPs e estaterina são os principais precursores da PAE inicial in vivo, e a formação

de complexos entre essas proteínas sugere que possivelmente a PAE é formada por adesão de complexos heterotípicos e não de proteínas isoladas.

A amilase hidrolisa carboidratos que se ligam a um grupo de estreptococos orais de alta afinidade, o *Streptococcus sanguis* (**SCANNAPIECO & LEVINE, 1995**). Segundo **IONTCHEVA et al., 1997**, a amilase de um complexo MG1-amilase aderida ao dente poderia liberar carboidratos da MG1, promovendo uma rápida fonte de nutrientes para os microrganismos aderidos, além de criar um ambiente propício para adesão bacteriana.

Os dados microbiológicos (Tabela 6) e os índices de cáries (tabelas 3 e 4) apresentaram uma correlação positiva, sugerindo que a teofilina facilitaria a colonização por *S. sobrinus*, efeito relacionado a um possível aumento nas concentrações salivares de mucina, como descrito por **WATSON et al., 1990**, para o isoproterenol. Sugere-se que experimentos complementares sejam realizados para verificar alterações na secreção de mucina, em particular a MG1 e seus possíveis complexos.

Além dos efeitos de xantinas sobre o desenvolvimento de cárie dental em ratos, nosso experimento avaliou também o efeito tóxico decorrente da administração crônica de cafeína e teofilina sobre a mucosa gástrica de ratos. Os resultados (Tabela 8) mostraram que ambas as xantinas causaram um maior índice de úlcera gástrica em relação à dieta. Os animais do grupo controle também apresentaram sinais de ulceração, embora significativamente menores que os observados nos animais tratados com as xantinas. A dieta contendo 56% de açúcar refinado, o estresse causado pelo longo período de experimentação de 5 semanas e a utilização da máquina de alimentação programada podem ter contribuído para a obtenção destes resultados no grupo controle.

A formação de úlcera gástrica promovida pela utilização de teofilina e cafeína parece ser mediada pela capacidade destas drogas em inibir os receptores centrais da adenosina. **WESTENBERG & GEIGER, 1987**, demonstraram que os efeitos do estresse sobre o desenvolvimento de úlcera gástrica em ratos poderiam ser reduzidos pela administração de um análogo da adenosina, e esse efeito foi antagonizado por análogos da teofilina, 8-sulfofenilteofilina e 8-fenilteofilina administrados central e periféricamente.

Outros mecanismos de ação das xantinas podem estar relacionados ao desenvolvimento de úlcera gástrica. O cálcio atua como um segundo mensageiro nos mecanismos de ativação das células oxínticas e um aumento na concentração de AMPc promove aumento na secreção gástrica. **SUBERO et al., 1989**, demonstraram que a teofilina estimula a secreção de ácido gástrico e aumenta o metabolismo do glicogênio em preparações de estômago de sapo, por inibição da fosfodiesterase, com aumento dos níveis intracelulares de AMPc e por exercer efeitos diretos na concentração de cálcio intracelular, aumentando-a.

Os efeitos da cafeína sobre o desenvolvimento de úlcera péptica foram discutidos por **MAROTTA & FLOCH, 1991**. Revisando os principais aspectos dietéticos relacionados à etiologia da úlcera, estes autores concluíram que embora o café estimule a secreção gástrica, bebidas descafeinadas apresentam padrões de secreção semelhantes, o que tornaria o papel da cafeína questionável. Ainda assim, 95% dos gastroenterologistas entrevistados nesse estudo concordaram em abolir o café da dieta de pacientes sintomáticos.

Um estudo de **VAN DEVENTER et al., 1992** comparou os efeitos secretórios de bebidas cafeinadas e descafeinadas em humanos e constatou que a presença de cafeína levou à diminuição da pressão do esfíncter

esofagiano, à maior secreção de ácido gástrico e a maiores níveis sangüíneos de gastrina, hormônio que estimula a secreção ácida pelas células parietais.

