

A CARIOGENICIDADE DO LEITE MATERNO E BOVINO EM UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS

VITOR HENRIQUE DIGMAYER ROMERO¹; MARINA SOUZA AZEVEDO²;
ANDREIA DRAWANZ HARTWIG²; IVAM FREIRE JUNIOR²; CÁCIA SIGNORI²;
MAXIMILIANO SERGIO CENCI³

¹Universidade Federal de Pelotas – vitordigmayer@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marinasazevedo@hotmail.com; andreiahartwig@hotmail.com;
ivamfreire@gmail.com; caciasignori@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a doença crônica mais comum entre crianças no mundo, apesar da redução de sua prevalência nas últimas décadas (WHO, 2003). Em crianças com menos de 71 meses de idade, a prevalência de cárie dentária varia de 0,8% a 46% (FOLAYAN et al., 2015).

Sabe-se que a cárie é uma doença comportamental açúcar dependente (SHEIHAM; JAMES, 2015), assim o que determina a resposta cariogênica do biofilme é a exposição aos açúcares, modulado pelo tipo de substrato cariogênico, pela frequência e pela quantidade de exposições (CENCI; AZEVEDO; DEMARCO, 2015).

O aleitamento materno exclusivo até os 6 meses, e complementar dos 6 meses até os 2 anos ou mais tem sido fortemente recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) uma vez que traz inúmeros benefícios para a criança, para a mãe e para a sociedade.

Todavia, o aleitamento materno, principalmente noturno e de longa duração tem sido apontado como um fator predisponente para o desenvolvimento da cárie (CHAFFEE et al., 2015).

Biofilmes formados a partir da microflora oral têm sido usados para responder questões relacionadas à cárie (SIGNORI et al., 2016). Porém, nenhum estudo in vitro utilizando um modelo de biofilme de microcosmos testando a cariogenicidade do leite humano foi encontrado.

Diante dos inúmeros benefícios do aleitamento materno e do seu possível papel no desenvolvimento da cárie dentária e da ausência de estudos com formação de biofilme devidamente controlados, este estudo tem o objetivo de verificar o efeito do leite materno isolado e associado à sacarose na cariogenicidade do biofilme e na perda mineral de substratos dentários em um modelo de biofilme de microcosmos.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sob protocolo de número 1.550.920.

O cálculo amostral foi realizado através do programa Sealed Envelope®, e obteve-se o número de cinco amostras por grupo, totalizando 30 amostras.

O experimento foi realizado seguindo modelo de biofilme previamente descrito por VAN DE SANDE (2011).

O biofilme foi cultivado em um Meio Definido por Mucina (DMM). Saliva humana foi utilizada como inóculo para promover a multiplicidade de microorganismos no biofilme. O leite materno foi doado por uma única mulher, saudável. A proporção de leite para DMM foi de 50% cada parte. Discos de esmalte foram confeccionados a partir de incisivos centrais de bovinos, tiveram a micro dureza superficial analisada e foram esterelizados.

Os espécimes foram divididos de acordo com as condições de tratamento em 6 grupos: DMM sem sacarose (Controle negativo), DMM com 1% de sacarose (DMM+) (Controle positivo), leite materno com DMM, leite materno com DMM+, leite bovino com DMM e leite bovino com DMM+. Os espécimes foram dispostos em placas de 24 micro-poços, inoculados com 400 µl de saliva cada, e incubados em estufa durante 1 hora. Após a incubação, foi adicionado 1,8 mL da solução correspondente de tratamento para cada grupo. Os biofilmes foram expostos ao tratamento por 6 horas diárias, e 18 horas com DMM puro. As trocas eram realizadas todos os dias, e os espécimes submersos em solução salina estéril durante cada troca. Os biofilmes foram incubados em uma jarra de anaerobiose (5-10% CO₂, <1% O₂), a 37°C, durante 5 dias. O pH do sobrenadante foi coletado diariamente após cada troca realizada.

As variáveis de resposta analisadas foram a perda de dureza superficial (%PDS) utilizando um microdurômetro (Future-Tech FM) acoplado a um endentador Knoop (carga de 50 gramas/5 segundos), a composição microbiológica dos biofilmes através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), quantificados em microorganismos totais (MT), estreptococos do grupo mutans (EGM), lactobacilos (L) e ácido-tolerantes (AT) e o pH do sobrenadante.

Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas diferenças significantes entre os grupos em relação a perda de dureza superficial (Figura 1). Todos os grupos tiveram uma menor perda mineral significativa ($p < 0.005$) comparado com o grupo DMM com 1% de sacarose (controle positivo). Leite humano e bovino associados a 1% de sacarose mostraram maior perda mineral, porém estatisticamente similar ao respectivo grupo sem adição de sacarose ($p = 0.178$, $p = 0.09$). O controle negativo (DMM) apresentou a menor perda mineral, e foi estatisticamente similar a quase todos os grupos, exceto ao controle positivo (DMM+) e ao leite materno com DMM+.

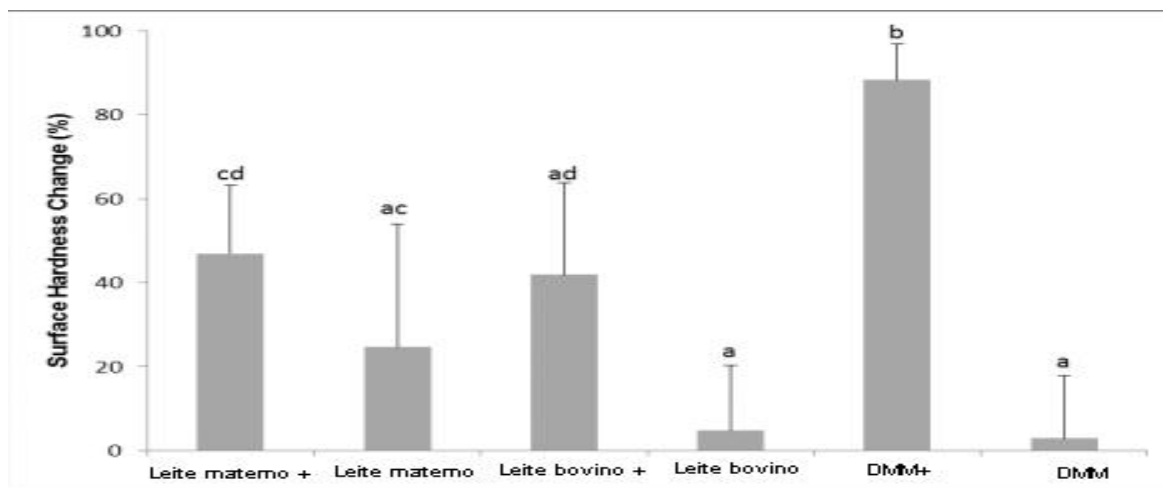


Figura 1. Perda de dureza superficial (%PDS) e desvio padrão de acordo com a condição de tratamento dos biofilmes. Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa.

Um padrão na mudança de pH foi observada entre todos os grupos, exceto no grupo DMM (Tabela 1). Os valores de pH do sobrenadante após 6 horas foram semelhantes entre o grupo DMM + e o grupo leite materno associado a 1% sacarose.

Tabela 1. Média dos valores do pH do sobrenadante de acordo com a condição de tratamento.

Condição de tratamento	Depois de 6 horas (Tratamento)		Depois de 18 horas (DMM)	
	Media	SD	Media	SD
Leite materno +	3,93 ^{be}	0,91	6,42 ^{cd}	1,49
Leite materno	4,11 ^{de}	0,95	6,53 ^{bd}	1,51
Leite bovino +	4,25 ^{cd}	0,99	6,26 ^c	1,47
Leite bovino	4,53 ^{ac}	1,05	6,16 ^c	1,46
DMM+	3,82 ^b	0,90	6,60 ^b	1,55
DMM	6,42 ^a	1,51	6,82 ^a	1,61

Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa em cada tempo ($p < 0.05$).

Houve diferenças entre os grupos na contagem das UFCs. Foram encontrados maiores valores de microorganismos no grupo da sacarose e do leite bovino. Não foi encontrado crescimento de lactobacilos e total de acidúricos no grupo suplementado apenas com DMM em comparação com os outros grupos ($p = 0.001$). Grupo do leite bovino apresentou maior valor de total de acidúricos em comparação com o grupo de leite materno ($p = 0,019$).

