

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CÍNTIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY<sup>AA</sup>  
FARMACÊUTICA-BIOQUÍMICA

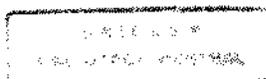
**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
FLÚOR E DIFERENTES NÍVEIS DE DESAFIO  
CARIOGÊNICO NO DESENVOLVIMENTO DE  
CÁRIE DENTAL EM RATOS DESSALIVADOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba, da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do "Título de Doutor  
em Ciências: Área de Farmacologia"

*Este trabalho foi devidamente  
corrigido conforme parecer  
CCPG 036/83  
Piracicaba, 26 de setembro de 1997  
Jaime*

**ORIENTADOR:**  
Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY *AC*

Piracicaba - SP  
1997



9719486

UNIDADE	7BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	T/322
V.	Ex
IMPRESSO	31992
IMPRESSO	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/11/97
N.º CPD	

CM-00102280-4

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

<p>Title 3122</p>	<p>Tabchoury, Cinthia Pereira Machado.  Efeito de diferentes concentrações de flúor e diferentes níveis de desafio cariogênico no desenvolvimento de cárie dental em ratos dessalivados / Cinthia Pereira Machado Tabchoury. - Piracicaba : [s.n.], 1997.  83f. : il.  Orientador : Jaime Aparecido Cury.  Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.  1. Cáries dentárias. 2. Fluoretos. 3. Ratos como animal de laboratório. 4. Sacarose. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">19.CDD - 617.67  - 661.42</p>
-----------------------	--

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Cárie dental	617.67
2. Flúor	661.42



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em 10/09/97, considerou o candidato aprovado.

1. Jaime Aparecido Cury

2. Pedro Luiz Rosalen

3. William H. Bowen

4. Sérgio Luiz de Souza Salvador

5. Odila Pereira da Silva Rosa

**“Conhecimento científico cresce como uma árvore, não como uma compilação de itens de um colecionador. Fatos, observações, descobertas, como itens, são os nutrientes a partir dos quais a árvore do conhecimento se alimenta, e não até que eles tenham sido totalmente absorvidos e assimilados, terão eles verdadeiramente aumentado o corpo do conhecimento.”**

**Paul Weiss**

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

ao meu marido, **Wiliam**, pelo apoio, amor, carinho e por ter compreendido a minha ausência necessária para a realização deste trabalho;

aos meus pais, **Jacinto e Darcy**, pelo grande incentivo e apoio, direcionando-me aos melhores caminhos;

aos meus irmãos, **Glaúcio, Ronan e Tais**, motivo de alegria e de muitas lembranças.

com carinho

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Doutor **Jaime A. Cury**, Professor Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas - Área de Bioquímica, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade, incentivo para a realização deste trabalho em Rochester, por acreditar que eu era capaz e por toda a colaboração e apoio sempre disponíveis.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Doutor **William H. Bowen**, Welcher Professor of Dental Research, da Universidade de Rochester, pela grande oportunidade oferecida para a realização deste trabalho sob sua orientação, pelos ensinamentos e por ter sido sempre tão atencioso e solícito aos meus pedidos.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. **José Ranali**;

Ao Prof. Dr. **Pedro L. Rosalen**, atual coordenador do Curso de Farmacologia, pela amizade, apoio e sugestões;

A todos os **Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia**, pelos ensinamentos;

À Prof. Dra. **Altair A. Del Bel Cury**, pela amizade, otimismo e exemplo de competência;

À Sra. **Mariza Jesus Carlos Soares**, Sr. **Waldomiro Vieira Filho**, Sr. **José Alfredo Silva**, pela amizade, encorajamento, assistência e paciência dispensados durante todo o Curso de Pós-Graduação;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Oral, **Augusta, Eliane, Helena, Michel, Paulo, Rosa, Silvana**, pelo apoio e amizade, em especial à **Eliane**, pela confecção dos slides;

À Srta. **Maria Elisa dos Santos**, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela inestimável ajuda e disponibilidade;

À Sra. **Susan Lukas**, ex-secretária do Depto of Dental Research, por eficientemente ter me auxiliado na preparação antes de ir para Rochester e pela demonstração de carinho após minha chegada;

À Srta. **Sylvia Pearson**, chefe do laboratório no Depto of Dental Research, pelos ensinamentos, idéias e conselhos que eu nunca serei capaz de esquecer;

À Sra. **Jeanette Mckell**, técnica do laboratório no Depto of Dental Research, pelo auxílio laboratorial, mas principalmente, pela amizade, incentivo e espírito extremamente positivo que tornaram minha estadia em Rochester muito mais iluminada;

Ao Dr. **Gene Watson**, Professor, e **Bianca Davis**, aluna de Pós-graduação, da Universidade de Rochester pelo auxílio eficiente nas cirurgias de desalivação dos animais;

À **Linda NG, Miguel Velásquez e Thomas Holt** pela amizade, apoio e inestimável colaboração na execução da fase laboratorial;

Aos **Professores do Depto of Dental Research**, pela possibilidade de uma convivência científica;

Às secretárias do Depto of Dental Research, **Constance Cahill, Doris, Jean, Pat Foster, Pat Noonan**, pelo auxílio e disponibilidade;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro durante o Doutorado;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, processo no. 20135995-2, pelo apoio financeiro através da Bolsa Doutorado Sanduíche, que tornou possível a minha ida para Rochester,

À Sra. **Heloísa Maria Ceccotti**, bibliotecária da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda nas referências bibliográficas,

E a todas aquelas pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram e auxiliaram para que este trabalho pudesse ter sido realizado.

## SUMÁRIO

	página
1. LISTAS .....	1
1.1 Listas de Tabelas.....	2
1.2 Lista de Figuras.....	3
1.3 Lista de Abreviaturas.....	4
2. RESUMO.....	5
3. INTRODUÇÃO.....	8
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
5. PROPOSIÇÃO.....	28
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.1 Experimento I.....	31
6.2 Experimento II.....	33
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Experimento I.....	42
7.2 Experimento II.....	51
8. DISCUSSÃO.....	60
9. CONCLUSÃO.....	68
10. ANEXOS.....	70
11. SUMMARY.....	73
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. LISTAS

## 1.1 LISTA DAS TABELAS

	<b>página</b>
<b>Tabela 1.</b> Horário no qual as refeições de sacarose foram oferecidas em função da frequência.....	35
<b>Tabela 2.</b> Ganho de peso (g) dos animais expostos a diferentes concentrações de flúor.....	42
<b>Tabela 3.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade.....	43
<b>Tabela 4.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie nas diferentes superfícies lisas.....	45
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de redução de cárie nas diferentes superfícies lisas.....	45
<b>Tabela 6.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.....	47
<b>Tabela 7.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor na microbiota total e de <i>S. sobrinus</i> .....	49
<b>Tabela 8.</b> Ganho de peso (g) dos animais expostos ao flúor e diferentes desafios cariogênicos.....	51
<b>Tabela 9.</b> Número de refeições consumidas.....	51
<b>Tabela 10.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade.....	53
<b>Tabela 11.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.....	56
<b>Tabela 12.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos na microbiota total e de <i>S. sobrinus</i> .....	58

## 1.2 LISTA DAS FIGURAS

	página
<b>Figuras 1 e 2.</b> Obtenção de esfregaço bucal dos animais e inoculação em meio de cultura..	31
<b>Figuras 3, 4 e 5.</b> Máquina de alimentação programada König-Höfer. Gaiolas individuais com o prato rotatório na parte de frente e bandejas com as refeições de sacarose.....	34
<b>Figura 6.</b> Intubação gástrica com administração de dieta líquida NCP#2.....	36
<b>Figuras 7, 8 e 9.</b> Remoção da hemimandíbula esquerda. Sonicação das amostras. Inoculação da suspensão e diluição 1:100 em meio de cultura utilizando máquina de "spiral plater".....	37
<b>Figura 10.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade. ....	44
<b>Figura 11.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie nas diferentes superfícies lisas .....	46
<b>Figura 12.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.....	48
<b>Figura 13.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor na microbiota total e de <i>S. sobrinus</i> ( $10^7$ ).....	50
<b>Figura 14.</b> Influência de diferentes concentrações de flúor na porcentagem de <i>S. sobrinus</i> .....	50
<b>Figura 15.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade.....	54
<b>Figura 16.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.....	57
<b>Figura 17.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos na microbiota total e de <i>S. sobrinus</i> ( $10^6$ ).....	59
<b>Figura 18.</b> Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos na porcentagem de <i>S. sobrinus</i> .....	59

### 1.3 LISTA DAS ABREVIATURAS

**ADE** - água destilada estéril

**CPO-D** - número de dentes cariados, perdidos e obturados

**DCCD** - diciclohexilcarbodiimida

**F** - termo genérico para definir as formas iônica ( fluoreto ou íon flúor), ionizável e não ionizável do elemento flúor

**GTF** - glicosiltransferase

**MSA** - ágar mitis salivarius

**MSB** - ágar mitis salivarius mais bacitracina

**MSS** - ágar mitis salivarius mais estreptomicina

**NIH** - National Institute of Health

**OCP** - fosfato octacálcio

**ppm** - partes por milhão

**SDA** - vírus sialodacrioadenite

**SDW** - sterile distilled water

**UFC** - unidades formadoras de colônias

## **2. RESUMMO**

## 2. RESUMO

Cárie dental é uma doença infecciosa multifatorial que ainda afeta a maioria da população e apresenta como fator de grande importância no seu desenvolvimento a presença de carboidratos, principalmente a sacarose. Porém, sua incidência tem sido eficazmente controlada com a introdução do flúor, um agente anticariogênico. Entretanto, o uso isolado de flúor tem efeito limitado e seu efeito protetor sob uma condição de alto risco não está esclarecido. Além disso, a variabilidade apresentada no efeito do F talvez possa ser explicada por diferenças na intensidade do desafio cariogênico. Desta forma, este trabalho foi dividido em 2 experimentos. O objetivo do experimento I foi avaliar o efeito pós-eruptivo de diferentes concentrações de F presente na água no desenvolvimento de cárie e verificar se um efeito protetor platô seria atingido. Então, sessenta ratas Sprague-Dawley dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* receberam dieta 2000 *ad libitum* por 21 dias e para beber: Grupo (1) água destilada estéril (ADE); (2) ADE contendo 10 ppm F; (3) ADE contendo 20 ppm F; (4) ADE contendo 30 ppm F e (5) ADE contendo 40 ppm F. O objetivo do experimento II foi verificar o efeito anticariogênico do F quando de diferentes níveis de desafio cariogênico. Desta forma, oito grupos de 9 ratas dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* foram colocadas em uma máquina de alimentação programada König-Höfer e receberam sacarose nas frequências de 3, 6, 12 e 17 x/dia. Enquanto, um grupo de cada frequência de sacarose recebeu água contendo 10 ppm de F, o outro recebeu água destilada estéril. No experimento I, F a partir de 20 ppm foi capaz de reduzir significativamente a iniciação das lesões cariosas. Por outro lado, F na concentração de 10 ppm, só foi capaz de reduzir significativamente a severidade das lesões. Considerando as diferentes superfícies lisas, parece que a 30 ppm, flúor atingiu um efeito protetor máximo. Nenhuma concentração de F foi eficaz em diminuir os índices de cárie de sulco. F diminuiu as contagens de *S. sobrinus* em todos os grupos, porém apenas a porcentagem de *S. sobrinus* no grupo que recebeu 40 ppm foi significativamente menor do que o grupo controle, mostrando que o efeito antibacteriano do F teve contribuição significativa na redução de cárie deste grupo. Utilizando-se este modelo de alto desafio cariogênico, os resultados sugerem que em pacientes com alto risco de cárie níveis mais elevados de flúor devem ser necessários. No experimento II, flúor reduziu a incidência e severidade da cárie de superfície lisa em todos grupos, mas os animais recebendo 3 refeições e F não apresentaram índices estatisticamente menores do que o grupo que recebeu 3 refeições e ADE. À medida

que o número de refeições aumentou, o efeito protetor do F nas superfícies lisas diminuiu. Assim como no experimento I, F não foi eficaz nas cáries de sulco. Pode-se concluir que a efetividade do flúor é influenciada pelo nível do desafio cariogênico e que deve-se levar em consideração ajuste do nível de exposição ao flúor baseado no risco de cárie.

### *3. INTRODUÇÃO*

### 3. INTRODUÇÃO

Cárie dental é uma doença bacteriana, dependente da dieta, que continua afetando a grande maioria das pessoas ( **KEYES, 1960; BOWEN, 1972; BOWEN, 1991; MANDEL, 1996**). Pelo menos 3 fatores são essenciais para o estabelecimento da doença: hospedeiro suscetível, microrganismos cariogênicos e carboidrato.

Considerando o hospedeiro, a saliva possui propriedades importantes na modulação da cárie dental. A saliva possui ação de limpeza, capacidade tampão e efeitos antibacterianos (**BOWEN, 1974; XU & OPPENHEIM, 1993**). Desta forma, deficiência salivar, que está associada ao uso de vários medicamentos, tratamento com radiação e doença autoimune, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças bucais severas, incluindo cárie dental (**CHEYNE, 1939; BOWEN et al, 1978; FOX et al, 1985**). Como modelo, animais dessalivados são altamente suscetíveis à infecção por *S. sobrinus* e desenvolvem rapidamente lesões cariosas extensas (**MADISON et al, 1989**).

Os microrganismos, colonizando superfícies do dente, formam placa dental, fermentam carboidratos, principalmente sacarose a ácidos orgânicos que induzem desmineralização dos dentes, resultando em cárie. Os estreptococos do grupo mutans estão grandemente associados à cárie dental e são considerados um dos agentes etiológicos primordiais nesta doença ( **LOESCHE, 1986**). Resultados de investigações em animais e humanos mostraram uma correlação altamente positiva entre frequência de ingestão de açúcares e o nível de cárie (**LARSON et al, 1962; KÖNIG et al, 1968; NEWBRUN & FROSTELL, 1978; BOWEN et al, 1980**). Assim, a atividade de cárie de duas espécies geneticamente diferentes de ratos mostrou ser diferente devido ao seu padrão de alimentação; os ratos Osborne-Mendel consomem mais alimento e mais freqüentemente do que os ratos pretos NIH ( **KÖNIG et al, 1969**). Além da frequência, os intervalos entre exposição de carboidratos influenciam o desenvolvimento da cárie (**BOWEN et al, 1983a**). Animais que ingeriram 17 refeições cariogênicas diariamente com intervalos de 60 minutos apresentaram mais lesões de superfície lisa do que os animais que consumiram o mesmo número de refeições com intervalos de 10, 20 e 40 minutos. Então, fica claro que a intensidade do desafio cariogênico pode ser influenciada por vários mecanismos.



Com relação ao efeito anticariogênico do flúor, toda evidência disponível mostra claramente que ele é um agente anticariogênico eficaz mais pela sua presença no meio bucal do que pela incorporação prévia ao dente. Flúor exerce seu efeito por prevenir desmineralização e promover remineralização de lesões cáries iniciais nos dentes (SILVERSTONE, 1977; TEN CATE & REMPT, 1986); ele também inibe enzimas glicolíticas bacterianas (MARQUIS, 1995). Flúor pode influenciar a produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans* (BOWEN & HEWITT, 1974). Por outro lado, o efeito preventivo é dependente dos níveis de flúor na cavidade bucal ( BOWEN, 1973; LARSON et al, 1976; ERICSSON, 1977; MIRTH et al, 1985), embora a quantidade de flúor necessária para efeito ótimo sob vários níveis de desafio cariogênico não tenha sido determinada. Ele pode ser liberado para a cavidade bucal a partir de diversas formas tais como água, dentífricos e comprimidos fluoretados. A percentagem de redução de cárie pelo flúor presente na água, considerando os efeitos pré e pós-eruptivo, em humanos varia de 10% a 60% ( O'MULLANE, 1990; HARGREAVES, 1992). Esta variabilidade na efetividade do flúor talvez possa ser explicada por diferenças na intensidade do desafio cariogênico. Flúor, como outros agentes terapêuticos, é provavelmente mais efetivo em dentes submetido a baixos níveis de desafio cariogênico do que em dentes submetidos a níveis maiores. Entretanto, do ponto de vista coletivo, somente um nível de exposição ao flúor, quer seja sistêmico (água fluoretada) ou tópico (dentífrico) é indicado independente dos riscos potenciais da doença.

Desta forma, justifica-se o objetivo do presente trabalho de avaliar o efeito de diferentes concentrações de F no desenvolvimento de cárie e também verificar o efeito anticárie do F em animais expostos a diferentes desafios cariogênicos.

#### *4. REVISÃO DA LITERATURA*

#### 4. REVISÃO DA LITERATURA

Cárie dental é uma doença presente desde os primórdios da civilização humana. Porém, este fato não a torna extinta ( **BOWEN, 1991**). Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento da cárie dental e apesar de pesquisas extremamente reveladoras terem sido realizadas nesta área, muito ainda resta a ser esclarecido e controlado.

Cárie dental é uma doença infecciosa multifatorial, que depende principalmente de três fatores: hospedeiro suscetível, dieta cariogênica e microrganismo. Flúor tem se mostrado um agente anticariogênico eficaz na redução da doença.

##### **Hospedeiro**

Considerando o hospedeiro, dois fatores podem auxiliar na resistência ou suscetibilidade à cárie: a composição química dos dentes e a saliva.

Como cárie dental envolve a destruição progressiva do esmalte dental, variações na sua composição têm influência no desenvolvimento da doença ( **ROBINSON et al, 1982**). Apatita é o principal constituinte do esmalte e a forma mais amplamente distribuída é a hidroxiapatita ( **JENKINS, 1978**). Porém, a composição inorgânica dos dentes não é constante. Ions presentes no cristal podem sofrer troca iônica com outros ions presentes no meio ambiente bucal. Por exemplo, ions hidroxila podem ser substituídos pelo ion flúor ou carbonato.

Em relação ao carbonato, altas concentrações são observadas em regiões de baixa densidade, baixo conteúdo de mineral e alto conteúdo de proteína, especialmente nas regiões de sulco e margem gengival ( **ROBINSON et al, 1982**). Além disso, carbonato tem sido associado com um mineral mais solúvel ( **GRÖN et al, 1963**), que é perdido nos estágios iniciais do ataque cariioso ( **HALLSWORTH et al, 1973**). Também foi observado que a lesão cariiosa contém menos carbonato do que a região hígida adjacente ( **ROBINSON et al, 1982**). Desta forma, a presença do carbonato no esmalte dental confere uma maior suscetibilidade à cárie dental.

Inversamente áreas levemente desmineralizadas, como por exemplo mancha branca, apresentam maior captação de F do que o esmalte hígido. Flúor, sendo captado pelo esmalte, o que pode variar em função do dente ou mesmo da região do dente ( **BRUDEVOLD et al, 1957**), também aumenta a cristalinidade do esmalte, reduzindo levemente sua suscetibilidade à desmineralização ( **BACHRA et al, 1965, TEN CATE & REMPT, 1986**). Entretanto, a presença do F no dente não o torna totalmente resistente aos ataques ácidos e o produto formado, fluorapatita, tem um valor limitado ( **LARSEN, 1990**). Porém, um efeito protetor indireto do F é que na sua presença há a formação de um esmalte contendo menos carbonato e portanto menos suscetível aos ataques ácidos ( **WEATHERELL et al, 1984**).