Os mecanismos descritos anteriormente e ora propostos para a cafeína e teofilina como agentes potencialmente ulcerogênicos podem talvez explicar os resultados obtidos em nosso experimento, que apontam para as duas drogas adicionadas à dieta cariogênica e seu uso crônico como causadoras de úlcera gástrica em ratos.

9. CONCLUSÃO

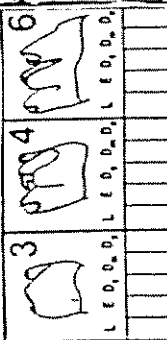
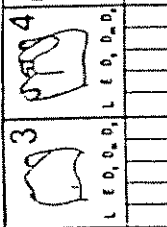
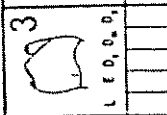
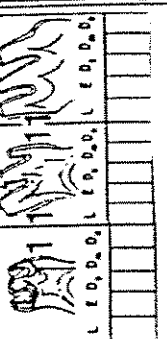
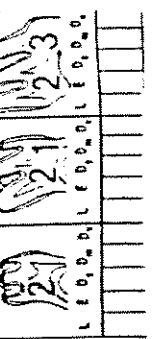
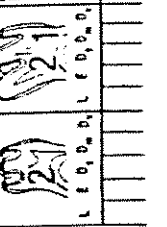
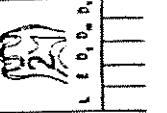
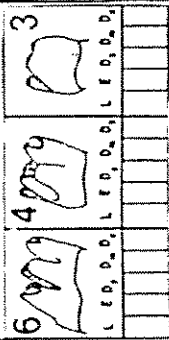
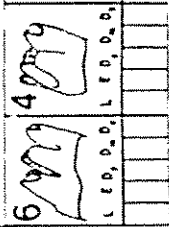
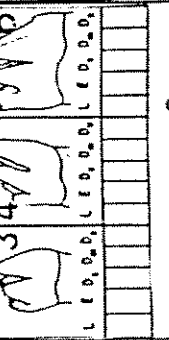
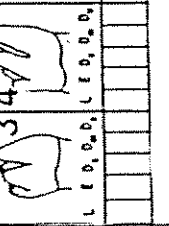
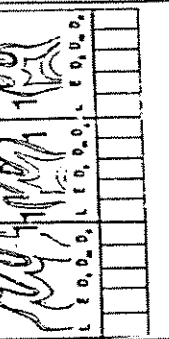
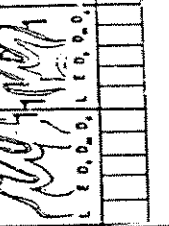
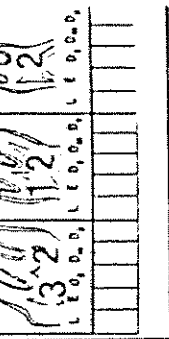
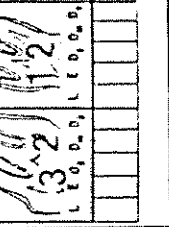
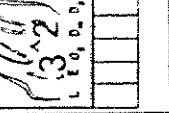
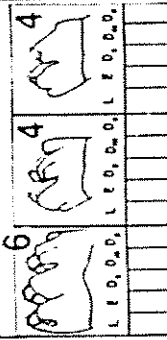
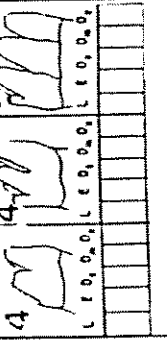
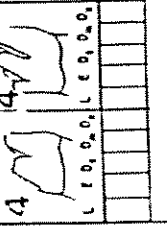
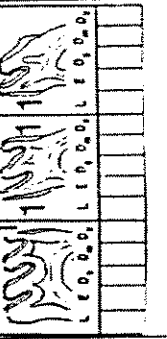
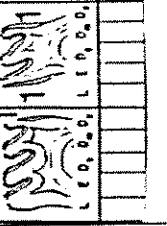
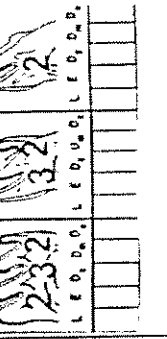
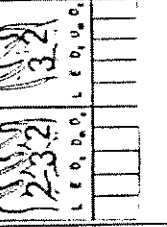
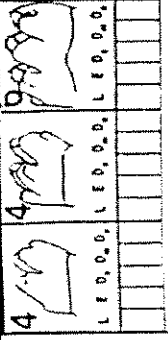
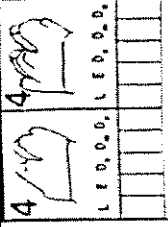
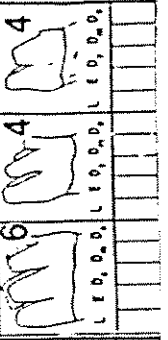
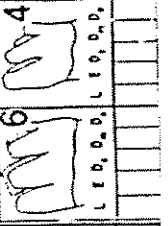
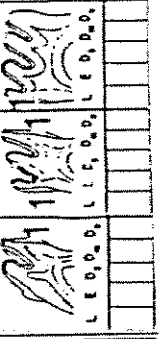
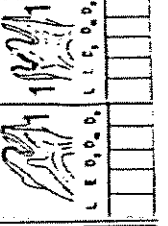
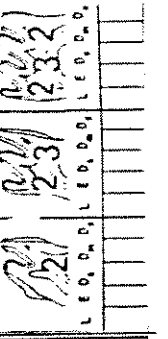
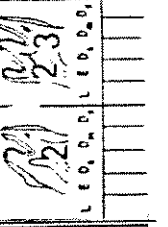
- 1) A teofilina aumenta o potencial cariogênico da dieta no modelo proposto, quando comparada aos outros tratamentos, e esse efeito pode estar relacionado com um aumento na colonização das estruturas dentárias por *S. sobrinus*.
- 2) O aumento da porcentagem de colonização por *S. sobrinus* nos animais tratados com teofilina não está relacionado ao fluxo salivar, ao pH ou à capacidade tampão. É possível que esse efeito esteja associado a alterações na secreção de componentes orgânicos da saliva.
- 3) A cafeína não altera o potencial cariogênico da dieta no modelo estudado.
- 4) A administração crônica de cafeína e teofilina, associadas à dieta, promove alterações na mucosa gástrica, sendo assim necessário cautela na administração destas drogas.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Formulação da Dieta 2000.

