

*Denise Tostes*  
DENISE TOSTES OLIVEIRA *5/12*  
CIRURGIÃ - DENTISTA

## EFEITO CRÔNICO DO FLÚOR NO ESMALTE E NOS AMELOBLASTOS SECRETORES DE INCISIVOS DE RATOS

ORIENTADORA: Prof.a Dr.a Tereza de Lourdes S. Barrichello *Tereza de Lourdes S. Barrichello*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biologia e Patologia Buco-Dental, na  
Área de Histologia e Embriologia, da Facul-  
dade de Odontologia de Piracicaba, Univer-  
sidade Estadual de Campinas, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - S. P.  
1.988

Aos meus pais JOB e TEREZINHA, principais  
responsáveis pelas minhas gran-  
des vitórias;

e aos meus irmãos

DÉCIO,  
DELMA,  
DAVID,  
DANIEL,  
DALVO,  
DANILO e  
cunhada INÊS,

dedico este trabalho.

À Dra TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, Prof  
fessora Assistente Doutora do Departamento  
de Morfologia da Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba (UNICAMP) meus agradecimentos  
pela orientação, amizade e apoio durante o  
desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. JAIME APARECIDO CURY, Professor Adjun  
to do Departamento de Ciências Fisioló  
gicas da Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba (UNICAMP) co-orientador des  
te trabalho, meus agradecimentos pela  
elevada contribuição na minha formação  
científica.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, Professor Titular do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelos preciosos minutos que esclareceram minhas dúvidas e pelas contribuições do texto em inglês;
- aos Professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), Dr. FAUSTO BÉRZIN, Dr. CÁSSIO O.G. MUNHOZ e Dr. GUILHERME BLUMEN, do Depto. de Morfologia, e Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA do Depto. de Diagnóstico Oral, pela contribuição científica;
- ao Prof. LUIZ MÁRIO GUIMARÃES GONÇALVES, Vice-Reitor da Universidade Federal de Uberlândia, pela concessão da bolsa de estudos;
- ao Prof. NELSON MOREIRA FILHO, Chefe do Depto. de Odontologia Clínica e Restauradora da Universidade Federal de Uberlândia, pelo incentivo e apôio durante o curso e auxílio na concessão da bolsa de estudos;
- ao meu irmão DANILO TOSTES OLIVEIRA, pela valiosa contribuição científica, correção do texto e constante estímulo nos momentos mais difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho;
- ao colega NILSON J. MORAL, pelas dosagens de cálcio realizadas na PREVLAB;
- às funcionárias IVANI ODAS DEMÉTRIO, MARIA APARECIDA S. VARELLA e ELIENE APARECIDA O. NARVAES, do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela cooperação na realização da parte experimental e convivência gratificante durante o transcorrer do curso;
- à funcionária MARIA APARECIDA NALIN, do Depto. de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelos serviços datilográficos, atenção e disponibilidade com que sempre nos atendeu;

aos funcionários MARIZA DE JESUS C. SOARES e WALDOMIRO VIEIRA FILHO, do Depto. de Ciências Fisiológicas da Faculdade de O dontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela contribuição e auxílio no desenvolvimento da parte experimental;

ao ELISEO APARECIDO BERTTI, pela confecção dos gráficos e diagramas, e pela sincera amizade decorrente da convivência du rante o curso;

ao Sr. MOYSES JOSÉ MARIA DA SILVA, pelo auxílio no manuseio com os animais;

aos funcionários ADÁRIO CANGIANI e PEDRO SÉRGIO JUSTINO, pelos serviços fotográficos;

às amigas LUCIANE APARECIDA DUARTE SATTOLO e ELZA ANTONIA DRES SANO, funcionárias da Biblioteca da Faculdade de O dontologia de Piracicaba (UNICAMP), pelo prestativo atendimento, apoio e amizade;

à sra. SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI, pelas correções das referências bibliográficas;

aos colegas de curso e amigos, especialmente MARIA DE FÁTIMA SANT'ANNA, MIRIAM MELONI e FRANCISCO J. GUIMARÃES, pela ami zade, confiança e paciência dedicados à minha pessoa;

a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	6
RESULTADOS .....	11
DISCUSSÃO .....	26
CONCLUSÕES .....	35
RESUMO .....	37
SUMMARY .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## INTRODUÇÃO