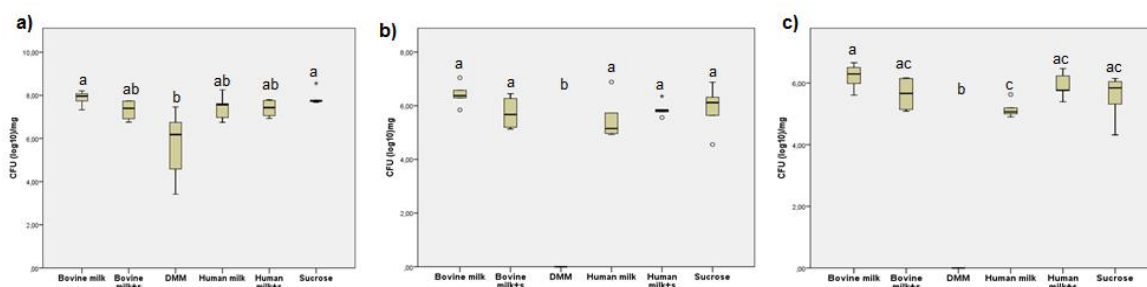


Figura 2. Valores de UFC de acordo com o tratamento de condição de crescimento após 5 dias. (A) Microorganismos totais, (B) Lactobacilos. (C) Acidúricos. Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa.

Esse foi o primeiro estudo a testar a cariogenicidade do leite materno e bovino num modelo de biofilme de microcosmos. Os resultados mostram que existe um potencial cariogênico no leite materno, que é menos expressivo que o da sacarose. A adição de sacarose no leite materno aumenta a desmineralização, mas não a níveis da sacarose unicamente.

Estudos clínicos e epidemiológicos recente tem chamado atenção sobre o potencial cariogênico do leite materno (CHAFFEE, 2015). Geralmente esse potencial está associado a um prolongado aleitamento, onde as crianças estão sujeitas a outros alimentos e fluídos cariogênicos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrados resultados controversos. Um estudo com ratos demonstrou que o leite materno tem potencial cariogênico maior que o leite bovino. A explicação para isso seria a de que o leite materno possui menor quantidade de minerais e maior quantidade de lactose em relação ao leite bovino (BOWEN, 2005). Uma limitação desse e de alguns trabalhos é de que eles não usam saliva humana, o que pode superestimar os resultados.

4. CONCLUSÕES

Baseado nos presentes resultados, é possível dizer que o leite materno tem um potencial cariogênico, principalmente se associado a sacarose. Futuros estudos devem ser realizados para confirmar essa tese. Apesar do potencial cariogênico encontrado no leite materno, a amamentação não deve ser desencorajada devido aos seus inúmeros benefícios (HORTA, 2013).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWEN, W. H. ; LAWRENCE, R. A. Comparison of the cariogenicity of cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose. **Pediatrics**, v.116, n.4, p.921-6, 2005.

CENCI, M.S; AZEVEDO, M.S; DEMARCO, F.F. Como as pesquisas de excelência na área de Cariologia e Dentística podem contribuir para a prevenção e o tratamento da doença cárie? **Rev Assoc Paul Cir Dent**, 2015;69(4):394-5.

CHAFFEE, B. W.; FELDENS, C. A.; RODRIGUES, P. H. ; VITOLO, M. R. Feeding practices in infancy associated with caries incidence in early childhood. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.43, n.4, p.338-48, 2015.

FOLAYAN, M. O.; KOLAWOLE, K. A.; OZIEGBE, E. O.; OYEDELE, T.; SHOMOJI, O. V.; CHUKWUMAH, N. M. ; ONYEJAKA, N. Prevalence, and early childhood caries risk indicators in preschool children in suburban Nigeria. **BMC Oral Health**, v.15, p.72, 2015.

HORTA, B. V., C. . Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. World Health Organization. . **World Health Organization.**, 2013.

SHEIHAM, A. ; JAMES, W. P. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **J Dent Res**, v.94, n.10, p.1341-7, 2015.

SIGNORI, C.; VAN DE SANDE, F. H.; MASKE, T. T.; DE OLIVEIRA, E. F. ; CENCI, M. S. Influence of the Inoculum Source on the Cariogenicity of in vitro Microcosm Biofilms. **Caries Res**, v.50, n.2, p.97-103, 2016.

VAN DE SANDE, F.H.; AZEVEDO, M.S.; LUND, R.G.; HUYSMANS, M.C.D.N.J.M.; CENCI, M.S. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v.27, n.9, p.1057-1063, 2011.

WHO. World Health Organization: The World Oral Health Report 2003: Continuous Improvement of Oral Health in the 21st Century – the Approach of the WHO Global Oral Health Programme. Geneva: World Health Organization; 2003. 2003.