	g/kg
leite em pó desnatado	280,0
alfafa (17% proteína)	30,0
fígado dessecado	10,0
extrato de levedura (pó)	40,0
farinha de trigo integral	60,0
sacarose pó (Glaçúcar®)	560,0
sal iodado	20,0

Anexo 2 - Diagrama de Keyes

	Bucal			Lingual			Proximal			Sulco		
maxila esquerda												
maxila direita												
mandibula esquerda												
mandibula direita												

	L	E	Ds	Dm	Dx
Bucal					
Lingual					
Proximal					
Sulco					
Morsal					

Anexo 3 – Formulário para determinação de índice de úlcera gástrica.

DIAGNÓSTICO DE LESÕES DE ÚLCERA

Animal # _____

Parâmetro	Índice	Valor encontrado
estômago normal	0	
perda da morfologia normal da mucosa	1	
descoloração cinza da mucosa	1	
edema da mucosa	1	
hemorragias	1	
pontos de petéquias (1-9)	2	
pontos de petéquias (≥ 10)	3	
erosões ulcerosas ≤ 1 mm	$n \times 2^a$	
erosões ulcerosas > 1 mm	$n \times 3$	
úlcera perfurada	$n \times 4$	
VALOR TOTAL		

^a n = nº de lesões ulcerosas encontradas.

Ref. Souza-Formigoni et al. J. Ethnopharmacology 34: 21-27, 1991.