A ingestão crônica de flúor\* tem sido utilizada, juntamente com outros meios de prevenção, para diminuir a incidência da cárie dentária. Entretanto, o aumento dos níveis de flúor ingerido provoca, na época de formação dos dentes, distúrbios na mineralização do esmalte, sendo esta condição conhecida como fluorose (DEN BESTEN, 1986). O mecanismo de atuação do flúor, prevenindo a cárie ou alterando a estrutura dental como no caso da fluorose, ainda não está totalmente esclarecido.

O esmalte dental apresenta, basicamente, durante a sua formação, dois estágios de desenvolvimento: fase de secreção, onde a matriz orgânica é sintetizada e secretada pelos ameloblastos (esmalte jovem), iniciando já nesta fase o delineamento dos cristais que compõem a estrutura interna do es-

\*Termo genérico para indicar as formas iônica, ionizante e não ionizante do elemento flúor.

malte, e fase de maturação, onde ocorre a mineralização do tecido, simultaneamente com perda de proteínas e água, resultando assim, no esmalte maduro. Apesar da natureza química destas alterações não ser bem conhecida (ROBINSON et alii, 1979), sabe-se que a ingestão de flúor interfere nesse processo.

Durante muitos anos a presença do flúor no esmalte esteve associada com sua estrutura mineralizada, ou seja, com a formação dos cristais de apatita. Assim sendo, o esmalte maduro completamente mineralizado (contendo 95% de apatita) deveria, contrariamente ao esmalte jovem, conter uma alta concentração de flúor (CRENSHAW, WENBERG e BAWDEN, 1978). Entretanto, vários estudos (HAMMARSTRON, 1971; SPEIRS, 1975, 1978; WEATHRELL et alii, 1975) demonstraram que a concentração de flúor é maior na matriz do esmalte jovem do que nos estágios mais avançados da mineralização e, em 1978, CRENSHAW, WENBERG e BAWDEN sugeriram que o flúor provavelmente estaria ligado, seletivamente, às proteínas do esmalte jovem.

EASTOE (1979) denominou de amelogeninas as proteínas do esmalte jovem, ricas em prolina, ácido glutâmico e histidina, e de enamelinas as proteínas do esmalte maduro, ricas em glicina, serina e ácido aspártico. As amelogeninas e enamelinas são encontradas em todos os estágios de desenvolvimento do esmalte. Com a maturação do esmalte, parte das amelogeninas são perdidas, sendo que as enamelinas permanecem (TERMINE et alii, 1980). Entretanto, verificou-se que sob a ação do flúor as amelogeninas ficam retidas na matriz do esmalte parcialmente mineralizado (DRINKARD, CRENSHAW e BAWDEN, 1983; DENBESTEN, 1986). Provavelmente, em virtude disso o esmalte fluorótico apresenta uma maior concentração do conteúdo orgânico (SHINODA, 1975) e uma menor concentração do conteúdo mineral

(SHINODA, 1975; DEN BESTEN & CRENSHAW, 1984).

Além dos trabalhos realizados mostrando a influência do flúor na matriz do esmalte, algumas alterações morfológicas têm sido descritas, quando da administração do flúor, nos ameloblastos secretores, células que sintetizam esta matriz (KRUGER, 1968, 1970; WALTON & EISENMANN, 1974; NEIMAN E EISENMANN, 1975; MORNSTAD & HAMMARSTROM, 1978; NORDLUND et alii, 1986; NORDLUND, EKSTRAND e HAMMARSTROM, 1986).

A maioria dos experimentos foram realizados utilizando-se altas dosagens de flúor e por curto período de tempo. KRUGER (1968) verificou que, após 3 injeções intraperitoneais de 7 mgF/kg peso, os ameloblastos secretores dos germes dentais de molares apresentavam distensão do retículo endoplasmático e dilatação das mitocôndrias. Posteriormente (KRUGER, 1970), observou que uma dose única de 0,1 mgF/kg peso não alterava a ultraestrutura dos ameloblastos e que, 30 minutos após uma dose de 3 mgF/kg peso, o retículo endoplasmático já apresentava dilatação da sua superfície rugosa. Concluiu, então, que as modificações ocorridas eram dependentes da dose e do tempo decorrido após a administração do flúor.