Saliva possui um importante papel na modulação da cárie dental ( **LAGERLÖF & OLIVEBY, 1994**). Vários fatores presentes na saliva podem influenciar o ataque cariogênico, tais como alguns fatores antimicrobianos: imunoglobulinas, peroxidases, lactoferrina, lisozima e aglutininas. Além disso, a saliva promove remineralização das lesões cariosas iniciais, quando o pH retorna a níveis normais ( $>5,5$ ), onde o produto iônico do cálcio e fosfato é superior ao produto de solubilidade da hidroxiapatita. Saliva também contém substâncias, como a sialina, capazes de aumentar o pH da placa dental, além de possuir capacidade tampão, sendo o sistema tampão mais importante o bicarbonato. Uma função da saliva bastante importante na prevenção da cárie é diluir substratos, que serão utilizados pelas bactérias, que foram introduzidos na cavidade bucal na forma de alimentos. Desta forma, podemos concluir que a saliva possui um papel fundamental na prevenção da cárie dental.

Assim, a remoção cirúrgica das glândulas salivares de ratos resulta em uma incidência aumentada de cárie experimental ( **CHEYNE, 1939**).

Em um estudo para determinar se primatas ( *Macaca mulatta*) poderiam se tornar mais suscetíveis à cárie dental através de irradiação de suas glândulas salivares, observou-se que estes animais desenvolveram extensas lesões de cárie em seus molares ( **BOWEN et al, 1978**).

Também foi observado que irradiação das glândulas salivares de primatas *Macaca mulatta*, alimentados com uma dieta cariogênica levou à rápida iniciação de cárie dental (EDGAR et al, 1981). Anormalidades na composição da saliva que poderiam estar relacionadas ao alto ataque cariogênico foram investigadas. A ausência de concentrações detectáveis de tiocianato pode indicar uma atividade reduzida do sistema antibacteriano lactoperoxidase/tiocianato/peróxido de hidrogênio. Porém, é bem provável que os efeitos principais da irradiação na composição inorgânica da saliva, predispondo para alta taxa de cárie, sejam a redução na quantidade de tampão na cavidade bucal e a redução no volume salivar resultando em retenção prolongada de alimentos.

Deste modo, animais dessalivados são mais suscetíveis à infecção por *S. sobrinus* do que animais intactos (MADISON et al, 1989), provavelmente devido à perda da capacidade tampão e componentes antibacterianos da saliva.

### Microbiota

A microbiota da placa dental consiste de uma variedade de microrganismos acidogênicos e não-acidogênicos e sua composição difere nas várias superfícies dentais (VAN HOUTE, 1980; VAN HOUTE, 1994). Os primeiros microrganismos a serem implicados como agentes cariogênicos específicos foram os lactobacilos. Entretanto, durante a década de 60 o conceito de um agente etiológico específico ressurgiu com a redescoberta do *Streptococcus mutans* (CLARKE, 1924). A caracterização dos estreptococos do grupo mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae*) como agentes etiológicos importantes na cárie dental ocorre devido à sua acidogenicidade, sua relação direta com desenvolvimento de cárie em humanos e animais e sua presença em todas as placas dentais associadas às superfícies cárie-ativa dos dentes. Os estreptococos do grupo mutans também possuem a habilidade de sintetizar glucanos extracelulares a partir de sacarose, aumentando cariogenicidade da placa por aumentar a quantidade de placa, promover colonização destes microrganismos e alterar propriedades de difusão do substrato na matriz da placa. Em acréscimo, por serem acidúricos prevalecem no meio ácido ganhando a competição com as demais bactérias.

Em 1960, **KEYES** mostrou que cárie é uma doença infecciosa e transmissível em hamsters e que não se desenvolve na ausência de microrganismo. Para tal, ele utilizou uma ninhada a partir de uma linhagem que havia sido cárie-ativa por 4 gerações e dividiu em 2 grupos. Um grupo recebeu antibiótico na ração para suprimir a microbiota cariogênica e o outro grupo constituiu o controle. O 1º grupo permaneceu sem cárie, enquanto os animais do 2º grupo apresentaram lesões cariosas. Estes resultados confirmam a característica de infecciosidade da doença cárie. Para demonstrar que a cárie dental também é transmissível, a partir de uma fêmea de cada um dos 2 grupos acima obteve-se uma nova ninhada. A ninhada obtida dos animais cárie-inativo foi dividida em 2 grupos; metade da ninhada foi alojada sozinha e a outra metade com a ninhada dos animais cárie-ativo. A metade alojada sozinha permaneceu sem cárie enquanto os outros animais desenvolveram cárie rampante.

Infecção a partir de uma mistura de diferentes cepas de estreptococos isolados de lesões cariosas de um hamster resultou no desenvolvimento de cárie dental em hamsters cárie-inativos ( **FITZGERALD & KEYES, 1960**). Os animais não-infectados não mostraram nenhuma evidência de cárie e formação de placa dental. Nenhum dos animais infectados com culturas mistas de lactobacilo e difteróides apresentou qualquer evidência de cárie.

Não existe entre o hospedeiro e o microrganismo uma cepa absoluta e especificidade de espécie na patogênese da cárie dental ( **KRASSE, 1966**). Estreptococos, similares morfológica e bioquimicamente aos estreptococos que induzem cárie em hamster, foram isolados da placa dental de indivíduos altamente cárie-ativos. A introdução destes microrganismos na cavidade oral dos hamsters resultou no desenvolvimento de cárie rampante.

Estreptococos do grupo mutans requerem a presença de superfície sólida para colonizarem a cavidade oral. Isto é sugerido pelos resultados de **ZINNER & JABLON (1969)** onde a cepa BHT de *S. mutans* atingiu 90% de colonização quando as crianças tinham de 9 a 12 meses de idade apresentando de 3 a 13 dentes.

Evidências disponíveis sugerem uma relação direta entre o número de *S. mutans* na placa dental e a prevalência de cárie dental ( **BOWEN, 1969**). Em um experimento com macacos infectados com estreptococos isolados de lesões cariosas de humanos, os animais

com o maior número de lesões apresentaram maior população de estreptococos cariogênicos na placa dental do que os animais que tiveram poucas lesões. Também foi demonstrado que a idade na qual os animais são expostos ao ambiente cariogênico pode ter efeito sobre o subsequente desenvolvimento de cárie. Dentes que estavam presentes por 6 meses ou mais antes de serem expostos ao microrganismo desenvolveram menos cárie do que aqueles dentes que erupcionaram durante o experimento.

A fim de demonstrar a relação entre estreptococos produtores de polissacarídeos extracelulares e cárie de superfície lisa em crianças, **DE STOPPELAAR et al ( 1969)** observou que a porcentagem de *S. mutans* foi marcadamente maior na placa dental obtida dos grupos com alta atividade de cárie do que dos grupos com baixa atividade.

Profundas mudanças na microbiota da cavidade bucal acontecem após a erupção dos dentes ( **CORNICK & BOWEN, 1971**). Microrganismos com uma morfologia de colônia semelhante ao *S. mutans* e *S. sanguis* não foram detectados nas bocas de macacos até que não ocorresse erupção dos dentes. Parece existir uma dependência da presença de superfície dura para a sobrevivência destes microrganismos na cavidade bucal.

Em humanos, *S. sanguis* estabeleceu-se na cavidade bucal apenas após a erupção dos dentes e foi encontrado em todas crianças três meses após a erupção dos dentes (**CARLSSON et al, 1970**). Esta observação demonstra a importância dos dentes em fornecer condições favoráveis para o crescimento dos estreptococos. Em outro estudo em humanos, **CATALANOTTO et al (1975)** mostram que recém-nascidos e crianças com apenas seus incisivos decíduos não apresentam *S. mutans* nas membranas das mucosas ou superfícies lisas dos incisivos. Porém, à medida que o número de dentes decíduos erupcionados aumentou, houve uma incidência gradual no isolamento deste microrganismo.

A membrana celular tem um papel importante na regulação ácido-base dos estreptococos orais ( **BENDER et al, 1986**). O pH citoplasmático é maior que aquele do meio ambiente e esta diferença é fundamental para sistemas sensíveis a pH ácido, como o sistema glicolítico. Diferenças na tolerância ácida entre os microrganismos poderiam ser explicadas pelas diferenças na suscetibilidade de danos da membrana causados pela acidificação do meio. Entretanto, não há diferença entre *S. mutans* GS-5, *S. sanguis* NCTC

10904 e *S. salivarius* ATCC 13419. Os efeitos do diciclohexilcarbodiimida (DCCD), um inibidor de ATPase, indicam que as ATPases da membrana têm um papel importante na dinâmica da permeabilidade. Este estudo também verificou que F<sub>1</sub>, como HF<sub>1</sub>, age como um transportador de prótons e que esta ação é dependente do pH.

Ausência de saliva pode selecionar cepas de *S. sobrinus* com virulência aumentada (MADISON et al, 1990). Ratas Sprague-Dawley que não foram dessalivadas, porém infectadas, que foram engaioladas com ratas dessalivadas infectadas, apresentaram maiores índices de cárie de superfície lisa do que pares não-dessalivados. Além disso, animais não-dessalivados e não-infectados, que foram engaiolados com animais dessalivados há 5 semanas, demonstraram diferenças altamente significativas nas lesões de superfície lisa quando comparados com os animais não-dessalivados não-infectados, que foram engaiolados com animais não-dessalivados e também infectados há 5 semanas.

Virulência do microrganismo pode variar de acordo com as condições encontradas na cavidade bucal. Animais dessalivados e intactos que foram infectados com isolados obtidos de animais dessalivados tiveram índices de cárie de superfície lisa significativamente maiores do que animais intactos e dessalivados infectados com culturas da cepa estoque original de *S. sobrinus* ATCC 27352 (MADISON et al, 1991). Valores iniciais de pH da placa dental foram estatisticamente menores nos animais dessalivados do que nos intactos. Além disso, após adição de sacarose, a variação nas medidas de pH da placa dental foi maior nos animais dessalivados do que nos intactos.

Filhos adquirem a maior parte da sua microbiota oral, em particular *S. mutans*, de suas mães e a virulência do microrganismo presente no reservatório materno é um fator crítico na infecção e atividade de cárie dos filhos ( O'CONNELL & BOWEN, 1991). Ratas dessalivadas e infectadas com *S. sobrinus* 6715, apresentando extensas lesões de cárie, tiveram ninhadas que desenvolveram índices de cárie de superfície lisa e de sulco significativamente maiores do que ninhadas de ratas intactas. A velocidade de colonização diferiu entre as ninhadas; ninhadas de mães intactas foram colonizadas mais lentamente do que ninhadas de mães dessalivadas. Contagens de microbiota total e *S. sobrinus* foram mais altas nas mães dessalivadas e suas ninhadas do que nas mães intactas e suas ninhadas.

Restrição ao açúcar diminui a ocorrência de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal ( **WENNERHOLM et al, 1995**). Os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* diminuíram na saliva e placa dental durante o período de restrição de açúcar de 6 semanas. Porém, os números aumentaram novamente após um novo período de acompanhamento de 6 semanas sem restrição de açúcar.

### **Dieta**

Por décadas é conhecido que o consumo excessivo de carboidratos fermentáveis está entre os fatores mais importantes que conduzem ao desenvolvimento da cárie dental. Sacarose é o principal carboidrato consumido pelo homem e o mais importante na cárie dental (**NEWBRUN & FROSTELL, 1978**).

Os microrganismos, principalmente estreptococos do grupo mutans, fermentam os carboidratos presentes na dieta até ácidos orgânicos ( **FEATHERSTONE, 1980**). Os principais ácidos orgânicos são láctico, butírico, acético, fórmico e succínico, que promoverão diminuição do pH da placa dental. Dependendo da extensão, duração e frequência desta diminuição do pH, poderá ocorrer o processo denominado de desmineralização. Se estes ácidos penetrarem no cristal do esmalte em uma quantidade suficiente, parte da hidroxiapatita dissolverá. Caso este processo continue, dissolução parcial subsuperficial ocorre e uma “mancha branca” ou lesão cariiosa inicial aparece.

A dieta apresenta um papel essencial no desenvolvimento da doença cárie. Animais que receberam toda sua dieta através de intubação gástrica por 25 semanas após serem desmamados permaneceram isentos de cárie ( **KITE et al, 1950**) e foram mantidos em boa saúde. Mesmo os animais dessalivados, que não tiveram qualquer contato com alimento na cavidade bucal, não desenvolveram lesões cariosas. Apesar de um alto desafio cariogênico, isto é, ausência de saliva, a presença da dieta é fundamental para o aparecimento de lesões cariosas.

Atividade de cárie está associada ao tempo que o alimento está disponível e não à quantidade consumida ( **LARSON et al, 1962**). A frequência e a retenção oral aumentada do alimento são alguns dos fatores comumente associados a uma maior atividade de cárie.

Ingestão de altos níveis de sacarose auxiliam na implantação de *S. mutans* ( **KRASSE et al, 1967**). Um maior número de microrganismos marcados foi recuperado de indivíduos infectados com uma cepa de *Streptococcus* isolado de humanos e expostos a uma alta frequência de consumo de açúcar, isto é, um cubo de açúcar a cada 30 minutos por 2 dias do que indivíduos que mantiveram seus hábitos alimentares. Além disso, restrição de carboidratos promoveu um decréscimo no número de colônias recuperadas.

Desenvolvimento de lesões cariosas tanto na superfície lisa quanto nos sulcos de molares de ratos está associada à Dieta 580 ( **LARSON et al, 1967**). Esta dieta apresenta 66% de sacarose na sua composição. Os animais recebendo Dieta 585, que contém apenas 25% de sacarose, dificilmente apresentaram cárie de superfície lisa. Uma provável explicação é a baixa concentração de sacarose, insuficiente para promover formação de placa dental cariogênica.

Uma correlação positiva altamente significativa entre frequência de alimentação e incidência de cárie foi demonstrada por **KÖNIG et al ( 1968)**. Uma máquina de alimentação programada, consistindo de gaiolas individuais com bandejas para diversos alimentos na parte da frente, foi utilizada. Estas bandejas giram através de um motor que é controlado por um programa. Este aparelho foi especialmente projetado para estudos de cárie dental em animais com propósito de eliminar efeitos não específicos de variáveis da dieta sobre ingestão alimentar e/ou impor padrões alimentares amplamente diferentes. Utilizando-se esta máquina, ratos Osborne-Mendel receberam a dieta teste em diferentes frequências e observou-se um aumento na incidência de cárie associado ao aumento da frequência das refeições programadas.

As atividades de cárie de ratos Osborne-Mendel e ratos pretos NIH demonstraram ser distintas. Evidências disponíveis mostram claramente que a atividade de cárie depende da frequência da ingestão da dieta ( **KÖNIG et al, 1969**). Os ratos Osborne-Mendel consumiram mais alimentos e mais frequentemente do que os ratos pretos NIH sob condições ambientais

idênticas. Conseqüentemente, os ratos pretos NIH apresentaram menor atividade de cárie. Fica claro a importância da quantidade de alimento consumido, porém, a frequência da ingestão tem um papel muito mais relevante no desenvolvimento da cárie dental. Em uma segunda fase, o mesmo padrão de alimentação, isto é, 36 refeições por dia, foi imposto aos animais utilizando-se uma máquina de alimentação. Verificou-se que os ratos Osborne-Mendel apresentaram a mesma atividade de cárie do que o grupo que havia sido alimentado *ad libitum*. Nos ratos pretos NIH, exposição ao alimento 36 vezes ao dia induziu um aumento do desenvolvimento de lesões cariosas.

Sacarose, mais do que qualquer outro carboidrato, é o arquiinimigo no processo da doença cárie ( **NEWBRUN, 1969**). Somente sacarose serve como substrato para síntese de polissacarídeos extracelulares por microrganismos cariogênicos. Certos microrganismos podem sintetizar dextranos e outros, levanos. A enzima extracelular responsável pela síntese transfere unidades de glicose ou frutose para o polímero em crescimento utilizando a alta energia encontrada na ligação glicosídica entre carbonos anoméricos da glicose e frutose no dissacarídeo sacarose.

Exposição aumentada a açúcar, isto é, cinco cubos sucessivos, não produziu imediatamente mais ácido do que um cubo, mas, após 30 minutos, mais ácido láctico estava presente na placa dos indivíduos expostos a 5 cubos sucessivos de açúcar e a recuperação do pH foi mais lenta ( **GEDDES, 1975**). As quantidades de ácidos produzidas a partir de glicose e sacarose não apresentaram diferenças significantes.

Sacarose presente na dieta, variando em concentração de 1 a 56%, promoveu uma maior colonização de *S. mutans* na cavidade bucal de ratos Sprague-Dawley do que dietas contendo glicose, frutose ou ração laboratorial ( **VAN HOUTE et al, 1976**). *S. mutans* implantou-se em todos animais que receberam dieta contendo sacarose mesmo com a dose mínima efetiva do inóculo; nos animais que receberam dietas que não continham sacarose, inoculação mesmo com a dose mais alta resultou em um estabelecimento infrequente de *S. mutans*.

Dietas contendo tanto glicose como sacarose foram capazes de auxiliar infecção e promover colonização de *S. mutans* ( **TANZER, 1979**). Entretanto, ratos Osborne-Mendel,

que consumiram dieta contendo sacarose, apresentaram maior porcentagem de *S. mutans* na placa dental, quantidades maiores de placa nos dentes, e conseqüentemente, maior índice de cárie de superfície lisa do que ratos que receberam apenas glicose. Além disso, porcentagem de *S. mutans* presente na microbiota total foi maior nos animais que consumiram sacarose do que naqueles que consumiram glicose.

É possível determinar a cariogenicidade de muitos alimentos em animais através do fornecimento da sua alimentação essencial por intubação gástrica e os alimentos teste em uma máquina de alimentação programada ( **BOWEN et al, 1980**). O número de lesões cariosas está diretamente relacionado à freqüência de ingestão da sacarose; cárie somente se desenvolveu nas superfícies lisas quando os animais foram alimentados 14 a 17 vezes por dia. Não houve diferença em cárie de superfície lisa e de sulco entre os animais alimentados com sacarose 14 ou 17 vezes ao dia. A freqüência de ingestão da sacarose também influencia a habilidade do *S. mutans* implantar-se na cavidade bucal dos animais; quanto maior a freqüência, maior o número de unidades formadoras de colônia.

Evidências disponíveis confirmam que a presença de sacarose é essencial para que *S. mutans* colonize a cavidade bucal. *S. mutans* não foi encontrado em animais alimentados com ração laboratorial ou somente por intubação gástrica ( **BOWEN et al, 1983b**).

Toda evidência disponível indica que a incidência de cárie dental está relacionada à freqüência de ingestão de açúcar. Porém, a duração da presença da sacarose na cavidade bucal também é extremamente importante ( **BOWEN et al, 1983a**). Ratos Osborne-Mendel que receberam 17 refeições diárias de sacarose por 5 semanas em intervalos de 10 ou 20 minutos desenvolveram aproximadamente 50% menos lesões cariosas do que os animais que receberam o mesmo número de refeições, porém em intervalos de 40 ou 60 minutos.