Observação:

---	--

11. SUMMARY

Previous studies have demonstrated that caffeine (xanthine group) administered orally to rats could increase their susceptibility to dental caries. Theophylline is another largely consumed xanthine used in the treatment of asthma and during its metabolism pathway is converted in caffeine, markedly in neonates. The purpose of our study was to evaluate the influence of caffeine and theophylline on the development of dental caries, using rats subjected to a cariogenic challenge. Six Wistar dams (spf), mutans streptococci free, were obtained from CEMIB/Unicamp with six male pups each. The dams were infected by *Streptococcus sobrinus* 6715 and divided in three groups that received, during the lactating period (22 days): group (1) diet 2000 and sterile distilled water (sdw) ad libitum; (2) diet 2000 plus caffeine (2 mg/100 g body weight) and sdw; ad libitum; (3) diet 2000 plus theophylline (0,57 mg/100 g body weight) and sdw, ad libitum. After weaned, the pups were infected by *S. sobrinus* 6715. When aged 26 days they were placed in a König-Höfer programmed feeder, that offered 17 meals daily at hourly intervals, in order to intake the same diet their dams received, as described above, for five weeks. Data from microbial assesment, Keyes caries score, salivary flow rates, pH, buffering capacity and ulcer scores were analyzed by ANOVA and Tukey-Kramer HSD test. The percentage of *S. sobrinus* related to the total flora was significantly higher in the theophylline group than caffeine and control groups: (1) 69.55; (2) 78.77; (3) 88.06. Smooth-surface and [sulcal] scores were: (1) 48.8 [43.75]; (2) 46.33 [39.42]; (3) 53.33 [48.08]. Total smooth-surface caries scores were not statistically diferent for the groups ($p < 0.01$). Total sulcal score for the theophylline group was not statistically different from the control group, but higher than the caffeine group, and statistically diferent. The results for slight (Ds) and moderate [Dm] dentine lesions were higher and statistically different for the theophylline group than caffeine and control groups, which

values were: (1) 8.0 [0.5]; (2) 6.91 [0.5]; (3) 14.0 [3.5] for smooth-surface and (1) 25.5 [3.5]; (2) 19.66 [2.41]; (3) 32.83 [9.33] for sulcal scores. There were no statistically significant difference for the results of salivary flow rate, pH and salivary buffering capacity between the control and theophylline groups. The results for salivary flow rates in the caffeine group were smaller than the other groups but not different from the theophylline group. Although the pH values for caffeine group were statistically higher than the other ones, the results of salivary buffering capacity showed that both caffeine and theophylline groups were not statistically different from the control group. The values of pH and [salivary buffering capacity] were: (1) 9.23 [8.37]; (2) 9.41 [8.13]; (3) 9.25 [8.55]. The results for salivary flow rate expressed as mL/min and [ulcer scores] were: (1) 0.065 [0.5]; (2) 0.040 [3.0]; (3) 0.048 [2.0]. The ulcer scores for the caffeine and theophylline groups were statistically higher than the control group. It is concluded that theophylline can increase the development of dental caries, compared to sucrose and sucrose plus caffeine, and this effect may be related to organic alterations of salivary composition.

Key words: Dental caries, caffeine, theophylline (pharmacology), saliva-assay, peptic ulcer, rat.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 1) ARBEIT, M.L. et al. Caffeine intake of children from a biracial population: The Bogalusa Heart Study. J. Am. Dietetic. Ass., Chicago, v.88, p.466-471, 1988.
- 2) BARONE, J.J., ROBERTS, H. Caffeine consumption. In: CAFFEINE WORKSHOP, 7., 1993, Santorini. Anais. Washington: International Life Sciences Institute, 1993. p.1-5.
- 3) BATIRBAYGYL, Y., QUINBY, G.E., NAKAMOTO, T. Effects of orally-administered caffeine on the growth of tooth germs in protein-energy malnourished newborn rats. Archs Oral Biol., Oxford, v. 30, p.583-585, 1985.
- 4) BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. Ann. Ver. Med., n.41, p.277-288, 1990.
- 5) BOWEN, W.H., PEARSON, S. Effect of ions co-crystallized with sugar on caries in desalivated rats. J. Dent. Res., Washington, v.71, p.522, 1992.
- 6) _____, _____, YOUNG, D.A. The effect of desalivation on coronal and root surface caries. J. Dent. Res., Washington, v.67, p.21-23, 1988.
- 7) _____. et al. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. J. Am. Dent. Ass., Chicago, v. 100, p.677-681, 1980.

¹ De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos periódicos conforme o "World List Of Scientific Periodical".