Num estudo subsequente, com incisivos de ratos, submetidos à injeção de alta dose de flúor e fixados por perfusão, WALTON & EISENMANN (1974) e NEIMAN & EISENMANN (1975) não confirmaram os resultados de KRUGER relativos à distensão das mitocôndrias e alterações no retículo endoplasmático. Entretanto, estes autores descreveram a presença de vacúolos claros e corpos escuros no citoplasma celular, além do acúmulo de grânulos secretores na região do processo de Tomes que parecia fragmentado (WALTON & EISENMANN, 1974). Concluíram, então, que o produto da síntese protéica e secreção celular es-

tava obviamente alterado, ocasionando o acúmulo de vacúolos e grânulos de secreção.

Trabalhos realizados, "in vitro", com germes dentais cultivados na presença do flúor, inclusive sob baixos níveis, também demonstraram alterações nos ameloblastos secretores, como: presença de vacúolos claros, acúmulo de grânulos fortemente corados, perda ou redução do processo de Tomes e desorganização colunar das células (LEVENSON, 1980; BRONCKERS, JANSEN e WOLTGENS, 1984; LYARUU et alii, 1986).

Tanto as alterações nos ameloblastos, como os distúrbios da mineralização do esmalte (interpretados como fluorose), quase sempre estiveram associados com a ingestão de elevados níveis de flúor. Entretanto, EKSTRAND et alii (1981) demonstraram, através de um estudo cinético feito em ratos, que, após 14 dias de ingestão contínua de água fluoretada (25, 50, 100 ou 150 ppm), a concentração de flúor no sangue atingiu um estado aparente de equilíbrio mantendo-se praticamente constante até o final de 69 dias, exceto nos animais que receberam 150 ppmF. A manutenção deste estado de equilíbrio aparente da concentração de flúor no sangue é função da ingestão contínua e parece ser mantido pela concentração de flúor lábil nos ossos (CURY, 1984).

Os trabalhos de ANGMAR-MANSSON & WHITFORD (1982, 1984, 1985) sugerem que distúrbios na mineralização do esmalte podem ocorrer, também na ausência de elevados níveis de flúor no sangue. Esses autores verificaram que picos diários e transitórios de 10  $\mu$ M de flúor, administrados através de injeções, durante sete dias, causaram alterações na mineralização da matriz, semelhantes àquelas provocadas por infusão contínua de uma dose bem menor de flúor (3,3  $\mu$ M).

Tendo em vista os aspectos relacionados acima, a proposição deste trabalho é verificar, através de estudos bioquímico e histológico, o efeito da aplicação de diferentes doses diárias de flúor (baixas e fluorótica), administradas cronicamente, na matriz jovem e madura do esmalte, assim como na morfologia dos ameloblastos secretores de incisivos de ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com 120 ratos machos, Wistar, adultos jovens, pesando em média 180 g. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos:

GRUPOS 1, 2 e 3: animais que receberam, por via intraperitoneal, durante 45 dias, injeções diárias de 0,06 mg, 0,12 mg e 4,0 mg de flúor/kg peso, respectivamente, na forma de solução de NaF (fluoreto de sódio).

GRUPO CONTROLE: animais que receberam, por via intraperitoneal, durante 45 dias, injeções diárias de NaCl (cloreto de sódio) contendo quantidade de Na equivalente à solução de NaF utilizada para o grupo 3, acima relacionado.

Durante o período experimental, os animais receberam ração e água à vontade e foram pesados, sistematicamente, duas

vezes por semana. A água que os animais beberam continha 0,8 ppm de flúor e a ração PURINA oferecida, 17,19 ppm de flúor iônico (valor médio das dosagens das amostras de ração utilizada).