Sacarose possui um alto potencial de indução de cárie, não somente por ser metabolizada até ácidos orgânicos, que irão promover desmineralização, mas, principalmente por estar envolvida na formação de polissacarídeos presentes na placa dental ( **RÖLLA et al, 1983; RÖLLA et al, 1985; RÖLLA, 1989**). Sacarose presente na dieta aumenta o volume da placa dental e a sua velocidade de formação. Uma grande parte desta placa, formada na presença de sacarose, são polissacarídeos extracelulares. Glicosiltransferase (GTF), enzima

produzida por estreptococos do grupo mutans, está envolvida na colonização bacteriana de superfícies sólidas e dentes, que é dependente de sacarose. GTF é adsorvida à superfície dental e então, polissacarídeos são sintetizados por esta enzima a partir da sacarose. Mutano, um polissacarídeo insolúvel de glicose com ligações  $\alpha(1-3)$  possui uma forma rígida que facilita a forte adesividade entre bactérias e superfície dental. A sacarose é o único substrato para este polímero, pois sua alta energia de hidrólise pode ser utilizada pela bactéria. Outros tipos de glucanos, por exemplo com ligações  $\alpha(1-6)$ , podem ser sintetizados e também promovem aderência. Entretanto, estes glucanos são mais flexíveis, ocasionando uma menor adesividade entre bactérias e superfície dental.

Frutose é capaz de promover desenvolvimento de cárie dental ( **BOWEN et al, 1990**). Extensas lesões cáries foram observadas em animais que se alimentaram tanto de sacarose quanto de frutose. Porém, somente sacarose foi capaz de manter implantação de *S. sobrinus*, resultados estes que confirmam estudos prévios. Solução de sacarose a 10% teve um efeito dramático no desenvolvimento de cárie de superfície lisa; o efeito foi mais evidente nas superfícies bucal e proximal.

Maiores níveis de lactato e ácidos orgânicos foram produzidos nas camadas mais profundas por uma placa contendo glucano do que por uma placa sem glucano. A presença de glucano na placa dental, devido à alta frequência de exposição à sacarose, torna a placa mais porosa e aumenta a difusibilidade do substrato e, conseqüentemente, produção de ácido nas camadas mais profundas da placa dental adjacentes à superfície do dente ( **FU et al, 1991**).

Além disso, placa dental formada na presença de alta frequência de exposição à sacarose seria mais cariogênica devido à diminuição das concentrações de cálcio, fósforo e flúor ( **CURY et al, 1997**).

Apesar da dieta ser apenas um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie dental, fica claro a sua extrema importância auxiliando na colonização seletiva dos microrganismos, na síntese de polissacarídeos extracelulares e conseqüente formação de uma placa dental cariogênica.

## Flúor

O dente apresenta um comportamento dinâmico em relação ao meio ambiente bucal (CURY, 1992). Em pH menor que 5,5, o esmalte perde Ca e P para o meio bucal pois o produto iônico de cálcio e fosfato na saliva é inferior ao produto de solubilidade do esmalte. Como consequência, ocorrerá o fenômeno denominado de desmineralização. Quando o pH retorna aos níveis normais (>5,5), o meio ambiente bucal é supersaturante em relação à hidroxiapatita e a saliva tenta repor o cálcio e fosfato perdidos. A este fenômeno denominamos remineralização. Inicialmente acreditava-se que o flúor importante na prevenção das lesões cariosas era aquele incorporado ao dente durante sua formação. Atualmente, verifica-se que concentrações baixas porém constantes de F na cavidade bucal são extremamente eficientes no controle da doença cárie. Flúor inibe a desmineralização; quando o pH do meio bucal está entre 4,5 e 5,5 existe uma condição supersaturante em relação ao produto de solubilidade da fluorapatita, que precipitará. Desta forma, o flúor reduz a solubilidade do esmalte. Além disso, flúor também ativa a capacidade da saliva de repor os minerais perdidos.

Em uma grande revisão sobre os mecanismos de ação do flúor, SHELLIS & DUCKWORTH (1994) descrevem como o flúor reduz a desmineralização e também promove a remineralização mesmo em baixas concentrações. A redução da desmineralização ocorre devido a uma redução da produção ácida bacteriana, redução do produto de solubilidade da apatita, fluoretação das superfícies do cristal de apatita e redução da velocidade de dissolução. Por algum tempo, acreditava-se que o mais importante mecanismo de ação era a redução da solubilidade do mineral, porém hoje sabe-se que F apresenta um efeito tópico no ambiente bucal. Pré-tratamento da apatita com soluções de F reduz significativamente a susceptibilidade à dissolução ácida. Existem 2 tipos de incorporação: na ligação não-específica, íons F são adsorvidos à superfície do cristal sem reagirem quimicamente com ele; na ligação específica, troca iônica está envolvida, de forma que íons F são incorporados à superfície do cristal. Parece que íons F adsorvidos à superfície do cristal inibem a dissolução por restringirem difusão dos íons. Flúor estimula crescimento do cristal de apatita por acelerar hidrólise de um intermediário sólido, OCP, isto é, fosfato octacálcio. Além disso, o produto do crescimento do cristal é mais fluorapatita e apatita fluoretada do que hidroxiapatita.

Cárie dental em hamsters expostos a microrganismo e dieta cariogênica foi completamente prevenida por aplicação tópica de gel contendo 5.000 ppm de F duas vezes ao dia por 2 minutos ( **ENGLANDER & KEYES, 1966**). Nos animais que não receberam F, cárie dental se desenvolveu em pelo menos 10 dentes.

Adição de F à água tem um efeito anticariogênico significativo ( **BOWEN, 1973**). Macacos recebendo água fluoretada tiveram menos lesões cariosas do que macacos que receberam só água. Flúor foi mais efetivo na prevenção de cárie dos dentes que se formaram na sua presença do que daqueles expostos após mineralização. Além disso, observou-se que F pode concentrar-se na placa dental e que a capacidade da placa de abaixar o pH foi menor nos animais recebendo F.

É amplamente reconhecido que estreptococos cariogênicos têm uma habilidade única de produzirem polissacarídeos extracelulares a partir de sacarose. Flúor, em uma concentração de 70 ppm, é capaz de influenciar o crescimento destes microrganismos e também alterar a produção de polissacarídeos extracelulares; a proporção de levano para glucano foi significativamente maior no grupo submetido ao F ( **BOWEN & HEWITT, 1974**).

Embora os benefícios do flúor sejam reconhecidos em todo o mundo, seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido ( **POULSEN et al, 1976**). Administração de F após erupção dos dentes resultou em níveis significativamente reduzidos de cárie nas superfícies bucal e lingual, mas não produziu efeitos nas superfícies proximais e sulcos. Flúor é o agente anticárie de maior sucesso até o momento e muitos estudos têm se concentrado neste íon.

Flúor presente no ambiente bucal promove maior proteção do que aquele que está incorporado no esmalte ( **LARSON et al, 1976**). Esta observação foi feita em um estudo no qual ratos Osborne-Mendel foram submetidos a um período pré-teste durante o qual eles receberam água pura e água fluoretada contendo de 10 a 150 ppm F. Após este período, os animais foram inoculados com *S. mutans* e receberam água contendo 10 ppm de F. Foi demonstrado que a exposição freqüente ao F é necessária a fim de manter sua ação anticárie.

Nos animais que receberam F continuamente, o nível mais alto de inibição de cárie foi na superfície lisa.

Evidências iniciais apontaram para a possibilidade de que o íon flúor estava associado a uma redução na solubilidade do esmalte ( **ERICSSON, 1977**). Pelo menos parte deste efeito do F contra cárie deve ser devido à ação local sobre a superfície do dente. O efeito preventivo é maior em cárie de superfície lisa e menor em cárie de fissura. Outro fato observado é o rápido aumento de cárie após descontinuação da água fluoretada.

Altas concentrações de F, que são encontradas na placa dental podem ser devidas em parte aos grupos acídicos da placa que ligam cálcio da saliva ( **RÖLLA & BOWEN, 1977**). Subseqüentemente, ocorreria uma atração de íons F através de forças eletrostáticas.

Fluoretação da água doméstica é um método efetivo, seguro, econômico, e disponível para grandes populações na prevenção da cárie dental ( **BACKER DIRKS et al, 1978**). Em 1931, demonstrou-se que quantidades excessivas de F na água causavam calcificação defeituosa do esmalte (fluorose dental). Logo após, estudos epidemiológicos ( **DEAN, 1946**) demonstraram que dentes formados na presença de 1 ppm de F na água tinham redução de cárie com o mínimo de fluorose dental. O benefício máximo da água fluoretada é observado em indivíduos continuamente expostos desde o nascimento, mas proteção também é conferida aos dentes quando a fluoretação é iniciada. Entretanto, o efeito protetor da água fluoretada não é uniforme; os dentes anteriores são os mais favorecidos enquanto as fossas e fissuras são as superfícies menos beneficiadas.

Microrganismos presentes na placa bacteriana são acidúricos, isto é, podem conduzir glicólise mesmo quando o pH do meio ambiente é baixo. Estas bactérias gastam energia para promover extrusão de prótons a fim de manterem o pH interno acima daquele do meio externo. Flúor é captado na forma de HF e não como íon F, desta forma, há também captação de prótons. **EISENBERG et al ( 1980)** mostraram que F pode agir como um ácido fraco condutor de prótons transmembrana para reduzir as propriedades acidúricas de *S. mutans*. Em pH 5,0, uma concentração de quase 10 ppm de F foi capaz de promover estes efeitos.

A presença contínua de F nos fluidos orais promove grandes benefícios cariostáticos (MIRTH et al, 1985). Ratos utilizando um dispositivo intra-oral de liberação de F desenvolveram menos áreas cariosas em todas as superfícies do que ratos que receberam F através de um sistema de liberação controlada implantado subcutaneamente. As superfícies dos sulcos foram beneficiadas somente pelo F liberado pelo dispositivo intra-oral.

Uma investigação sobre o efeito de íons, presentes na sacarose, na cárie dental revelou que animais que ingeriram sacarose cocristalizada com F tiveram significativamente menos lesões de cárie de superfície lisa e de sulco do que os animais do grupo controle (SCHILLING et al, 1985). Além disso, o grupo que recebeu açúcar com F apresentou números menores de *S. mutans*, embora a população bacteriana total não diferiu significativamente daquela de outros grupos.

Apesar de recentes questionamentos sobre a efetividade da água fluoretada, O'MULLANE (1990) concluiu que este método continua a ser importante para prevenção da cárie. Em 1961-63 na Irlanda, o CPO-D médio de crianças de 5 anos de idade era de 5,6; em 1984, houve uma redução para 1,8 para residentes em comunidades com água fluoretada, o que representa uma redução de 68%. Em crianças com 15 anos, a redução foi de 50%.

Flúor é capaz de inibir o metabolismo de carboidratos pela microbiota acidogênica da placa dental, em parte, pela inibição da enzima glicolítica enolase (HALMILTON, 1990). Além disso, a captação de HF para o citoplasma, que se apresenta mais alcalino, resulta na dissociação de HF em  $H^+$  e  $F^-$ . O acúmulo de prótons resultante desta dissociação acidifica o citoplasma, causando uma redução no gradiente de prótons e atividade enzimática. Flúor também inibe a bomba de prótons ligada à membrana  $H^+/ATPase$ , que promove efluxo de prótons da célula com gasto de ATP.

Flúor é capaz de reduzir a tolerância a ácidos da bactéria presente na placa dental. Isto ocorre porque *S. mutans* é extremamente sensível ao F devido a inibição da ATPase pelo F nos níveis encontrados na placa dental (MARQUIS, 1990). Flúor, não serve apenas como forma de trazer prótons de volta para a célula como HF, mas também reduz a capacidade da célula de expulsar os prótons.

Níveis constantes de flúor presentes na cavidade bucal desempenham um papel fundamental na prevenção da cárie dental ( **BOWEN & PEARSON, 1994**). A influência da restrição alimentar com ou sem água fluoretada na progressão da cárie de animais dessalivados previamente expostos ao desafio cariogênico foi estudada. Apenas a restrição alimentar apresentou pequeno efeito sobre a progressão das lesões cariosas. Entretanto, a presença de flúor diminui a progressão da cárie, porém, o flúor não tornou o esmalte resistente à ataques subseqüentes.

Flúor, como agente antibacteriano, parece agir de diversas formas. Flúor pode agir diretamente como um inibidor enzimático da enzima glicolítica enolase ( **MARQUIS, 1995**). Flúor complexado ao alumínio,  $AlF_4^-$ , é o responsável pela inibição das ATPases translocadoras de prótons ( **STURR & MARQUIS, 1990**). Porém, a ação, que parece ser mais pertinente na redução da cariogenicidade da placa dental, é aquela relacionada à sua característica de ácido fraco. Uma variedade de ácidos fracos e flúor podem reduzir a tolerância ácida da glicólise em células intactas de *S. mutans* GS-5, por promoverem acidificação citoplasmática e desta forma inibirem enzimas tal como a enolase ( **BELLI et al, 1995**). O mecanismo de ação envolve perturbação da função da membrana em adição à ação deles como transportadores de prótons transmembrana. Em pH 4, flúor em uma concentração de 0,1 mM pode causar parada completa da glicólise em células intactas de *S. mutans*.

5. PROPOSIÇÃO

## 5. PROPOSIÇÃO

Avaliar em animais dessalivados:

5.1 O efeito pós-eruptivo de diferentes concentrações de flúor presente na água no desenvolvimento de cárie e verificar se um efeito protetor platô é atingido,

5.2 O efeito anticariogênico do flúor quando de diferentes níveis de desafio cariogênico.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Experimento I

O experimento I foi delineado para avaliar o efeito de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie dental em ratas dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* após 3 semanas de desafio cariogênico com Dieta 2000 *ad libitum*.

#### 6.1.1 Aquisição dos animais:

Cinco ratas Sprague-Dawley, cada uma com doze filhotes fêmeas de 12 dias de idade, foram adquiridas da empresa Charles River (Kingston, NY, USA). As mães foram analisadas para estreptococos do grupo mutans através de esfregaços nas superfícies dos dentes (figura 1) que foram inoculados em ágar mitis salivarius - MSA (Difco, Detroit, MI, USA) e ágar mitis salivarius mais bacitracina (200 unidades/ml, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) - MSB (figura 2). As placas foram incubadas em uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas.



**Figuras 1 e 2.** Obtenção de esfregaço bucal dos animais e inoculação em meio de cultura.

Foi coletado das mães sangue via plexo retro-orbital para determinar se os animais haviam sido infectados pelo vírus sialodacrioadenite (SDA). Vírus SDA é um tipo de coronavírus, que infecta o trato gastrointestinal e seus órgãos glandulares associados. Vírus SDA pode causar necrose das glândulas salivares de ratos ( JACOBY et al, 1979). O sangue das mães foi

checado para a presença do vírus SDA utilizando um kit de anticorpo SDA (Organon Teknika Corp., Durhan, NC). As mães foram infectadas oralmente em dois dias sucessivos com uma cultura em caldo de baixo peso molecular ( Low Molecular Weight - LMW) (**SCHILLING & BOWEN, 1988**) com crescimento exponencial ( fase log) de *Streptococcus sobrinus* 6715 resistente à estreptomicina, que tinha sido reisolado de um rato dessalivado. A fase log do *S. sobrinus* foi estabelecida através de um espectrofotômetro (Sequoia-Turner, Mountain View, CA, USA) a 700nm. Infecção individual foi realizada utilizando algodão embebido em meio de cultura seguido de esfregaço nos dentes de cada animal. Os animais receberam ração laboratorial e água contendo 5% de sacarose, a qual foi acrescentada na dieta para aumentar a infecção por *S. sobrinus*. As mães foram infectadas porque são importantes fontes de transmissão de microbiota cariogênica para os filhotes. Esfregaços na superfície dos dentes das mães e dos filhotes, com 18 dias de idade, foram checados para infecção por *S. sobrinus* por inoculação em ágar mitis salivarius mais estreptomicina (200 unidades/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) - MSS. Os filhotes foram infectados quando tinham 20 e 21 dias de idade da mesma maneira que descrito para as mães, receberam dieta 2000 ( **KEYES & JORDAN, 1964**) (anexo 1) e água contendo 5% de sacarose *ad libitum*. Dieta 2000, que contém 56% de sacarose, também foi oferecida a fim de aumentar a infecção por *S. sobrinus*. Os filhotes foram separados das mães quando tinham 23 dias de idade e esfregaços na superfície dos dentes deles foram checados para infecção por *S. sobrinus* em MSS.

### 6.1.2 Procedimentos Cirúrgicos:

Com 24 dias, os filhotes foram dessalivados através de ligadura dos ductos da parótida usando um fio de sutura nº4 ( Ethicon, Johnson & Johnson), sendo as glândulas sublingual e submandibular removidas após dissecação através de incisão mediana. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg). Todas as incisões foram fechadas com cliques cirúrgicos (Autoclip, Becton & Dickinson), que foram removidos 3 a 5 dias após a dessalivação. O uso de animais dessalivados atua como um desafio cariogênico extremamente intenso ( **BOWEN et al, 1986; BOWEN et al, 1988**).

Os filhotes, com 25 dias, foram divididos em 5 grupos de 12. Os animais foram colocados aos pares em gaiolas suspensas de aço inox. Eles receberam dieta 2000, que atua como um desafio cariogênico neste ponto, e o seguinte para beber:

- Grupo 1**      água destilada estéril
- Grupo 2**      água destilada estéril contendo 10 ppm de F
- Grupo 3**      água destilada estéril contendo 20 ppm de F
- Grupo 4**      água destilada estéril contendo 30 ppm de F
- Grupo 5**      água destilada estéril contendo 40 ppm de F

Sacarose não foi acrescentada à água. Ao fim de cada semana, os animais eram pesados. O estudo continuou por 3 semanas, quando os animais foram sacrificados por asfixia com CO<sub>2</sub> e decapitados.

## 6.2 Experimento II

O experimento II foi delineado para avaliar o efeito anticariogênico do flúor em ratas dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* expostas a diferentes frequências de ingestão de sacarose, utilizando uma máquina de alimentação programada König-Höfer.