-
- 8) _____. et al. Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. *Caries Res.*, Basel, v.17, p.466-471, 1983.
- 9) BOWEN, W.H. et al. The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat. In: LEACH, S. (Ed.) *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth*. Oxford : IRL Press, 1986. P. 243-250.
- 10) BRATHALL, D., ERICSSON, D. Testes para determinar o risco de cárie. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.4, p.71-88.
- 11) CAMARGO, M.C.R. Avaliação da ingestão potencial de cafeína pela população de Campinas. Campinas, 1996. 131p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 12) CARLSSON, J., HAMILTON, I. Atividade metabólica das bactérias orais. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.4, p.71-80.
- 13) CHESTON, M.B et al. Disposition of dietary caffeine in milk, saliva and plasma of lactating women. *Pediatrics*, New York, v.73, n.1, Jan. 1984.
- 14) DAS, S. et al. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweetener stevioside and rebaudioside A. *Caries Res.*, Basel, v. 26, n. 5, p. 363-366, 1992.

-
- 15) DENADAI, B.S. Cafeína e atividade física: efeitos sobre o metabolismo e a performance. *Revta. Cienc. Tec.*, Piracicaba, p.7-14, 1995.
 - 16) DENNY, P.A. et al. Increased mucin levels in submandibular saliva from mice following repeated isoproterenol treatment. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v. 37, n.1, p.73-75, 1992.
 - 17) EDGAR, W.M. et al. Acid production in plaques after eating snacks: modifying factors in foods. *J. Am. Dent. Ass.*, Chicago, v.90, p.418-426, 1975.
 - 18) FALSTER, A.U. et al. Physical examination of caffeine's effects on the enamel surface of first molar in newborn rats. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v.37, p.111-118, 1992.
 - 19) GEDDES, D.A. Relação dos estudo in vitro com os problemas clínicos. In: BOWEN, W.H., TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995. p. 197-205.
 - 20) GILBERT, E.F., PISTEY, W.R. Effect on the offspring of repeated caffeine administration to pregnant rats. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.34, p.469-499, 1973.
 - 21) GOLD, O.G., JORDAN, H.V., VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v.18, p.1357-1364, 1973.
 - 22) GRAHAM, D.M. Caffeine - its identity, dietary sources, intake and biological effects. *Nutr. Ver.*, New York, v.36, n.4, p.97-102, abril, 1978.

-
- 23) HALLSWORTH, A. S., WEATHERELL, J.A., ROBINSON, C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Res.*, Basel, v.7, n.4, p.345-348, 1973.
- 24) HAMADA, S., SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.44, n.2, p.331-384, 1980.
- 25) HASHIMOTO, K. et al. Effects of maternal caffeine intake during lactation on the molar enamel surfaces in newborn rats. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v. 37, p.105-109, 1992.
- 26) HAY, D.I., BOWEN, W.H. The functions of salivary proteins. In: EDGAR, W.M., O'MULLANE, D.M. *Saliva and oral health*. London: British Dental Association, 1996, cap.8, p.105-122.
- 27) HENDELES, L. et al. Theophylline. In: MIDDLETON, E. (Ed.) *Allergy: principles and practice*. [s.n.t.] p 673-714, 1988.
- 28) IONTCHEVA, I., OPPENHEIM, F.G., TROXLER, R.F. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotipic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin , and histatins. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.734-743, Mar. 1997.
- 29) JENSEN et al. Physiological regulation of the secretion of histatins and statherins in human parotid saliva. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.12, p.1811-1817, 1994.