### 6.2.1 Aquisição dos animais

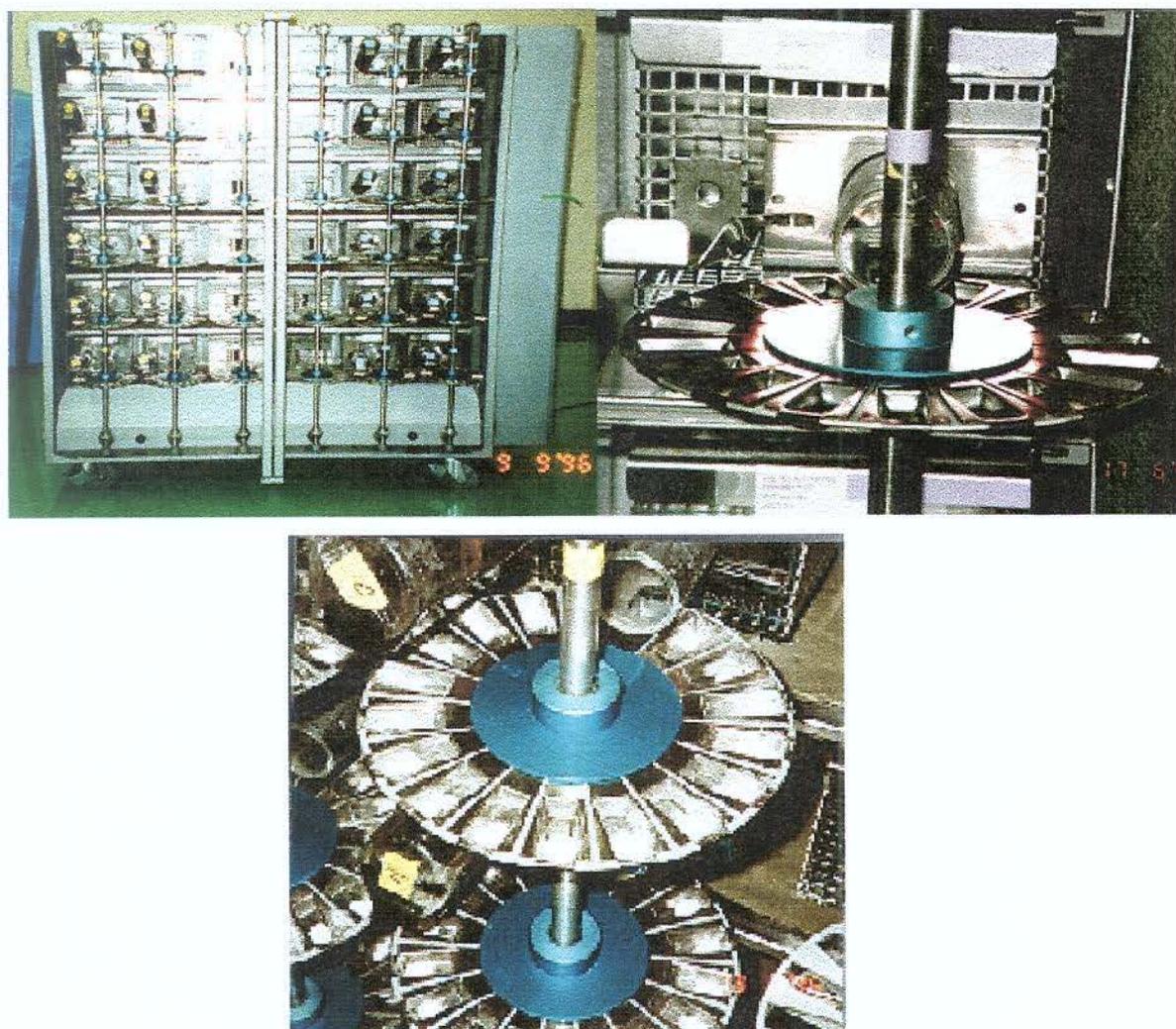
Oito ratas Sprague-Dawley, cada uma com 10 filhotes fêmeas de 13 dias, foram obtidas da empresa Charles River (Kingston, NY, USA). Esfregaços na superfície dos dentes das mães foram analisados em ágar mitis salivarius (MSA) e ágar mitis salivarius mais bacitracina (MSB) para estreptococos do grupo mutans. Foi coletado sangue via plexo retro-orbital das mães a fim de determinar se os animais haviam sido infectados pelo vírus sialodacrioadenite (SDA) como previamente descrito no experimento I. As mães foram infectadas oralmente em dois dias sucessivos com uma cultura em crescimento ativo de *Streptococcus sobrinus* 6715, receberam ração laboratorial e água contendo 5% de sacarose, a qual foi acrescentada na dieta para aumentar infecção por *S. sobrinus*. Esfregaços na superfície dos dentes das mães e dos filhotes, com 17 dias de idade, foram checados para infecção por *S. sobrinus* por inoculação em MSS. Os filhotes foram infectados quando tinham 18 e 19 dias de idade, alimentados com dieta 2000 *ad libitum* e receberam água contendo 5% de sacarose. Dieta 2000, que contém 56% de sacarose, também foi acrescentada à dieta para aumentar a infecção por *S. sobrinus*.

56% de sacarose, também foi acrescentada à dieta para aumentar a infecção por *S. sobrimus*. Os filhotes foram separados das mães quando tinham 23 dias de idade e esfregaços nas superfícies dos dentes deles foram checados para infecção por *S. sobrimus* em MSS.

### 6.2.2 Procedimentos Cirúrgicos

Com 25 dias, os filhotes foram dessalivados através de ligadura dos ductos da parótida usando um fio de sutura nº 4, sendo as glândulas sublingual e submandibular removidas após dissecação através de incisão mediana.

Os animais, com 26 dias, foram divididos em 8 grupos de 9 e colocados em uma máquina de alimentação programada König-Höfer (figuras 3, 4 e 5).



**Figuras 3, 4 e 5.** Máquina de alimentação programada König-Höfer. Gaiolas individuais com o prato rotatório na parte de frente e bandejas com as refeições de sacarose.

Quatro grupos receberam água destilada estéril e quatro grupos receberam água destilada estéril contendo 10 ppm de flúor *ad libitum*. Cada grupo recebeu um dos quatro níveis de desafio cariogênico consistindo de 3, 6, 12 e 17 refeições diárias de sacarose, como se segue:

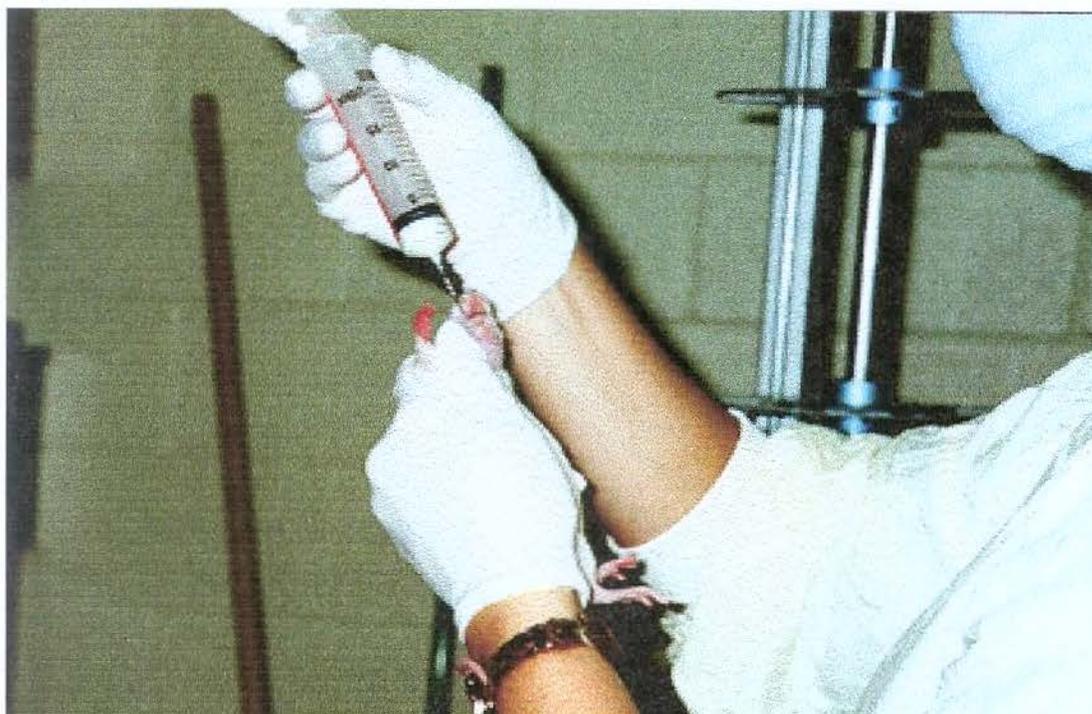
	sem flúor	10 ppm de flúor
3 refeições	<b>grupo 1</b>	<b>grupo 5</b>
6 refeições	<b>grupo 2</b>	<b>grupo 6</b>
12 refeições	<b>grupo 3</b>	<b>grupo 7</b>
17 refeições	<b>grupo 4</b>	<b>grupo 8</b>

A primeira refeição do ciclo foi oferecida às 4 horas da tarde e a última às 8 horas da manhã do próximo dia. As refeições de sacarose eram oferecidas como demonstrado abaixo:

**Tabela 1.** Horário no qual as refeições de sacarose foram oferecidas em função da frequência.

nº de refeições	HORÁRIO																
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8
3	x					x						x					
6	x		x			x			x			x				x	
12	x	x	x	x			x	x	x	x			x	x	x	x	
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

O número de refeições ingeridas por cada animal foi registrado diariamente. Nutrição essencial foi fornecida através de intubação gástrica (figura 6) para assegurar que somente sacarose em diferentes frequências entrasse em contato com os dentes. Usando uma agulha de alimentação 20G 1x1,5, a dieta líquida, dieta NCP#2 (anexo 2) foi administrada 2 vezes ao dia em quantidades de 3 e 2 ml, de segunda a sexta, e 2 ml, sábado e domingo.



**Figura 6.** Intubação gástrica com administração de dieta líquida NCP#2.

Ao fim de cada semana, os animais eram pesados. O estudo continuou por 3 semanas, quando os animais foram sacrificados por asfixia com CO<sub>2</sub> e decapitados.

### 6.3 Análise Microbiológica

A mandíbula inferior esquerda foi assepticamente removida, colocada em 5 ml de salina estéril ( figura 7), e sonicada por 30 segundos em 3 pulsos de 10 segundos com 5 segundos de intervalo em um sonicador Braun-Sonic 1510 ( B.Braun - Melsungen AG, Allentown, Penn., USA) ( figura 8). Amostras da suspensão resultante e uma diluição 1:100 foram inoculadas usando uma máquina “spiral plater” ( Spiral-System® Instruments, Inc., Bethesda, Md., USA) ( figura 9) em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Remel, Lenexa, KA, USA) para determinar a microbiota total, e em MSS para determinar a população de *S. sobrinus*. As placas de MSS e ágar sangue foram incubadas em uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas. Placas de ágar sangue foram então incubadas por mais 24 horas aerobicamente. Unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas visualmente utilizando lupa de aumento com luz e estereomicroscópio (BOWEN et al, 1986).



**Figuras 7, 8 e 9.** Remoção da hemimandíbula esquerda. Sonicação das amostras. Inoculação da suspensão e diluição 1:100 em meio de cultura utilizando máquina de “spiral plater”.

#### 6.4 Determinação de índice de cárie

As mandíbulas e maxilas foram autoclavadas, os tecidos moles removidos e os dentes preparados para determinar índice de cárie de acordo com a técnica de Keyes modificada por Larson (KEYES, 1958; LARSON, 1981).

A determinação do índice de cárie foi realizada em 2 estágios. No primeiro estágio, as lesões de cárie de superfície lisa, isto é, bucal, lingual e proximal foram determinadas nos dentes. O segundo estágio corresponde à avaliação das lesões presentes nos sulcos após coloração e seccionamento dos dentes.

O primeiro estágio corresponde a dois tipos de avaliação. A primeira avaliação da lesão cariosa é a contagem do número de pontos dados em uma superfície. É uma avaliação linear feita em unidades ou “áreas”, que representam uma porção da superfície do dente. O número máximo de unidades que podem ser designadas a uma superfície é predeterminado pelo seu tamanho e está demonstrado no diagrama 1 na página 37. A segunda avaliação envolve a profundidade da lesão na dentina. Os valores são designados a cada tipo de lesão e são registrados no diagrama. O método de designação de valores envolve julgamento da extensão linear das lesões e registro da profundidade da lesão. A aparência das lesões cariosas tendo alcançado diferentes profundidades pode ser descrita como se segue:

E - somente esmalte, esmalte branco e opaco;

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

Dm - lesão moderada da dentina, a dentina está exposta;

Dx - lesão extensa da dentina, a dentina está mole ou faltando e pode esta escura.

No segundo estágio, as maxilas e mandíbulas são coradas com murexida 0,024% em etanol/água (7:3) e seccionadas ao meio. As mandíbulas e maxilas ficaram em contato com a solução de murexida por 17 horas. A avaliação da cárie nos sulcos é alcançada por uma estimativa linear para um sulco teoricamente aberto. A avaliação da profundidade da lesão também é realizada. O número de sulcos examinados no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> molares mandibulares é 3, 2 e 1, respectivamente; e no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> molares maxilares é 2, 1 e 1, respectivamente. A escala de unidades utilizada para o índice de cárie nos sulcos está presente no diagrama 1.

	Bucal			Lingual			Proximal			Suico		
maxila esquerda	 L E D, D <sub>m</sub> D <sub>s</sub>											
maxila direita	 L E D, D <sub>m</sub> D <sub>s</sub>											
mandibula esquerda	 L E D, D <sub>m</sub> D <sub>s</sub>											
mandibula direita	 L E D, D <sub>m</sub> D <sub>s</sub>											
	L	E	Ds	Dm								
Bucal												
Lingual												
Proximal												
Suico												
Morsal												

Diagrama 1. Índice de cárie de superfície lisa e de sulco.

## 6.5 Análise Estatística

Análise de variância e teste de Tukey-Kramer HSD foram realizados usando o programa JMP versão 2 ( **SAS Institute Inc., 1989**). Índices de cárie de superfície lisa e de sulco foram expressas como proporções de seus valores máximos possíveis (124 e 56, respectivamente), e a transformação do seno inverso foi aplicada. Dados de estudos anteriores (**ROSALEN et al, 1996a, ROSALEN et al, 1996b**) indicam que esta transformação estabiliza desvio padrão dos resultados dentro do grupo. Contagens da microbiota foram expressas como logaritmo na base 10. Esta transformação tem o objetivo de estabilizar variabilidade e reduzir assimetria dos resultados.

## **7. RESULTADOS**

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Experimento I

Todos animais permaneceram saudáveis durante o experimento. Não houve diferença significativa de ganho de peso entre os grupos. O ganho de peso médio é apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Ganho de peso (g) dos animais expostos a diferentes concentrações de F. n=12; média (desvio padrão)

<i>GRUPOS</i>				
<i>ADE</i>	<i>10 ppm F</i>	<i>20 ppm F</i>	<i>30 ppm F</i>	<i>40 ppm F</i>
47,9(12,3)a	53,9(14,5)a	57,8(15,6)a	56,3(17,2)a	54(16,1)a

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

Na tabela 3, os índices de cárie de superfície lisa e sua severidade estão demonstrados. Apesar dos animais, que receberam água contendo 10 ppm F, apresentarem numericamente menos lesões cariosas do que o grupo controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Constatou-se que os animais que receberam água fluoretada de 20 a 40 ppm desenvolveram significativamente menos lesões cariosas do que o grupo controle. Os animais que receberam água contendo 30 ppm de F apresentaram os menores índices de cárie de superfície lisa, porém não diferiram daqueles do grupo de 20 e 40 ppm de F. Estes resultados sugerem que a 20 ppm na água, flúor alcançou um efeito platô protetor; aumentos adicionais na concentração de flúor não reduziram significativamente as lesões cariosas nas superfícies lisas ou a severidade delas. Todas concentrações de flúor foram efetivas em diminuir a severidade das lesões de superfície lisa, e os grupos de 30 e 40 ppm de F apresentaram os menores índices, tanto para Ds como para Dm. Flúor, na concentração de 10 ppm, foi efetivo na redução da severidade das lesões; podem ser observadas diferenças estatisticamente significantes nos índices de Ds e Dm. Estes resultados estão ilustrados na figura 10.

**Tabela 3.** Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade. n=12; média (desvio padrão)

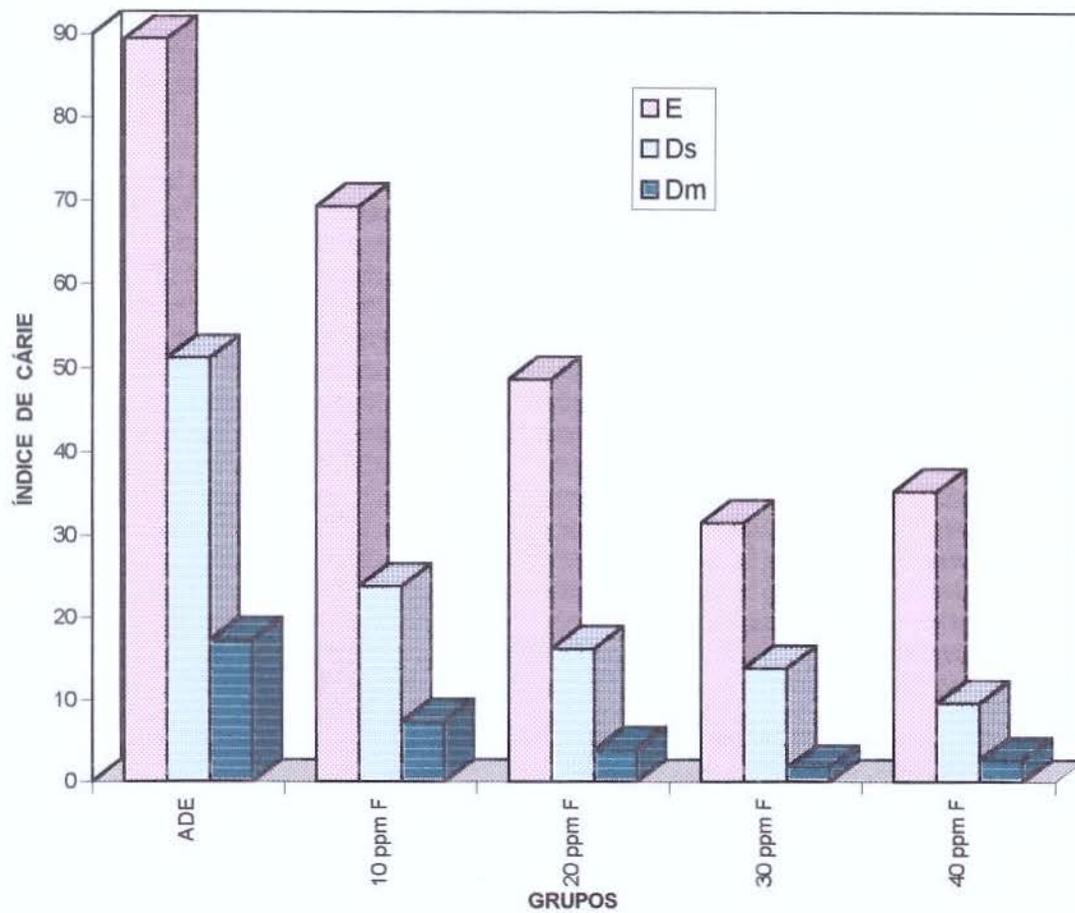
ÍNDICE DE CÁRIE	GRUPOS				
	ADE	10 ppm F	20 ppm F	30 ppm F	40 ppm F
E	89,4 (14,5) <sup>a</sup>	69,3 (27,8) <sup>a</sup>	48,7 (5,4) <sup>b</sup>	31,5 (11,5) <sup>b</sup>	35,3 (13,8) <sup>b</sup>
Ds	51,2 (15,2) <sup>c</sup>	23,9 (10,2) <sup>d</sup>	16,3 (6,2) <sup>d,e</sup>	13,9 (5,2) <sup>d,e</sup>	9,7 (5,4) <sup>e</sup>
Dm	17,3 (13) <sup>f</sup>	7,4 (5,0) <sup>g</sup>	4,0 (2,4) <sup>g</sup>	1,8 (1,9) <sup>g</sup>	2,8 (3,2) <sup>g</sup>

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0.05$ )

E - somente esmalte

Ds - lesão leve da dentina

Dm - lesão moderada da dentina



**Figura 10. Influência de diferentes concentrações de F no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade**

Como, cárie não afeta todas as superfícies da mesma forma, o efeito do flúor nas diferentes superfícies foi examinado (tabela 4). Índices de cárie na superfície bucal foram menores nos animais que receberam flúor, mas novamente, nenhuma diferença estatística foi observada entre grupo controle e 10 ppm de F, apesar deste último ser numericamente menores. O menor índice de cárie na superfície bucal foi encontrado no grupo que recebeu água contendo 30 ppm F ( 13,3), que não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo que recebeu 40 ppm F ( 16,3), mas foi estatisticamente diferente do grupo que recebeu 20 ppm F. Flúor foi muito efetivo em diminuir cárie de superfície lingual; todos grupos que receberam flúor apresentaram índices estatisticamente menores do que o grupo controle. Diferenças nos índices de cárie de superfície proximal não foram observadas entre o grupo controle, 10 e 20 ppm de F. Os grupos de 30 e 40 ppm de F apresentaram índices estatisticamente menores na superfície proximal do que o grupo controle. Estes resultados estão ilustrados na figura 11.

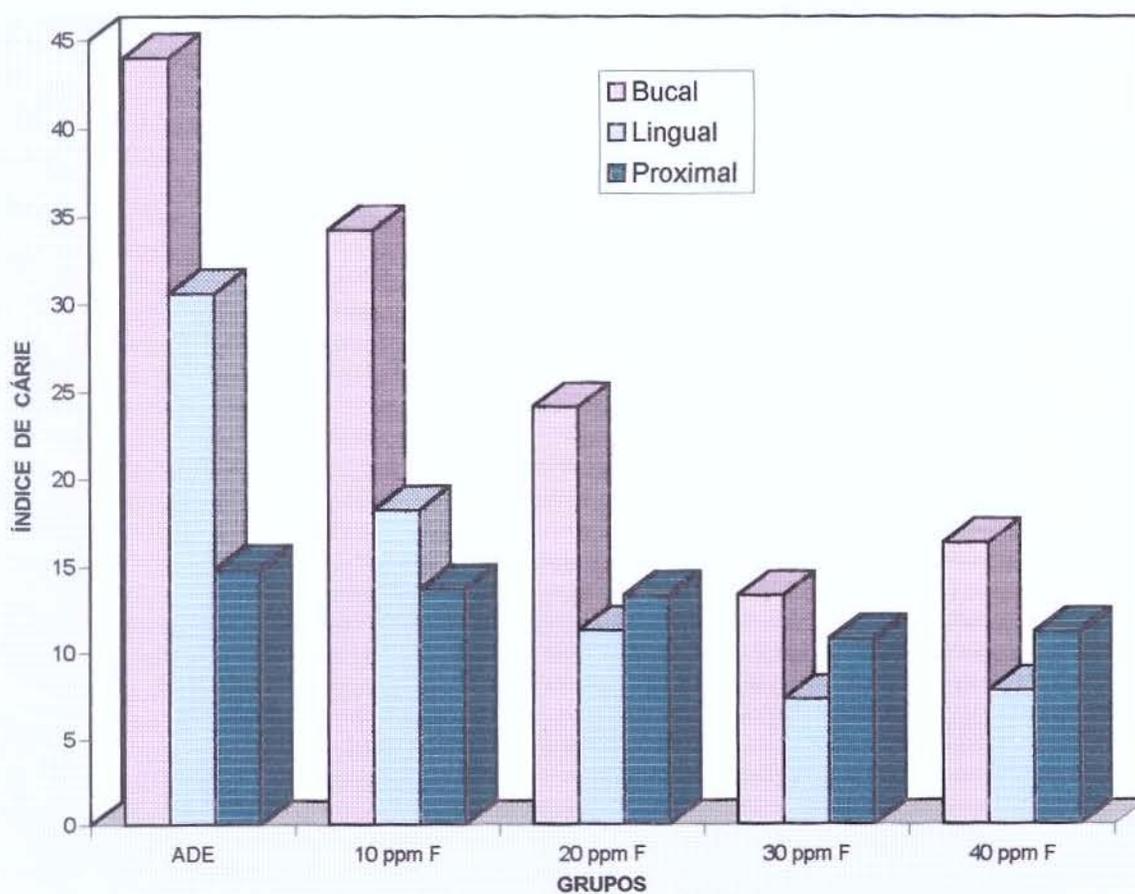
**Tabela 4.** Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie nas diferentes superfícies lisas. n=12; média (desvio padrão)

SUPERFÍCIES	GRUPOS				
	ADE	10 ppm F	20 ppm F	30 ppm F	40 ppm F
LISAS					
Bucal	44 (5,4)a	34,2 (11,7)a,b	24,1 (9,7)b,d	13,3 (7,9)c	16,3 (8,6)c,d
Lingual	30,6 (9,4)e	18,2 (12,6)f	11,3 (7,0)f,g	7,3 (4,2)g	7,8 (7,2)g
Proximal	14,8 (1,8)h	13,7 (1,9)h,i	13,3 (2,1)h,i	10,8 (4,3)i	11,2 (4,5)i

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

**Tabela 5.** Porcentagem de redução de cárie nas diferentes superfícies lisas.

SUPERFÍCIES	10 ppm F	20 ppm F	30 ppm F	40 ppm F
Bucal	22,3	45,2	69,8	63
Lingual	40,5	63,1	76,1	74,5
Proximal	7,4	10,1	27	24,3



**Figura 11. Influência de diferentes concentrações de F no desenvolvimento de cárie nas diferentes superfícies lisas.**

Com relação à cárie de sulcos não houve essencialmente nenhuma diferença nos índices de cárie de sulco entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam 10 ppm de F na água (tabela 6). Os animais do grupo de 20 ppm de F apresentaram numericamente menos lesões de sulco do que os animais do controle e 10 ppm de F, porém não houve diferença estatística. O grupo de 30 ppm de F apresentou o menor índice de cárie de sulco, porém não houve diferença estatística entre o grupo controle e de 30 ppm de F. Os resultados de severidade seguiram o mesmo padrão das lesões de esmalte nas cáries de sulco. Os índices de severidade dos grupos que receberam F não diferiram estatisticamente do grupo controle. Estes resultados estão ilustrados na figura 12.

**Tabela 6.** Influência de diferentes concentrações de flúor no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade. n=12; média (desvio padrão)

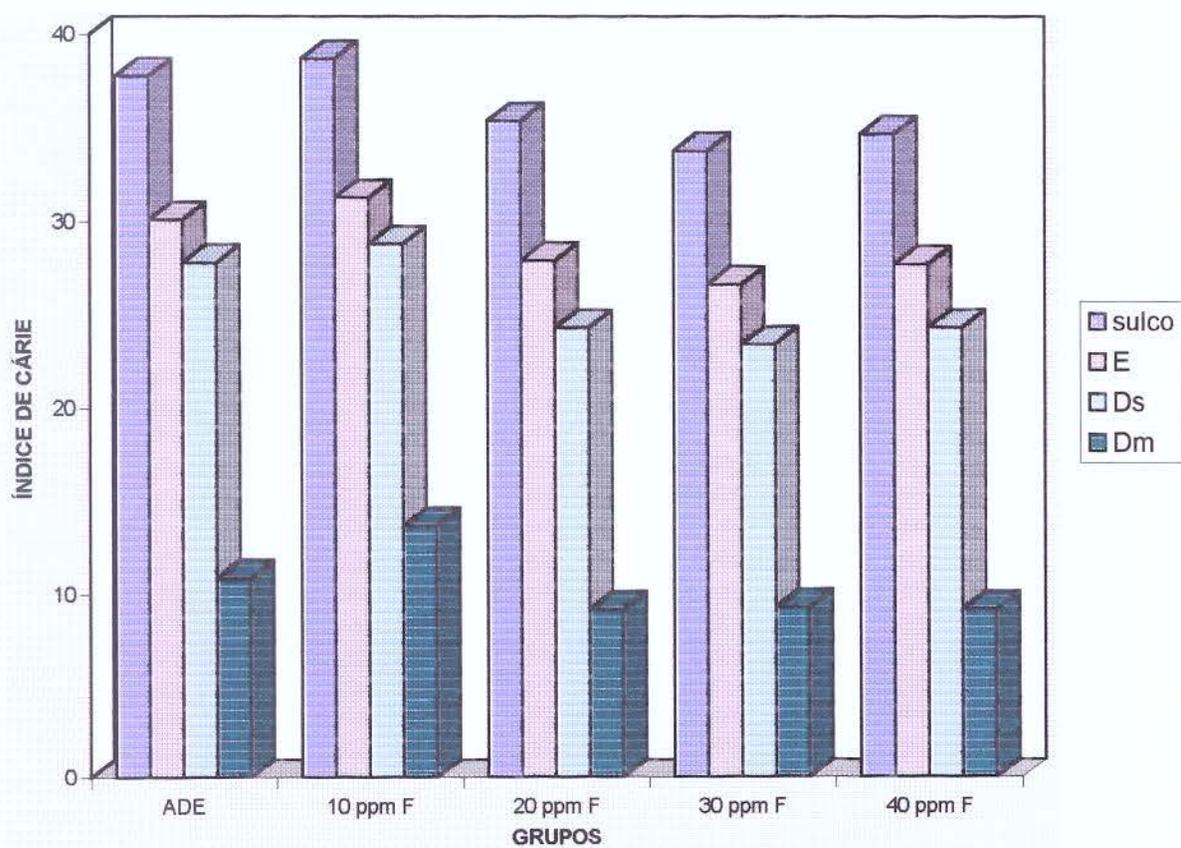
ÍNDICE DE CÁRIE	GRUPOS				
	ADE	10 ppm F	20 ppm F	30 ppm F	40 ppm F
sulco	37,8 (3,9) <sup>a,b</sup>	38,7 (3,7) <sup>a</sup>	35,4 (3,3) <sup>a,b</sup>	33,8 (5,4) <sup>b</sup>	34,7 (2,8) <sup>a,b</sup>
E	30,1 (3,8) <sup>c,d</sup>	31,3 (3,3) <sup>c</sup>	27,9 (3,2) <sup>c,d</sup>	26,6 (4,4) <sup>d</sup>	27,7 (2,1) <sup>c,d</sup>
Ds	27,8 (4,6) <sup>e,f</sup>	28,8 (3,9) <sup>e</sup>	24,3 (3,8) <sup>e,f</sup>	23,4 (5,4) <sup>f</sup>	24,3 (3,5) <sup>e,f</sup>
Dm	10,9 (4,7) <sup>g,h</sup>	13,7 (3,5) <sup>g</sup>	9,2 (3,6) <sup>h</sup>	9,3 (3,5) <sup>h</sup>	9,2 (3) <sup>h</sup>

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

E - somente esmalte

Ds - lesão leve da dentina

Dm - lesão moderada da dentina



**Figura 12. Influência de diferentes concentrações de F no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.**

Diferenças foram observadas nos dados microbiológicos dos vários grupos (tabela 7). O grupo controle apresentou a maior contagem de microbiota total e não foi estatisticamente diferente do grupo de 40 ppm de F. O grupo de 20 ppm F apresentou os menores números de contagem de microbiota total, porém não diferiu estatisticamente dos grupos de 10 e 30 ppm F. Populações de *S. sobrinus* foram significativamente menores nos grupos que receberam flúor do que no controle, mas as populações de *S. sobrinus* nos grupos que receberam flúor não diferiram estatisticamente entre si. A menor porcentagem de *S. sobrinus* foi observada no grupo de 40 ppm de F e foi estatisticamente diferente daquelas dos grupos controle e 10 ppm de F. O grupo controle apresentou a mais alta porcentagem de *S. sobrinus*, a qual somente foi estatisticamente diferente do grupo de 40 ppm F. Estes resultados estão ilustrados nas figuras 13 e 14.

**Tabela 7.** Influência de diferentes concentrações de flúor na microbiota total e de *S. sobrinus*. média (desvio padrão)

MICROBIOTA	GRUPOS				
	ADE	10 ppm F	20 ppm F	30 ppm F	40 ppm F
total, ( $10^7$ ) n=12	1,9 (0,6)a	1,1 (0,4)b,c	0,9 (0,5)b	1,2 (0,7)b,c	1,3 (0,4)a,c
<i>S. sobrinus</i> , ( $10^7$ ) n=12	1,2 (0,5)d	0,6 (0,3)e	0,4 (0,2)e	0,6 (0,3)e	0,4 (0,3)e
% <i>S. sobrinus</i> n=	62,7 (19)f	55,9 (22)f	43,3 (20)f,g	50,7 (20)f,g	31,0 (15)g
	12	12	9	11	12

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

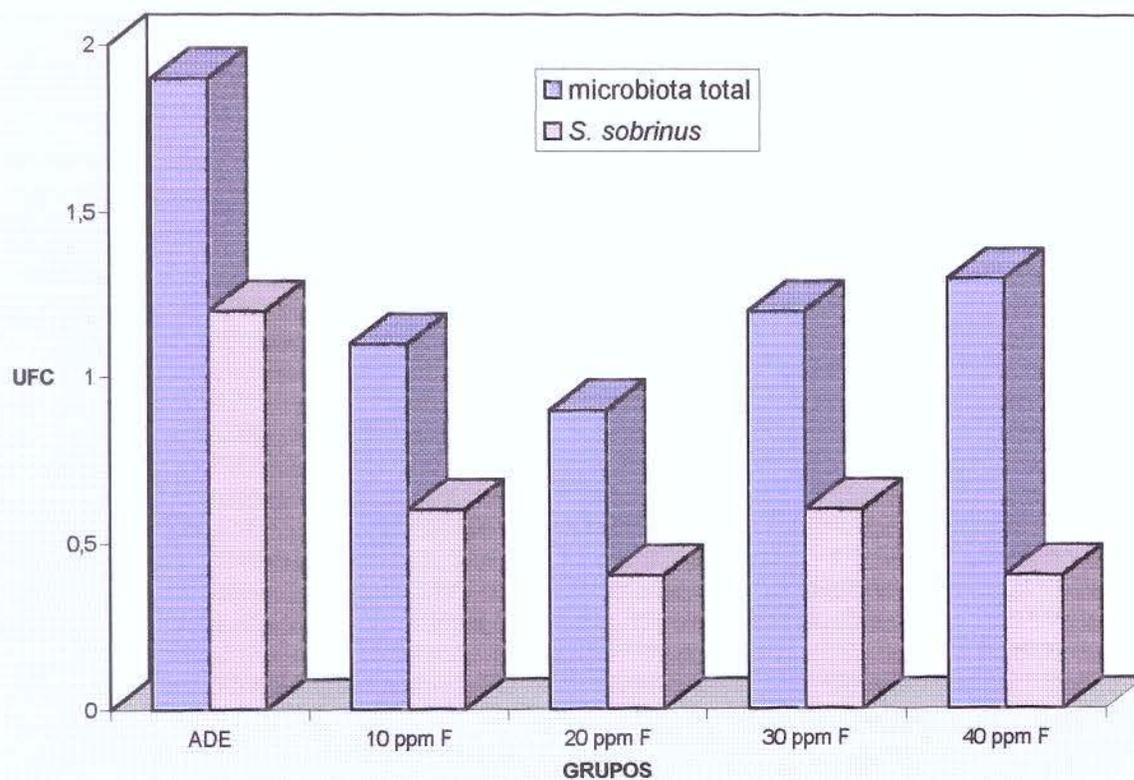


Figura 13. Influência de diferentes concentrações de F na microbiota total e de *S. sobrinus* ( $10^7$ ).

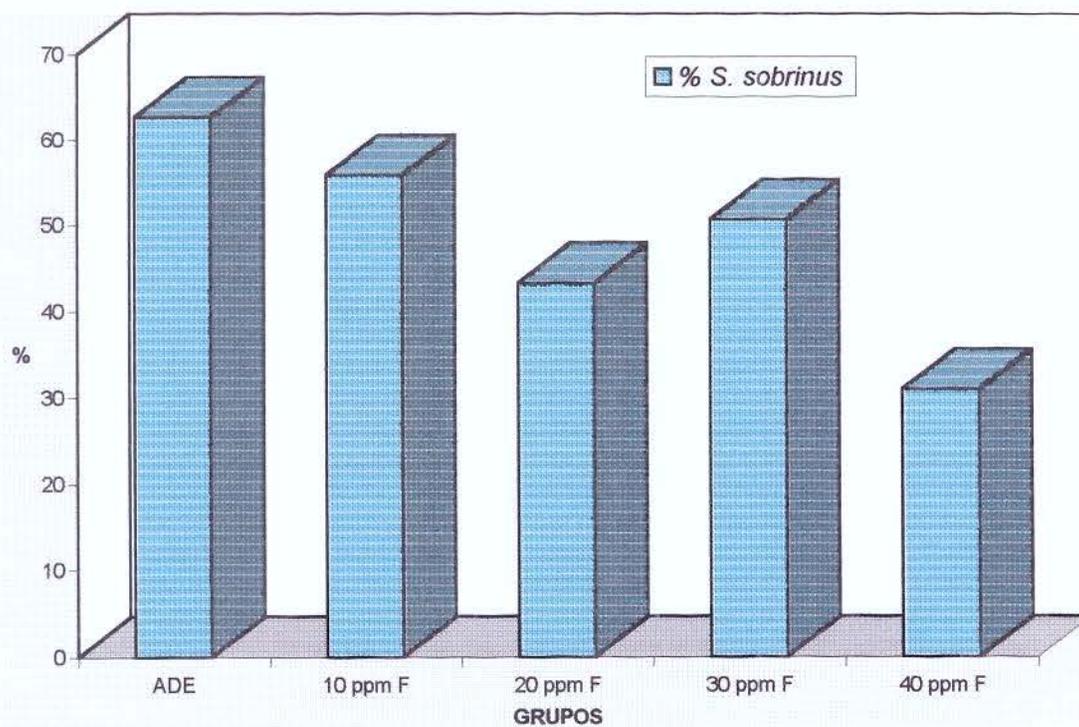


Figura 14. Influência de diferentes concentrações de F na porcentagem de *S. sobrinus*.

## 7.2 Experimento II

Os animais sobreviveram aos procedimentos cirúrgicos e mantiveram boa saúde por todo o experimento. Durante o período experimental, um animal morreu devido a trauma durante a intubação gástrica. Como esperado, os animais que receberam 17 refeições de sacarose ganharam mais peso durante o período do experimento (tabela 8). Na tabela 9, estão apresentadas as médias dos números de refeições consumidas por cada grupo.