-
- 30) KAWANABE, J. et al. Noncariogenicity of erythritol as a substrate. *Caries Res.*, Basel, v.26, p.358-362, 1992.
- 31) KHANNA, N.N., SOMANI, S.M. Use of salivary concentrations in the prediction of serum caffeine and theophylline concentrations in premature infants. *J. Pediatr.*, St. Louis, v. 96, p.494-499, 1980.
- 32) KEYES, P.H. Dental caries in the molar teeth of rats. I. Distribution of lesions induced by high carbohydrate low-fat diets. *J. Dent. Res.*, Washington, v.37, p.1077-1087, 1958a.
- 33) _____. Dental caries in the molar teeth of rats. II. A method for diagnosis and scoring several types of lesions simultaneously. *J. Dent. Res.*, Washington, v.37, p.1088-1099, 1958b.
- 34) _____. Dental caries in the Syrian hamster. VIII. The induction of rampant caries activity in albino and golden animals. *J. Dent. Res.*, Washington, v.38, p.525-533, 1959.
- 35) _____. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.1, p.304-320, Mar. 1960.
- 36) KÖNIG, K.G., SCHIMID, P., SCHIMID, R. An apparatus for frequency-controlled feeding of small rodents. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v. 13, p.13-26, 1968.

-
- 37) KRASSE, B. Historical survey of animals in caries research. In: TANZER, J.M. (Ed.) Animal Models in Cariology Microbiological Abstract. Washington : IRL Press, 1981. p.11-17.
- 38) LARSON, R.H. Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes method. In: TANZER, J.M. (Ed.) Animal Models in Cariology, Microbiological Abstract. Washington : IRL Press, 1981. P. 195-203.
- 39) LARSON, R.H., RUBIN, M., ZIPKIN, I. Frequency of eating as a factor in experimental caries. Archs Oral Biol., Oxford, v. 7., p.463-468, 1962.
- 40) _____. et al. Collaborative evaluation of a rat caries model in six laboratories. J. Dent. Res., Washington, v. 56, n.8, p.1007-1012, Aug. 1977.
- 41) LEGLER, D.W., MENAKER, L. Definição, etiologia, epidemiologia e implicações clínicas da cárie dentária. In: MENAKER, L. Cáries dentárias: bases biológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.186-199.
- 42) LOESCHE, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol. Ver., Washington, v.50, n.4, p.353-380, 1986.
- 43) _____. Metabolismo de carboidratos pelos microrganismos de placa. In: LOESCHE, W.J. Cárie dental: uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993, cap.9, p.103-127.
- 44) _____. et al. Enhancing the virulence of Streptococcus sobrinus in rats. J. Dent. Res., Washington, v. 70, p.38-43, 1991.

-
- 45) MAROTTA, R.B, FLOCH,, M.H. Diet and nutrition in ulcere disease. Med. Clin. North Am., Philadelphia, v.75, n.4, Jul. 1991.
- 46) MUNDORFF-SHRESTHA, S.A., et al. Cariogenic potencial of foodstuffs. II. Relationship of food composition, plaque microbial counts, and salivary parameters to caries rats model. Caries Res., Basel, v. 28, p.106-115, 1994.
- 47) NAKAMOTO, T., SHAYE, R. Protein-energy malnutrition in rats during pregnancy modifies the effects of caffeine on fetal bones. J. Nutr., Philadelphia, v. 116, p.633-640, 1986.
- 48) NAKAMOTO, T., SHAYE, R., MALLEK, H.M. Effects of maternal caffeine intake onthe growth of rat tooth germs in protein-energy malnourished neonates. Archs Oral Biol., Oxford, v. 30, p.105-109, 1985.
- 49) _____. et al. Cariogenic effect of caffeine intake during lactation on first molars of newborn rats. Archs Oral Biol., Oxford, v. 38, p.919-922, 1993.
- 50) NEDERFORS, T. et al. Effects of the β -adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human parotid and submandibular-sublingual salivary secretion. J. Dent. Res., Washington, v. 73, n.1, p.5-10, Jan. 1994.
- 51) NEHLIG, A., DEBRY, G. Caffeine and sports activity: A review. Int. J. Sports Med., Stuttgart, n.5, p.215-223, 1994.