**Tabela 8.** Ganho de peso (g) dos animais expostos ao flúor e diferentes desafios cariogênicos. n=9, média (desvio padrão)

<i>NÚMERO DE REFEIÇÕES / GRUPOS</i>							
3		6		12		17	
<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE*</i>	<i>F</i>
-1,8(5,3) <sub>a,c</sub>	-2,7(2,3) <sub>a</sub>	-1,8(2,0) <sub>a,c</sub>	-2,6(4,6) <sub>a</sub>	3,9(4,7) <sub>a,b,c</sub>	4,4(4,3) <sub>b,c</sub>	6,5(3,9) <sub>b</sub>	5,7(6,9) <sub>b</sub>

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

\* n=8

**Tabela 9.** Número de refeições consumidas. média (desvio padrão)

<i>NÚMERO DE REFEIÇÕES / GRUPOS</i>							
3		6		12		17	
<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE*</i>	<i>F</i>
2,9(0,2)	2,9(0,1)	5,9(0,1)	5,8(0,2)	11,3(0,4)	11,0(0,5)	15,7(0,8)	15(0,6)

\* n=8

Todos os animais desenvolveram cárie de superfície lisa (tabela 10). Os índices mais altos foram observados nos animais que receberam 12 e 17 refeições de sacarose e água destilada estéril; nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre eles. À medida que aumentava o número de refeições de sacarose, índices de cárie de superfície lisa também aumentavam. Flúor presente na água diminuiu índices de cárie de superfície lisa em todos os grupos. O maior efeito protetor em cárie de superfície lisa foi observado no grupo que recebeu 3 refeições de sacarose - 76% de redução de cárie, porém, índice de cárie de superfície lisa no grupo que recebeu 3 refeições e F não foi estatisticamente diferente do grupo que recebeu 3 refeições e ADE. À medida que o número de refeições de sacarose aumentava, o efeito protetor do flúor diminuía; foi observada uma redução de cárie de 50% no grupo que recebeu 6 refeições de sacarose e F quando comparado com o grupo que recebeu 6 refeições de sacarose e ADE. Houve redução de cárie de 41% no grupo que recebeu 12 refeições e F e 38%, no grupo que recebeu 17 refeições de sacarose e F. A severidade das lesões também aumentou, à medida que o número de refeições aumentava. Todos grupos que receberam flúor apresentaram índices de severidade muito menores que aqueles que receberam água destilada estéril; diferenças estatisticamente significantes não foram observadas entre os grupos que receberam flúor. O índice de Ds no grupo que recebeu 17 refeições e flúor e no grupo que recebeu 3 refeições e ADE foi numericamente semelhante, 6,6 e 6,4, respectivamente; diferenças estatisticamente significantes não foram observadas no índice Ds entre o grupo que recebeu 3 refeições e ADE e todos os grupos que receberam flúor. O mesmo padrão foi observado no índice Dm. Estes resultados estão ilustrados na figura 15.

**Tabela 10.** Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade. n=9, média (desvio padrão)

ÍNDICE DE CÁRIE	NÚMERO DE REFEIÇÕES / GRUPOS							
	3		6		12		17	
	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE*</i>	<i>F</i>
E	41,3(21,4) <sub>a,b</sub>	9,8(10,2) <sub>a</sub>	77(27) <sub>c,d</sub>	38,7(18,8) <sub>a,b</sub>	80,9(22) <sub>d</sub>	47,4(16,1) <sub>b</sub>	80,9(21,8) <sub>d</sub>	50(20,4) <sub>b,c</sub>
Ds	6,4 (4,3) <sub>e</sub>	0,6 (1,7) <sub>e</sub>	31(15,7) <sub>f</sub>	1,8 (2,2) <sub>e</sub>	34,8(9,7) <sub>f</sub>	5,9 (5,5) <sub>e</sub>	39,3(17,7) <sub>f</sub>	6,6 (8,0) <sub>e</sub>
Dm	2,1 (2,4) <sub>g</sub>	0,6 (1,7) <sub>g</sub>	17 (9,8) <sub>h</sub>	0,9 (1,6) <sub>g</sub>	16,2 (8) <sub>h</sub>	2,8 (2,8) <sub>g</sub>	19,9(13,9) <sub>h</sub>	4,8 (7,4) <sub>g</sub>

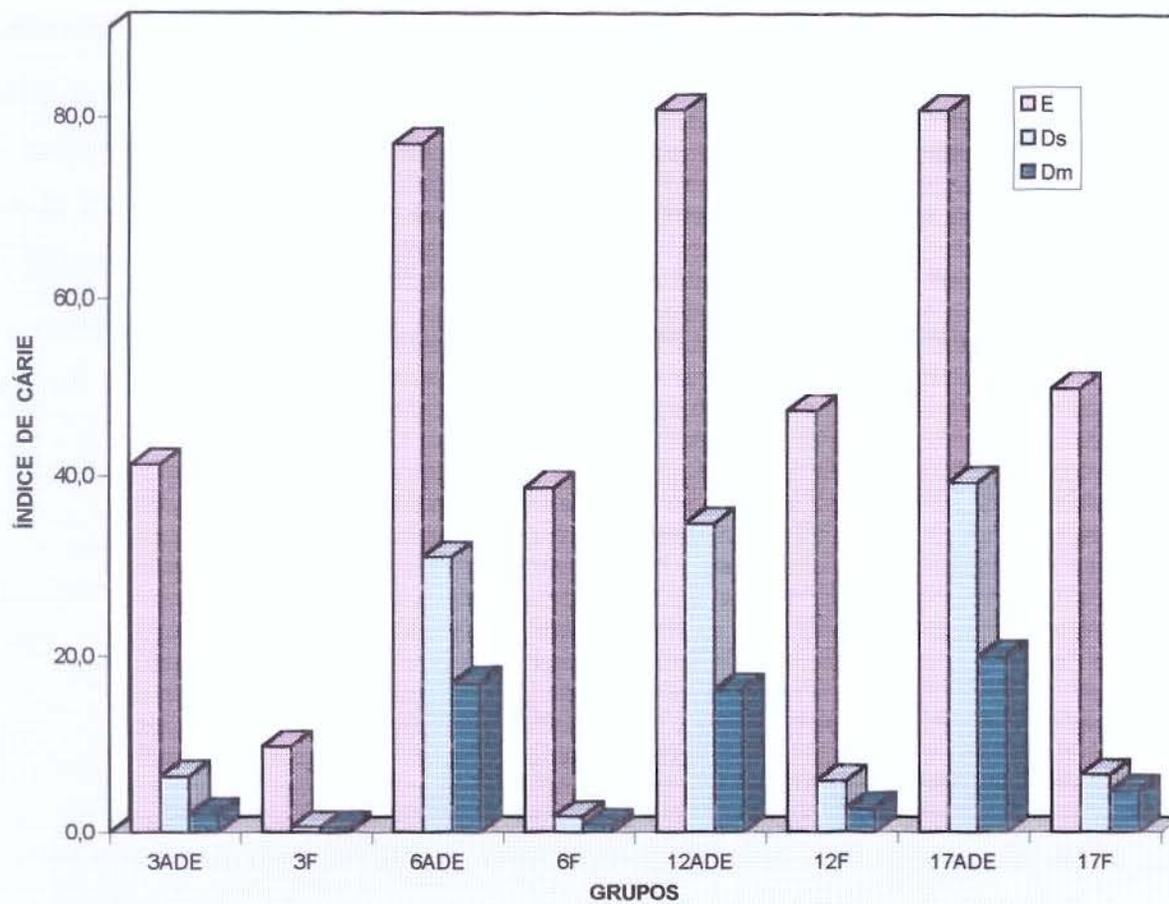
Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

\*n=8

E - somente esmalte

Ds - lesão leve da dentina

Dm - lesão moderada da dentina



**Figura 15. Influência do F e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e sua severidade.**

Tabela 11 mostra índices de cárie de sulco e sua severidade. Os maiores índices de cárie de sulco e severidade foram novamente observados nos animais que receberam 12 e 17 refeições de sacarose, tanto nos grupos que receberam flúor ou água destilada estéril. Os animais, que receberam 3 refeições de sacarose e água fluoretada, apresentaram os menores índices de cárie de sulco, mas não diferiram estatisticamente daqueles dos animais que receberam o mesmo número de refeições e água destilada estéril. Flúor não diminuiu significativamente índices de cárie de sulco e sua severidade. Estes resultados estão ilustrados na figura 16.

Contagens de microbiota total e de *S. sobrinus* diminuíram nos grupos que receberam água fluoretada, à medida que o número de refeições de sacarose aumentava (tabela 12). Os grupos que receberam flúor e 12 ou 17 refeições de sacarose apresentaram significativamente menos microbiota total e de *S. sobrinus* do que o grupo que recebeu flúor e 3 refeições de sacarose. Um decréscimo nas contagens de *S. sobrinus* também foi observado nos grupos que receberam água destilada estéril, à medida que o número de refeições de sacarose aumentava. A porcentagem de *S. sobrinus* não diferiu entre os grupos. Estes resultados estão ilustrados nas figuras 17 e 18.

**Tabela 11.** Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade. n=9, média (desvio padrão)

ÍNDICE DE CÁRIE	NÚMERO DE REFEIÇÕES / GRUPOS							
	3		6		12		17	
	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE</i>	<i>F</i>	<i>ADE*</i>	<i>F</i>
sulco	22,1(4,7) <sub>a</sub>	19,2(5,7) <sub>a</sub>	36,8(8,9) <sub>b</sub>	32,8(6,2) <sub>b</sub>	39,6(4,3) <sub>b</sub>	39,1(2,5) <sub>b</sub>	37,9(1,6) <sub>b</sub>	38,3(6,4) <sub>b</sub>
E	18,8(4,5) <sub>c</sub>	17,1(5,1) <sub>c</sub>	30,3(7,8) <sub>d</sub>	28,3(4,9) <sub>d</sub>	32,8(3,6) <sub>d</sub>	33(2,8) <sub>d</sub>	32(2) <sub>d</sub>	32,8(5,4) <sub>d</sub>
Ds	9(5,3) <sub>e</sub>	6 (6,4) <sub>e</sub>	22,8(8) <sub>f</sub>	21,4 (6,2) <sub>f</sub>	25,7(3,4) <sub>f</sub>	26,3 (3,4) <sub>f</sub>	25,6(3,7) <sub>f</sub>	26 (4,6) <sub>f</sub>
Dm	0,9(1,5) <sub>g,j</sub>	0,2 (0,4) <sub>g</sub>	5,6(3,3) <sub>h,j</sub>	6,3 (4,2) <sub>h</sub>	8,3(3,6) <sub>h,i</sub>	11,6 (4,5) <sub>i</sub>	10,1(3,8) <sub>h,i</sub>	12,4(3,8) <sub>i</sub>

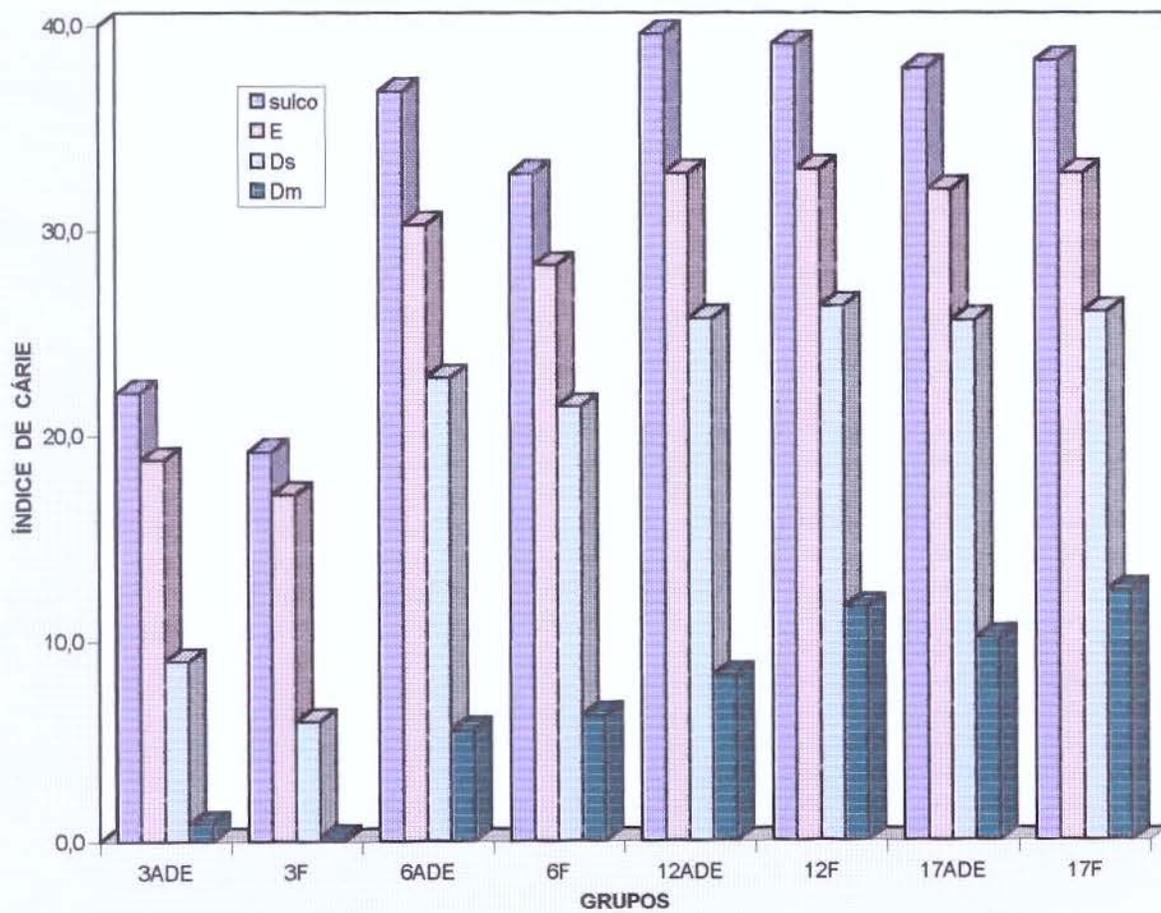
Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

\*n=8

E - somente esmalte

Ds - lesão leve da dentina

Dm - lesão moderada da dentina



**Figura 16. Influência do F e diferentes desafios cariogênicos no desenvolvimento de cárie de sulco e sua severidade.**

**Tabela 12.** Influência do flúor e diferentes desafios cariogênicos na microbiota total e de *S. sobrinus*.  
média(desvio padrão)

MICROBIOTA	NÚMERO DE REFEIÇÕES / GRUPOS							
	3		6		12		17	
	ADE	F	ADE	F	ADE	F	ADE*	F
total, 10 <sup>6</sup> n=9	1,8(1,9) <sub>c,d</sub>	17(4,2) <sub>a</sub>	0,8(0,5) <sub>d</sub>	6,7(4,9) <sub>a,b</sub>	2,1(1,1) <sub>b,c,d</sub>	1,9(1,5) <sub>b,c,d</sub>	13,6(2,7) <sub>b,c</sub>	1,7(1,1) <sub>c,d</sub>
<i>S. sobrinus</i> , 10 <sup>6</sup> n=9	4,4(10) <sub>e,f,g</sub>	4,2(1,4) <sub>e</sub>	0,4(0,4) <sub>g</sub>	1,7(1,4) <sub>e,f</sub>	0,4(0,4) <sub>g</sub>	0,7(0,7) <sub>f,g</sub>	0,3(0,4) <sub>g</sub>	0,5(0,5) <sub>f,g</sub>
% <i>S. sobrinus</i> n=	21,5(18,3) <sub>h</sub>	24,7(7,4) <sub>h</sub>	26,8(28,3) <sub>h</sub>	32,1(21,3) <sub>h</sub>	21(23,9) <sub>h</sub>	34,6(26,4) <sub>h</sub>	15,9(16,6) <sub>h</sub>	28,3(30) <sub>h</sub>
	4	9	7	9	9	9	8	9

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente (p>0,05)

\* n=8

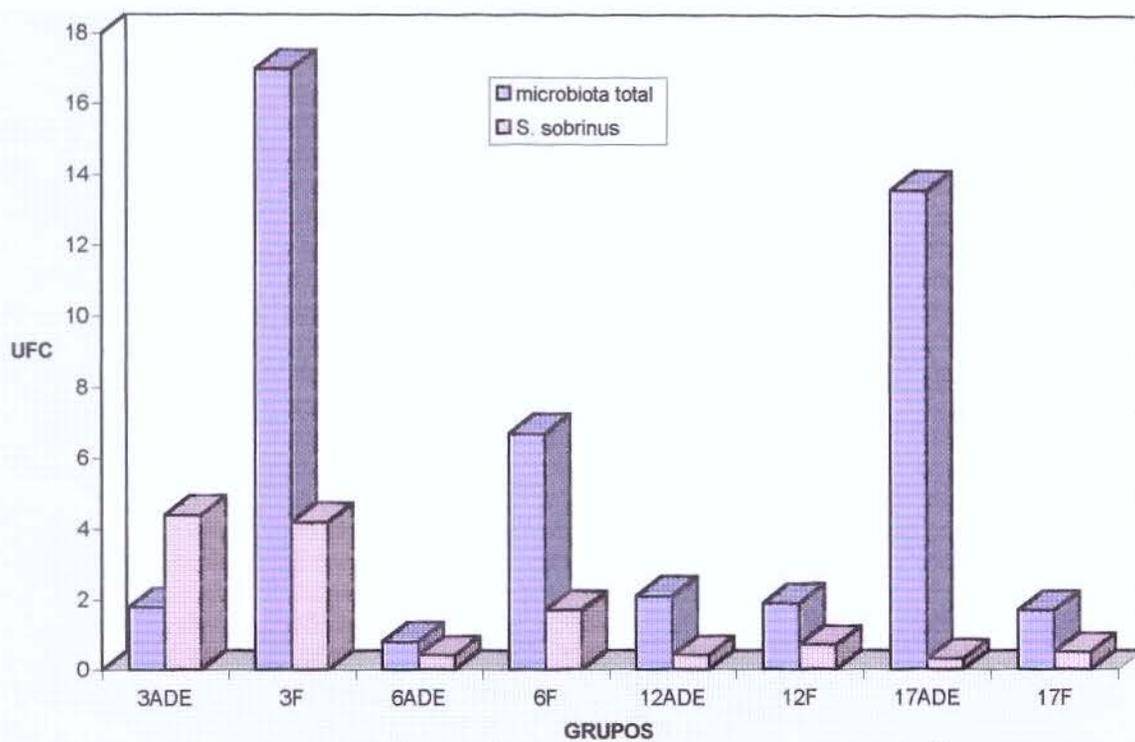


Figura 17. Influência do F e diferentes desafios cariogênicos na microbiota total e de *S. sobrinus* (10<sup>6</sup>).

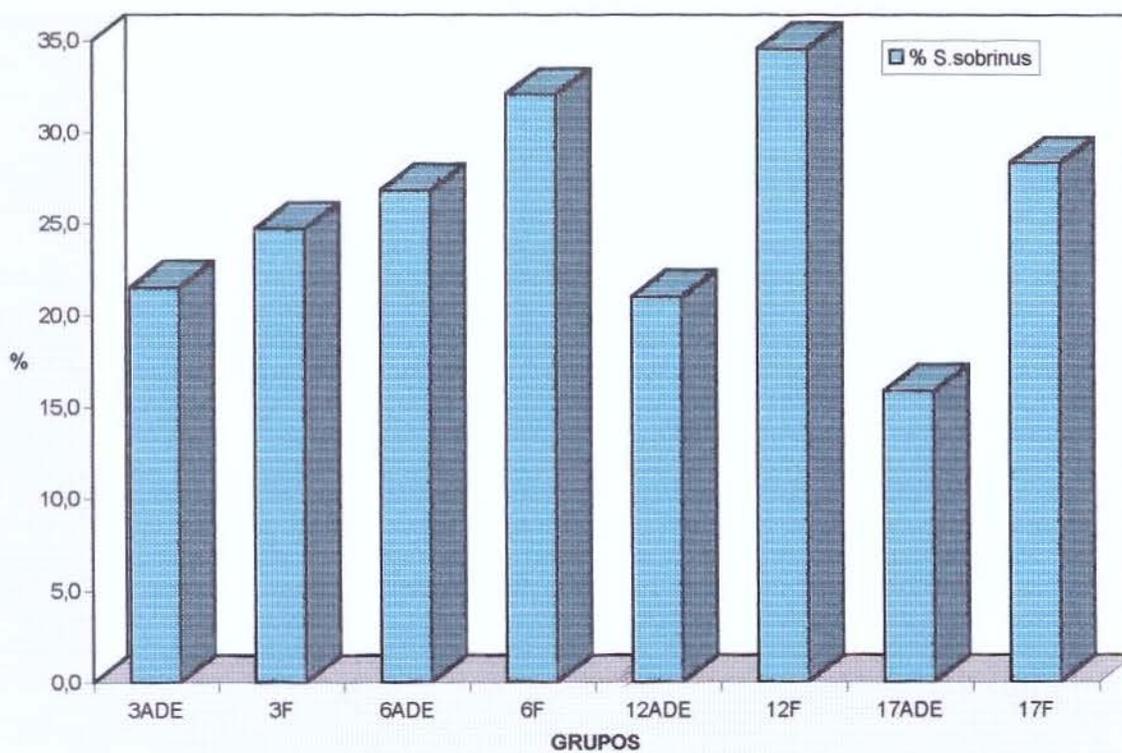


Figura 18. Influência do F e diferentes desafios cariogênicos na porcentagem de *S. sobrinus*.

## *8. DISCUSSÃO*

## 8. DISCUSSÃO

Os resultados do experimento I do presente trabalho claramente confirmam e acrescentam que flúor, quando presente em ótimos níveis no ambiente bucal, é um agente anticariogênico eficaz, mesmo na presença de um desafio cariogênico severo. Neste modelo de alto desafio cariogênico, utilizando animais desalivados, que receberam dieta 2000 *ad libitum*, o grupo que recebeu 10 ppm F não apresentou uma significativa redução na iniciação das lesões cariosas. Entretanto, 10 ppm F foi bastante eficaz em diminuir a severidade das lesões, isto é, em reduzir a velocidade da progressão das lesões cariosas. Estes resultados mostram que F é um agente anticariogênico mais eficaz na redução da progressão ou severidades das lesões cariosas do que na sua iniciação. Esta observação está de acordo com **REINTSEMA et al ( 1985)** que mostraram que quando o esmalte é submetido a um desafio cariogênico contínuo, agentes fluoretados convencionais reduzem a velocidade da progressão da lesão mas não a inibem completamente. Por outro lado, flúor, nas concentrações de 20, 30 e 40 ppm, mostrou-se extremamente eficaz na redução do desenvolvimento e severidade das lesões cariosas. Porém, é possível constatar que concentrações maiores do que 10 ppm F não foram estatisticamente mais eficazes na diminuição da severidade das lesões cariosas. Parece, então, que um aumento da concentração de flúor diminui o número de lesões cariosas, porém não impede totalmente o desenvolvimento, além de não ser superior na diminuição da progressão destas lesões. Índices menores de severidade das lesões no grupo exposto ao flúor quando comparado com aqueles do grupo controle também foram observados por **BOWEN & PEARSON (1994)** em um estudo sobre o efeito de restrição temporária da dieta com e sem flúor sobre a progressão de cárie em ratos desalivados. Entretanto, está igualmente claro que flúor isoladamente não previne totalmente cárie e que existe uma concentração acima da qual nenhum efeito protetor adicional será exercido. Assim, considerando o efeito do flúor na redução de cárie em todas as superfícies lisas, poderia ser sugerido que a 20 ppm, flúor atingiu seu efeito protetor máximo. Entretanto, observando os resultados em cada superfície lisa separadamente, verifica-se que nas superfícies proximais apenas 30 e 40 ppm F foram eficazes em diminuir o índice de cárie e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si; grupos que receberam 10 e 20 ppm F não apresentaram menos lesões cariosas do que o grupo controle. Além disso, na superfície bucal, 30 ppm F foi mais eficaz na redução de cárie

do que 20 ppm, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Desta forma, os resultados sugerem que flúor na concentração de 30 ppm atingiu o efeito protetor platô ou máximo.

Entretanto, comparando o metabolismo do F no rato e em humanos, importantes diferenças nos aspectos quantitativos são verificadas. Na verdade, 30 ppm de flúor para ratos corresponde a 3 ppm para humanos ( **TAVES & GUY, 1979**), porque a concentração de F, isto é, 0,02 ppm, encontrada no sangue de humanos quando da ingestão de água contendo 1,0 ppm F é a mesma encontrada no sangue de ratos quando da ingestão de água contendo 10 ppm F. Então, a concentração de 30 ppm F, que atingiu o efeito protetor máximo no experimento I corresponde a 3 vezes o nível ótimo de F na água, que para humanos é 1,0 ppm em climas temperados ( **WHO, 1986**). Desta forma, esta concentração seria contra-indicada para crianças, devido ao risco de fluorose dental ( **EKSTRAND & WHITFORD, 1984**). Como fluorose dental é decorrente da ingestão de flúor durante a formação dos dentes, adultos poderiam se beneficiar com o uso de F em concentrações mais elevadas. Principalmente, porque estes indivíduos estão sujeitos a um maior desafio cariogênico, isto é, podem apresentar deficiência salivar. Tratamento de câncer com radiação e doenças autoimunes podem levar à diminuição da produção de saliva, e conseqüentemente, há perda das suas propriedades, como efeito antibacteriano e remineralizador ( **BOWEN et al, 1978, EDGAR et al, 1981, FOX et al, 1985**). Além disso, pessoas idosas utilizam muitos medicamentos e vários destes também podem causar deficiência salivar ( **SAUNDERS & HANDELMAN, 1992**). Então, as observações feitas neste experimento sugerem que no planejamento de programas de prevenção para pacientes com alto risco de cárie níveis elevados de concentração de flúor local seriam mais efetivos.

Considerando a porcentagem de redução da cárie nas diferentes superfícies lisas (tabela 5), verifica-se uma maior porcentagem de redução na superfície lingual; a 10 ppm F uma redução estatisticamente significativa de 40% foi alcançada e a maior redução foi no grupo de 30 ppm F (76,1%). Estes resultados sugerem que F é mais eficaz na superfície lingual. Os grupos que receberam 30 e 40 ppm de flúor apresentaram os menores índices de cárie em todas as superfícies. Embora estas concentrações de flúor tenham sido efetivas nas superfícies proximais, a porcentagem de redução de cárie alcançou somente 27%. O fato do flúor ter eficácia reduzida em cárie proximal encontra suporte em outros estudos (**BOWEN &**

PEARSON, 1994; POULSEN et al, 1976) e pode estar relacionado à maior retenção de placa bacteriana e alimentos nesta superfície.

Embora altas concentrações de flúor pareçam ser efetivas em um alto desafio cariogênico, os resultados confirmam que o flúor, mesmo em altas concentrações, não previne cárie completamente. Porcentagens de redução de cárie maiores do que aquelas já relatadas não foram detectadas (HARGREAVES, 1992; O'MULLANE, 1990); a maior porcentagem de redução de cárie de superfície lisa foi observada no grupo que recebeu 30 ppm de flúor e não excedeu 65%.

As porcentagens de redução de cárie do presente trabalho diferem daqueles relatados por MIRTH et al (1985), que compararam o efeito cariostático de flúor administrado a ratos de um sistema de liberação intraoral e de um sistema de liberação subcutâneo. O grupo controle positivo, que recebeu 10 ppm de flúor na água *ad libitum*, apresentou menores índices de cárie de superfície lisa e de sulco do que o grupo não-tratado; as respectivas porcentagens de redução foram 34,3% e 22,3%. Entretanto, no presente estudo os animais foram desalivados, o que representa uma das mais intensas condições de desafio de cárie ( BOWEN et al, 1988).

Cárie dental resulta de um desequilíbrio entre os fenômenos de desmineralização e remineralização e inicia-se com a dissolução dos minerais mais solúveis, como por exemplo apatita carbonatada ( GRÖN et al, 1963; HALLSWORTH et al, 1973). Carbonato, é encontrado em maiores quantidades em certas regiões dos dentes, como os sulcos (ROBINSON et al, 1982). Quando o dente se forma na presença de F, isto é, durante a formação dos dentes ocorre ingestão de água fluoretada ou suplementos, há a formação de dente contendo menos minerais solúveis, como o carbonato ( WEATHERELL, 1975). Então, quando o dente se forma na presença de F, um efeito indireto do F seria a formação de um dente contendo menos carbonato, principalmente nos sulcos, e desta forma, menos suscetível aos ataques ácidos. Este fato pode explicar a ausência do efeito do F nas cáries de sulco neste estudo; o F somente foi oferecido aos animais após a erupção dos dentes. Além disso, nas regiões de sulco existe um maior acúmulo de placa do que comparado às outras regiões do dente, devido à própria anatomia desta superfície ( ÖGAARD, 1990). Este maior acúmulo de placa, que pode ser intensificado pela ausência da saliva, na presença de açúcar leva a quedas

mais significativas de pH, que podem alcançar níveis menores que 4,5, quando então haverá dissolução de hidroxiapatita e também, fluorapatita. Durante todo o tempo em que o pH estiver abaixo de 4,5, o produto iônico de cálcio, fosfato e flúor no meio é inferior ao produto de solubilidade da FA. Desta forma, apesar da presença do F, não haveria um efeito protetor nas regiões de sulco ( **LARSEN, 1990**). A magnitude da redução nas cáries de sulco observada em nosso estudo (10,6%) é menor que aquela observada por **LARSON et al (1976)** que verificou uma redução de cárie de sulco de 75% em animais recebendo água contendo 10 ppm de flúor durante o período experimental após a erupção dos dentes. Apesar da linhagem dos ratos ser diferente e dos animais do presente estudo serem desalivados, a diferença na redução de cárie de sulco é extremamente grande. A mesma redução de cárie de sulco, observada neste trabalho, foi demonstrada por **POULSEN et al ( 1976)**, embora flúor estivesse presente diariamente em 3 ml de leite em uma concentração de 50 ppm.

Existe muita discussão envolvendo os efeitos antimicrobianos do flúor. Flúor pode afetar o metabolismo bacteriano de várias formas ( **BENDER et al, 1986; MARQUIS, 1990; BELLI et al, 1995; MARQUIS, 1995**). A redução induzida pelo flúor na produção de ácido pelas bactérias bucais é devida, em parte, à inibição da enolase, uma enzima glicolítica. Flúor pode também entrar na célula bacteriana como HF e, uma vez dentro da célula, dissociar-se a  $H^+$  e F; o acúmulo de prótons acidifica o citoplasma, reduzindo a atividade enzimática. Bomba de prótons  $H^+/ATPase$  associada à membrana pode ser inibida pelo flúor complexado ao alumínio. De ambas formas, flúor diminui tolerância ácida da bactéria presente na placa. No presente estudo, todos grupos que receberam flúor apresentaram menores contagens de *S. sobrinus* quando comparado com o controle. Esta observação está de acordo com **SCHILLING et al (1985)**, que relataram menores contagens de *S. mutans* em animais que receberam 53 ppm de F na sacarose mas não pode demonstrar que flúor afetou a microbiota total. Entretanto, apenas o grupo que recebeu 40 ppm F apresentou uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de *S. sobrinus* em relação ao grupo controle e grupo que recebeu 10 ppm F, sugerindo que o efeito antimicrobiano do flúor teve importância na redução de cárie observada neste grupo. Surge então a questão se níveis de F na placa são suficientemente altos para ocasionarem uma redução da microbiota cariogênica. Em um trabalho sobre a ação do F como um ácido fraco, reduzindo as propriedades acidúricas de *S. mutans*, **EISENBERG et al (1980)** mostraram que foi necessária uma concentração de 10 mM. Entretanto, parece que a concentração necessária para causar paralisação da glicólise

é dependente do pH do meio, isto é, quanto menor o pH, menor a concentração de F necessária (MARQUIS, 1989). Em pH 6,13 a concentração de F necessária é de 10 mM, enquanto que em pH 4,75, a concentração de F capaz de causar parada da glicólise foi 0,5 mM. Mais recentemente, MARQUIS (1995) relata que F, nas condições de pH 4, em níveis tão baixos quanto 0,1 mM, pode causar interrupção completa da glicólise em células intactas de *S. mutans*. No presente trabalho, apenas 40 ppm de F foi capaz de manter níveis de F suficientes para produzir efeito antimicrobiano, que pode ser demonstrado estatisticamente. Por outro lado esta foi a concentração na água ingerida pelos animais, sendo que a real mantida constante na saliva e/ou placa dental poderia ser determinada.

Apesar de 30 ppm F ter se mostrado como a concentração mais eficaz na diminuição do desenvolvimento de lesões, quando consideramos os riscos e benefícios do uso do F, esta concentração representa 3 vezes a concentração ótima de F na água para humanos. Além disso, concentração de F acima de 10 ppm não resultou em diminuição significativa da severidade das lesões cariosas. Desta forma, no experimento II optou-se pela concentração de 10 ppm. Os resultados do experimento II confirmam estudos anteriores em ratos que mostraram que a frequência da exposição à dieta cariogênica influencia profundamente atividade da cárie (LARSON et al., 1962; KÖNIG et al., 1969; BOWEN et al., 1980). Nesta fase do estudo, uma associação entre o aumento da frequência das refeições e o aumento do número e severidade das lesões cariosas foi observado em animais que receberam flúor ou não. Parece que, a partir dos resultados dos grupos que não foram expostos ao F, um aumento no número de refeições de 12 para 17 não afetou significativamente o número de lesões e severidade de cárie de superfície lisa e de sulco. Esta observação complementa aquela feita por BOWEN et al (1980), os quais observaram que índice de cárie de superfície lisa e de sulco não diferiram em animais intactos alimentados com sacarose 14 e 17 vezes ao dia. Flúor reduziu desenvolvimento e severidade de cárie em todos os grupos e pode ser observado que ele é um agente anticariogênico bastante eficaz. Em acréscimo, animais expostos ao F e recebendo 12 refeições de sacarose ainda apresentaram índice de cárie estatisticamente menor do que os animais expostos à metade desta frequência na ausência do mesmo. Entretanto, nesta investigação, o efeito protetor do flúor contra cárie dental foi influenciado pela frequência de refeições de sacarose, isto é, a severidade do desafio cariogênico. O efeito anticariogênico de flúor a 10 ppm na água foi maior quanto menor o desafio cariogênico. Estes resultados sugerem que limitar a frequência de ingestão de sacarose pode permitir ótima

proteção quando de baixos níveis de flúor. Com a ausência da saliva e alta exposição à sacarose, o pH do meio bucal permanece baixo por um tempo maior. Quando o pH alcança níveis menores que 4,5, o meio ambiente bucal encontra-se subsaturado em relação à HA e FA, que se dissolverão. Desta forma, o efeito protetor do F é limitado ( **LARSEN, 1990**). Pela restrição do desafio cariogênico, o tempo para remineralização é aumentado o que é adicionalmente ativado pela presença do flúor. Indivíduos que têm alta exposição à sacarose podem requerer níveis mais altos de flúor, enquanto que aqueles cuja ingestão de sacarose é muito limitada, podem receber proteção igual ou maior de baixos níveis de flúor. Os resultados de índices de severidade de cárie nos grupos que receberam flúor sugerem que embora alguns efeitos benéficos do flúor tenham sido perdidos à medida que o número de refeições aumentava, flúor continuou a ser muito efetivo em diminuir a severidade das lesões cariosas.

A ausência relativa de um efeito protetor do flúor nas cáries de sulco nesta fase da investigação é consistente com outros estudos ( **POULSEN et al, 1976; BACKER DIRKS et al, 1978; HOROWITZ, 1980; MIRTH et al, 1985; CAHEN et al, 1993**). As superfícies de fossas e fissuras são as menos protegidas pelo flúor devido ao fato de maior acúmulo de placa e maior quantidade de apatita carbonatada nestas regiões, que é um mineral mais solúvel, como já discutido previamente.

Como relatado previamente, existe uma relação positiva entre estreptococos do grupo mutans e desenvolvimento de cárie ( **BOWEN, 1969; DE STOPPELAAR et al, 1969**). Desta forma, resultados das contagens de *S. sobrinus* podem parecer enigmáticos, porque à medida que o número de lesões cariosas aumentava, o número de unidades formadoras de colônias de *S. sobrinus* diminuía nos grupos que receberam água pura ou água fluoretada. Entretanto, evidências em humanos ( **ZINNER & JABLON, 1969**) e animais ( **CORNICK & BOWEN, 1971**) mostram que *S. sobrinus* necessita da presença de uma superfície sólida para colonizar a cavidade bucal. Então, à medida que a cárie dental progredia, a superfície do dente que era habitada por *S. sobrinus* foi destruída, limitando a multiplicação dos microrganismos. Além disso, nos grupos que receberam flúor, o declínio na população *S. sobrinus* também pode ser atribuído aos efeitos antimicrobianos do flúor na bactéria da placa dental ( **MARQUIS, 1995**). Flúor, complexado com alumínio, pode reduzir tolerância das bactérias bucais ao meio ácido, especialmente *S. mutans*, por inibir ATPases translocadoras de prótons ( **STURR & MARQUIS, 1990**). Tolerância a ácidos das bactérias bucais pode também ser reduzida pelo

flúor, que age como um transportador transmembrana de próton ( **BELLI et al, 1995**). Desta forma, podemos sugerir que o declínio na população absoluta de *S. sobrinus* foi devido a uma associação entre perda da superfície dental e os efeitos antimicrobianos do flúor, apesar das porcentagens de *S. sobrinus* não serem estatisticamente diferentes nos diversos grupos.

## 9. CONCLUSÃO

## 9. CONCLUSÃO

Neste modelo de cárie experimental utilizando animais dessalivados:

1. O efeito protetor máximo do flúor nas superfícies lisas é atingido a 30 ppm em água *ad libitum*;
2. Efeito antibacteriano do flúor sobre *S. sobrimus* é observado quando da concentração de 40 ppm em água *ad libitum*;
3. A eficácia do flúor como agente anticariogênico é influenciada inversamente pelo nível do desafio cariogênico, sugerindo que indivíduos que têm alta exposição à sacarose podem requerer níveis mais altos de flúor, enquanto que aqueles cuja ingestão de sacarose é muito limitada, podem receber proteção igual ou maior de baixos níveis de flúor;
4. Flúor é um agente anticariogênico mais eficaz na redução da progressão das lesões cariosas do que na sua iniciação.