-
- 52) NEWBRUN, E., FROSTELL, G. Sugar restriction and substitution for caries prevention. *Caries Res.*, Basel, v. 12, p.65-73, 1978. [Supplement, 1]
- 53) NEWTON, R. et al. Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, New York, v.21, p.45-52, 1981.
- 54) OOSHIMA, T., et al. Noncariogenicity of maltitol in specific pathogen free rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.*, Basel, v. 26, p.33-37, 1992.
- 55) _____. et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.*, Basel, v. 27, 124-129, 1993.
- 56) PARSONS, W.D., PELLETIER, J.G. Delayed elimination of caffeine by women in the last 2 weeks of pregnancy. *Can. Med. Ass. J.*, Ottawa, v.127, n.5, p.377-380, 1982.
- 57) ROBERTSON, D., et al. Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *J. clin. Invest.*, New York, n.67, p.1111-1117, 1981.
- 58) ROSALEN, P.L., BOWEN, W.H., PEARSON, S.K. Effect of copper co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. *Caries Res.*, Basel, v.30, n.5, p.367-372, Sept/Oct., 1996a.

-
- 59) _____, PEARSON, S.K., BOWEN, W.H. Effect of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.41, n.11, p.1003-1010, Nov., 1996b.
- 60) ROSALEN, P.L., VOLPATO, M.C., RUENIS, A.P.D.B. Cariogenic potential of a typical cassava flour from the amazonic region of Brazil. *Indian. J. Dent. Res.*, Calcutta, v.8, n.3, p.72-76, Jul., 1997.
- 61) SCANNAPIECO, F.A., LEVINE, M.J. Mucinas salivares e formação da placa dental. In: BOWEN, W.H., TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995. p.85-106.
- 62) SCHILLING, K.M., BOWEN, W.H. The activity of glucosyltransferase Adsorbed onto saliva -coated hydroxyapatite. *J. Dent. Res.*, Washington, v.67, n.1, p.2-8, 1988.
- 63) SERAFIN, W.E. Drugs used in the treatment of asthma. In: HARDMAN, J.G. (Ed.) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 9. ed. [s.l.] : McGraw-Hill, 1996. p.650-682.
- 64) SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J.Ethnopharmacol.*, Ireland, v.34, p.21-27, 1991.
- 65) STAVRICK, B. Methylxanthines: toxicity to humans. II. Caffeine. *Food Chem. Toxicology*, Elmsford, v.26, n.7, 1988, p.645-622.

-
- 66) SUBERO, O., LOBO, P., CHACÍN, J. Ca^{+2} requirement for metabolic effects of secretagogues in the amphibian gastric mucosa. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.257, p.G969-G976, 1989.
- 67) TANZER, J.M. On designing animal model experiments on caries. In: TANZER, J.M. (Ed.) *Animal Models in Cariology Microbiological Abstract*. Washington : IRL Press, 1981. p.143-149.
- 68) TEN CATE, J.M., REMPT, H.E. Comparison of the in vivo effect of a 0 and 1,500 ppm F MFP toothpaste on fluoride uptake, acid resistance and lesion demineralization. *Caries Res.*, Basel, v.20, p.193-201, 1986.
- 69) TENOVUO, J., LAGERLÖF, F. Saliva. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.2, p.17-43.
- 70) TROXLER, R.F. et al. Structural relationship between human salivary histatins. *J. Dent. Res.*, Washington, v.69, p.2-6, 1990.
- 71) WATSON, G.E. et al. The effect of chronic propranolol treatment on salivary composition and caries in rats. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v.35, n.6, p.435-441, 1990.
- 72) WESTENBERG, V.S., GEIGER, J.D. Central effects of adenosine analogs on stress-induced gastric ulcer formation. *Life Sci.*, Elmsford, v.41, n.19, p.2201-2205, Nov. 1987.

-
- 73) WHELTON, H. Introduction: the anatomy and physiology of salivary glands.
In: EDGAR, W.M., O'MULLANE, D.M. Saliva and oral health. London:
British Dental Association, 1996, cap.1, p.1-8.
- 74) VAN DEVENTER, G. et al. Lower esophageal sphincter pressure, acid
secretion, and blood gastrin after coffee consumption. Dig. Dis.Sci., New
York, v.37, n.4, p.558-569. Apr. 1992.
- 75) VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. J.Dent.Res.,
Washington, v.73, p.672-681, 1994.
- 76) VON BORSTEL, R.W. Metabolism. Food technology, Chicago, v.37, n.9, p.40-
44, 1983.