10. ANEXOS

**ANEXO 1****Dieta 2000**

	% (p/p)
farinha de trigo.....	6
sacarose.....	56
leite em pó desnatado.....	28
folha de alfafa em pó.....	3
figado.....	1
extrato de levedura.....	4
cloreto de sódio iodatado.....	2

**ANEXO 2****Dieta Líquida NCP#2**

água destilada estéril.....	60,0 ml
Suplemento proteico ProMod.....	67,6 g
Similac Special Care (líquido pobre em ferro).....	232,0 ml
Similac (líquido com ferro).....	232,0 ml
Óleo de milho.....	276,0 ml
volume final (aproximado).....	900,0 ml

Acrescente ProMod e todos os componentes à água em um liquidificador e, usando baixa velocidade, bata até que todos os ingredientes estejam misturados. Coloque a mistura em uma vasilha plástica e uma barra magnética. Mantenha refrigerado. Misture a fórmula antes de usar. Esta fórmula é geralmente suficiente para fornecer alimento através de intubação gástrica para 48 animais por 2 dias.

ProMod é uma marca registrada de Ross Laboratories (Columbus, OH).

Similac é uma marca registrada de Ross Pediatric Laboratories (Columbus, OH).

Mazola foi a marca de óleo de milho utilizada e é uma marca registrada de Best Food Div. CPC Intl. Inc. (Englewood Cliffs, NJ).

## 11. SUMMARY

## 11. SUMMARY

Dental caries is an infectious, transmissible, and multifactorial disease, that continues to affect the vast majority of people and the presence of carbohydrates, mainly sucrose, is an important factor in its occurrence. Although, its incidence has been efficiently controlled in some segments of the population by the use of fluoride, a cariostatic agent. Nevertheless, the amount of fluoride required for optimum effect under a high caries risk condition has not been studied. Besides that, differences in the intensity of carious challenge, for whatever reasons, may play a role in determining the fluctuations in the effectiveness of F. The purpose of the study was to evaluate the effect of different concentrations of F on the development of dental caries and explore the cariostatic effect of F under various levels of cariogenic challenge. Thus, the following study was divided in 2 experiments. In experiment I, sixty desalivated Sprague-Dawley rats received Diet 2000 *ad libitum* for 21 days and the following to drink: group (1) sterile distilled water (SDW); (2) 10 ppm F SDW; (3) 20 ppm F SDW; (4) 30 ppm F SDW; (5) 40 ppm F SDW. In experiment II, eight groups of 9 desalivated rats were placed in a König-Höfer programmed feeder and were fed sucrose as follows: two groups received 3 meals daily, two groups 6 meals, two groups 12 meals and two groups 17 meals. One group from each pair received drinking water containing 10 ppm F and the other SDW. In experiment I, 20, 30 and 40 ppm F reduced caries development significantly. Fluoride, at 10 ppm, reduced the severity of the carious lesions significantly. Considering all smooth surfaces, it seems that at 30 ppm, F reached a "plateau" protective effect. The percentage of *S. sobrinus* in the 40 ppm F group was significantly lower than the control group, showing that the antibacterial effect of F may have had a significative contribution to the caries reduction in this group. Using this model of high cariogenic challenge, the results suggest that elevated levels of F may be effective in patients at high caries risk. In experiment II, F reduced the incidence and severity of smooth-surface caries in all groups, but the animals receiving 3 meals and F did not show significantly lower scores than the animals receiving 3 meals and SDW. The protective effect of F decreased as the number of meals increased. It is concluded that the effectiveness of F is influenced by the level of cariogenic challenge and that consideration should be given to adjusting level of F exposure based on caries risk.

## **12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

1. BACHRA, B.N., TRAUTZ, O.R., SION S.L. Precipitation of calcium carbonates and phosphates - III. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.10, n.5, p.731-738, Sept./Oct. 1965.
2. BACKER DIRKS, O., KÜNZEL, W., CARLOS J.P. Caries-preventive water fluoridation. **Caries Res.**, Basel, v.12, p.7-14, 1978. [Supplement, 1]
3. BELLI, W.A., BUCKLEY, D.H., MARQUIS, R.E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.785-791, 1995.
4. BENDER, G.R., SUTTON, S.V.W., MARQUIS, R.E. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. **Infect. Immun.**, v.53, p.331-338, 1986.
5. BOWEN, W.H. Defense mechanism in the mouth and their possible role in the prevention of dental caries: a review. **J. oral Path.**, Copenhagen, v.3, p.266-278, 1974.
6. \_\_\_\_\_. Dental Caries. **Archs Dis. Childh.**, v.47, p.849-853, 1972.
7. \_\_\_\_\_. Dental caries: is it an extinct disease? **J. Am. dent. Ass.**, Chicago, v.122, p.49-52, 1991.
8. \_\_\_\_\_. The effect of fluoride and molybdate on caries activity in monkeys (*Macaca fascicularis*). **Br. dent. J.**, London, v.135, p.489-493, 1973.
9. \_\_\_\_\_. The induction of rampant dental caries in monkeys (*Macaca irus*). **Caries Res.**, Basel, v.3, p.227-237, 1969.
10. \_\_\_\_\_, HEWITT, M.J. Effect of fluoride on extracellular polysaccharide production by *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res.**, Washington, v.53, p.627-629, 1974.
11. \_\_\_\_\_, PEARSON, S.K. Residual effects of fluoride on a severe cariogenic challenge in rats. **Caries Res.**, Basel, v.28, p.246-50, 1994.
12. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, FALANY, J.L. Influence of sweetening agents in solution on dental caries in desalivated rats. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.35, n.10, p.839-844, 1990.
13. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, YOUNG, D.A. The effect of desalivation on coronal and root surface caries in rats. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, n.1, p.21-23, Jan.1988.
14. \_\_\_\_\_. et al. The effects of irradiation on dental caries in primates (*M. mulatta*). **Caries Res.**, Basel, v.12, p.112, 1978. [Abstract]

<sup>1</sup> 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".

15. BOWEN, W.H. et al. The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat. *In: Leach, S. Factors Relating to Demineralisation and Remineralisation of the Teeth.* Oxford: IRL Press, 1986. p.243-250.
16. \_\_\_\_\_ et al. Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. *Caries Res.*, Basel, v.17, p.466-471, 1983a.
17. \_\_\_\_\_ et al. Influence of various diets administered by gastric gavage on cariogenicity of foods. *Caries Res.*, Basel, v.17, p.525-531, 1983b.
18. \_\_\_\_\_ et al. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J. Am. dent. Ass.*, Chicago, v. 100, p.677-681, 1980.
19. BRUDEVOLD, F. et al. Reaction of tooth surfaces with one ppm of fluoride as sodium fluoride. *J. dent. Res.*, Washington, v.36, n.5, p.771-779, Oct. 1957.
20. CAHEN, A.M. et al. Caries prevalence in 6- to 15-year-old French children based on the 1987 and 1991 national surveys. *J. dent. Res.*, Washington, v.72, p.1581-1587, 1993.
21. CARLSSON, J. et al. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.15, p.1143-1148, 1970.
22. CATALANOTTO, F.A., SHKLAIR, I.L., KEENE, H.J. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. *J. Am. dent. Ass.*, Chicago, v.91, p.606-609, Sept. 1975.
23. CHEYNE, V.D. Effects of selective salivary gland extirpation upon experimental dental caries in the rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, Baltimore, v.18, p.587-591, 1939.
24. CLARKE, J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br. J. Exp. Pathol.*, v.5, p.141-146, 1924.
25. CORNICK, D.E.R., BOWEN, W.B. Development of the oral flora in new born monkeys (*Macaca irus*). *Br. dent. J.*, London, v.130, p.231-234, Mar. 1971.
26. CURY, J.A. Uso do fluor. *In: BARATIERI, L.N. Dentística - Procedimentos Preventivos e Restauradores.* Livraria Editora Santos, 1992. cap.2.
27. \_\_\_\_\_, REBELLO, M.A.B., DEL BEL CURY, A.A. *In situ* Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque. *Caries Res.*, 1997. [no prelo]
28. DEAN, H.T. Epidemiological studies in the United States. *Am. Ass. Adv. Sci.*, p.5-31, 1946. Apud BACKER DIRKS, O., KÜNZEL, W., CARLOS J.P. *Op. Cit.* Ref. 2.
29. DE STOPPELAAR, J.D., VAN HOUTE, J., BACKER DIRKS, O. The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Res.*, Basel, v.3, p.190-199, 1969.

30. EDGAR, W.M., BOWEN, W.H., COLE, M.F. Development of rampant dental caries, and composition of plaque fluid and saliva in irradiated primates. **J. Oral Path.**, Copenhagen, v.10, p.284-295, 1981.
31. EISENBERG, A.D., BENDER, G.R., MARQUIS, R.E. Reduction in the aciduric properties of the oral bacterium *Streptococcus mutans* GS-5 by fluoride. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.25, p.133-135, 1980.
32. EKSTRAND, J., WHITFORD, G.M. Fluoride in Body Fluids - Cariostatic and Toxicologic Aspects. *In*: GUGGENHEIM, B. **Cariology Today**. Basel: Karger, 1984. p.269-278.
33. ENGLANDER, H.R., KEYES, P.H. The prevention of dental caries in the Syrian hamster after repeated topical application of sodium fluoride gels. **J. Am. dent. Ass.**, Chicago, v.73, p.1342-1347, Dec. 1966.
34. ERICSSON, S.Y. Cariostatic mechanisms of fluorides: clinical observations. **Caries Res.**, Basel, v.11, p.2-41, 1977. [Supplement, 1]
35. FEATHERSTONE, J.D.B. Chemistry and Physiology of Dental Caries. **Chemy N. Z.**, Feb. 1980.
36. FITZGERALD, R.J., KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Am. dent. Ass.**, Chicago, v.61, n.1, p.23-33, July 1960.
37. FOX, P.C. et al. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. **J. Am. dent. Ass.**, Chicago, v.110, p.519-525, 1985.
38. FU, J. et al. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid production. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, sp.issue, p.493, 1991. [Abstract 1815]
39. GEDDES, D.A.M. Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. **Caries Res.**, Basel, v.9, n.2, p.98-109, Oct. 1975.
40. GRÖN, P. et al. The effect of carbonate on the solubility of hydroxylapatite. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.8, p.251-263, May/June 1963.
41. 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.
42. HAMILTON, I.R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, special issue, p.660-667, Feb. 1990.
43. HARGREAVES, J.A. The level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to caries resistance. **J. dent. Res.**, Washington, v.71, p.1244-1248, 1992.

44. HOROWITZ, H.S. Combinations of caries-preventive agents and procedures. **J. dent. Res.**, Washington, v.59, p.2183-2189, 1980.
45. JACOBY, R.O., BHATT, P.N., JONAS, A.M. *In: The Laboratory Rat*. Academic Press, v.1, 1979. p.284.
46. JENKINS, G.N. **The Physiology and Biochemistry of the mouth**. 4.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.
47. KEYES, P.H. 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, 1958.
48. \_\_\_\_\_. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.1, p.304-320, Mar. 1960.
49. \_\_\_\_\_, JORDAN, H.V. Periodontal lesions in the Syrian hamster. II. Findings related to an infectious and transmissible component. **Archs oral Biol.**, v.9, n.4, p.377-400, July/Aug. 1964.
50. KITE, O.W.; SHAW, J.H.; SOGNAES, R.F. The prevention of experimental tooth decay by tube-feeding. **J. Nutr.**, v.42, p.89-102, 1950.
51. KÖNIG, K.G., LARSON, R.H., GUGGENHEIM, B. A strain-specific eating pattern as a factor limiting the transmissibility of caries activity in rats. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.14, p.91-103, 1969.
52. \_\_\_\_\_, SCHMID, P., SCHMID, R. An apparatus for frequency-controlled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.13, p.13-26, 1968.
53. KRASSE, B. Human Streptococci and experimental caries in hamsters. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.11, p.429-436, 1966.
54. \_\_\_\_\_. et al. Implantation of caries-inducing streptococci in the humans oral cavity. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.12, n.2, p.231-236, Feb. 1967.
55. LAGERLÖF, F., OLIVEBY, A. Caries-protective factors in saliva. **Adv. dent. Res.**, Washington, v.8, n.2, p.229-238, July 1994.
56. LARSEN, M.J. Chemical events during tooth dissolution. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, special issue, p.575-580, Feb. 1990.
57. LARSON, R.H. Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes' method. *In: TANZER, J.M. Animal Models in Cariology. Microbiol Abstr (sp suppl)*. Washington: IRL Press, 1981. p.195-203.
58. \_\_\_\_\_, RUBIN, M., ZIPKIN, I. Frequency of eating as a factor in experimental dental caries. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.7, p.463-468, 1962.

59. LARSON, R.H., THEILADE, E., FITZGERALD, R.J. The interaction of diet and microflora in experimental caries in the rat. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.12, n.5, p.663-668, May 1967.
60. \_\_\_\_\_. et al. Caries inhibition in the rat by water-borne and enamel-bound fluoride. **Caries Res.**, Basel, v.10, p.321-331, 1976.
61. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
62. MADISON, K.M. et al. Caries incidence in intact rats infected with *S. sobrinus* via transmission from desalivated cagemates. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, n.5, p.1154-1159, May 1990.
63. \_\_\_\_\_. et al. Effect of desalivation and age on susceptibility to infection by *S. sobrinus*. **Caries Res.**, Basel, v.23, p.70-74, 1989.
64. \_\_\_\_\_. et al. Enhancing the virulence of *S. sobrinus* in rats. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, n.1, p.38-43, Jan. 1991.
65. MANDEL, I.D. Caries prevention: current strategies, new directions. **J. Am. dent. Ass.**, Chicago, v.127, p.1477-1488, 1996.
66. MARQUIS, R.E. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.955-964, 1995.
67. \_\_\_\_\_. Physiology of fluoride inhibition of oral bacteria. **J. dent. Res.**, Washington, v.68, special issue, p.1694-1695, 1989.
68. \_\_\_\_\_. Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, special issue, p.672-675, 1990.
69. MIRTH, D.B. et al. Comparison of the cariostatic effect of topically and systemically administered controlled-release fluoride in the rat. **Caries Res.**, Basel, v.19, p.466-474, 1985.
70. NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **J. Dent. Child.**, Chicago, v.36, n.4, p.239-248, July/Aug. 1969.
71. \_\_\_\_\_, FROSTELL, G. Sugar restriction and substitution for caries prevention. **Caries Res.**, Basel, v.12, p.65-73, 1978. [Supplement, 1]
72. O'CONNELL, A.C., BOWEN, W.H. Influence of rampant caries in dams on caries activity in their offspring. **Pediat. Dent.**, Chicago, v.13, n.6, p.361-366, Nov./Dec. 1991.
73. ØGAARD, B. Effects of fluoride on caries development and progression *in vivo*. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, special issue, p.813-819, Feb. 1990.

74. O'MULLANE, D.M. The future of water fluoridation. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, special issue, p.756-759, 1990.
75. POULSEN, S., LARSEN, M.J., LARSON, R.H. Effect of fluoridated milk and water on enamel fluoride content and dental caries in the rat. **Caries Res.**, Basel, v.10, p.227-233, 1976.
76. REINTSEMA, H.M., SCHUTHOF, J., ARENDS, J. An *in vivo* investigation of the fluoride uptake in partially demineralized human enamel from several different dentifrices. **J. Dent. Res.**, v.64, p.19-23, 1985.
77. ROBINSON, C., NANCOLLAS, G.H., TEN CATE, J.M. Alterations in the composition of permanent human enamel during carious attack. *In*: Leach, S. **Demineralisation and Remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1982. p.209-223.
78. RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of GTF and polysaccharides. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.97, p.115-119, 1989.
79. \_\_\_\_\_, BOWEN, W.H. Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.85, n.2, p.149-151, Jan./Feb. 1977
80. \_\_\_\_\_, CIARDI, J.E., SCHULTZ, S.A. Adsorption of GTF to saliva coated hydroxyapatite. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.91, p.112-117, 1983.
81. \_\_\_\_\_, SCHEIE, A.A., CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.93, p.105-111, 1985.
82. 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.
83. \_\_\_\_\_, PEARSON, S.K., BOWEN, W.H. Effects 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.
84. SAS Institute Inc. **JMP® User's Guide: Version 2 of JMP**. Cary, SAS Institute, 1989.
85. SAUNDERS, R.H., HANDELMAN, S.L. Effects of hyposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adults aged 65 and older. **Spec. Care Dent.**, v.12, n.3, p.116-121, 1992.
86. SCHILLING, K., PEARSON, S.K., BOWEN, W.H. Effects of inclusion of essential ions in sugar on dental caries. **J. dent. Res.**, Washington, v.64, p.212, 1985. [Abstract, 339]
87. \_\_\_\_\_, BOWEN, W.H. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, n.1, p.2-8, Jan. 1988.

88. SHELLIS, R.P., DUCKWORTH, R.M. Studies on the cariostatic mechanism of fluoride. **Int. dent. J.**, Guildford, v.44, n.3, p.263-273, June 1994. [Supplement, 1]
89. SILVERSTONE, L.M. Remineralization phenomena. **Caries Res.**, Basel, v.11, p.59-84, 1977. [Supplement, 1]
90. STURR, M.G., MARQUIS, R.E. Role of aluminum in fluoride inhibition of proton translocating ATPases. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.214, 1990.
91. TANZER, J.M. Essential dependence of smooth surface caries on, and augmentation of fissure caries by sucrose and *S. mutans* infection. **Infect. Imm.**, v.25, n.2, p.526-531, Aug. 1979.
92. TAVES, D.R., GUY, W.S. Distribution of fluoride among body compartments. *In: JOHANSEN, E., TAVES, D.R., OLSEN, T.O. Continuing evaluation of the use of fluorides.* Boulder: Westview Press, 1979. cap.7.
93. 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 remineralization. **Caries Res.**, Basel, v.20, p.193-201, 1986.
94. VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. dent. J.**, Guildford, v.30, n.4, p.305-326, 1980.
95. \_\_\_\_\_. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. dent. Res.**, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.
96. \_\_\_\_\_. et al. Role of sucrose in colonization of *Streptococcus mutans* in conventional Sprague-Dawley rats. **J. dent. Res.**, Washington, v.55, n.2, p.202-215, Mar./Apr. 1976.
97. WEATHERELL, J.A. Composition of dental enamel. **Br. Med. Bull.**, v.31, p.115, 1975. Apud JENKINS, G.N. *Op. Cit.* Ref. 42.
98. \_\_\_\_\_, ROBINSON, C., HALLSWORTH, A.S. The concept of enamel resistance - a critical review. *In: GUGGENHEIM, B. Cariology Today.* Basel: Karger, 1984. p.223-229.
99. WENNERHOLM, K., BIRKHED, D., EMILSON, C.G. Effects of sugar restriction on *S. mutans* and *S. sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.29, p.54-61, 1995.
100. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Appropriate use of fluorides for human health.** Geneva: WHO, 1986.
101. ZINNER, D.D., JABLON, J.M. Cariogenic streptococci in infants. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.14, p.1429-1431, 1969.

102. XU, T., OPPENHEIM, F.G. Salivary antimicrobials: where are we?. In: BOWEN, W.H., TABAK, L.A. **Cariology for the Nineties**. Rochester: University of Rochester Press, 1993. p. 117-131.