Ao final dos 45 dias, os animais receberam uma última injeção de NaF (grupos 1, 2 e 3) ou NaCl (controle) e foram submetidos a um jejum de ração de 12 horas antes do sacrifício. Para estudo bioquímico do flúor utilizou-se o sangue, os ossos fêmures e os incisivos superiores e inferiores, e para o estudo histológico foram retiradas as hemimandíbulas de 2 animais de cada grupo.

Após a anestesia com éter etílico, o sangue de cada animal (dez de cada grupo), foi coletado com uma pipeta tipo Pasteur, heparinizada, após rompimento do plexo braquial. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm, durante 15 minutos, para obtenção do plasma no qual se realizou a dosagem de flúor, segundo a técnica de EKSTRAND (1977). Com o objetivo de determinar a farmacocinética do flúor no plasma (pico), o sangue de alguns animais de cada grupo foi coletado e processado conforme descrição acima, em diferentes intervalos de tempo (7,5, 15 e 30 minutos) após a injeção intraperitoneal de NaF.

Após a coleta do sangue, o osso fêmur foi retirado e tecidos moles aderidos, dissecados. A seguir, os ossos foram desidratados em estufa, a 80°C por 24 horas e, então, pulverizados em almofariz de porcelana. O pó obtido foi mantido na estufa durante 24 horas antes da análise de flúor, realizada segundo a técnica de McCANN (1968) modificada por CURY (1984), na qual se utilizou 20 mg de pó de osso, que foi desmineralizado por solução 1 M de HClO<sub>4</sub> (ácido perclórico) por 1 hora, e neutralizado por solução de citrato de sódio 0,5 M.

A determinação potenciométrica dos teores de flúor nas soluções contendo plasma ou osso pulverizado foram reali-

zadas utilizando-se um potenciômetro digital ORION 701 A e um eletrodo específico para íon flúor modelo 94-09 da ORION.

As concentrações de flúor nas amostras foram determinadas a partir de uma curva de calibração previamente elaborada, usando-se a fórmula abaixo:

$$x = \text{anti log } \frac{a - y}{n}$$

$$a = y - b \log x$$

y = leitura potenciométrica

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

x = concentração de flúor no plasma  
(ngF/ml) ou no osso (µgF/ml)

Em seguida, a maxila e a mandíbula foram removidas, sendo os incisivos superiores e inferiores dissecados e mantidos em banho de gelo. A superfície do esmalte foi cuidadosamente limpa com o auxílio de uma gase para remoção de células a ele aderidas. O esmalte jovem e o esmalte maduro foram removidos, separadamente, usando-se uma espátula, obtendo-se um "pool" de esmalte de cada tipo. Este material foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Uma pequena amostra de esmalte jovem e maduro ( $\pm 5$  mg) foi colocada no dessecador durante 18 horas para posterior dosagem de cálcio, fósforo e flúor. Em seguida, 2,0 mg de cada tipo de esmalte foram pesados e desmineralizados em  $\text{HClO}_4$  0,5 M durante 3 horas e neutralizados com TISAB (Total Ionic Strenght Adjustor Buffer, Orion 94-09 A) contendo 20 g NaOH/l. As determinações foram realizadas pelos processos colorimétrico para o fósforo (método de FISKE, 1925), potenciométrico para o flúor (McCANN, 1968) e absorção atômica para o cálcio.

O restante das amostras de esmalte jovem e maduro foram utilizadas para extração de proteínas, seguindo-se basicamente

mente a técnica de FUKAE & SHIMIZU (1974). Este material foi desmineralizado por diálise (membrana de peso molecular 12000), contra ácido acético 0,5 M e EDTA 1mM, por 4 dias, sendo, em seguida, liofilizado.

O preparo das proteínas, para eletroforese, tanto do esmalte jovem como do esmalte maduro, de cada grupo, foi realizado dissolvendo-se 2 mg de proteínas em 0,25 ml de uma solução contendo 0,25 ml de TRIS (hidroximetilaminometano) 0,75 M pH 8,8, 0,25 ml glicerol, 20 mg SDS (sulfato de duodecil sódico), 5 µl de azul de bromofenol 0,1%, 25 µl de mercaptoetanol e Ureia 6 M. Na eletroforese das duas amostras de proteínas, utilizou-se géis de poliacrilamida com SDS de acordo com a técnica de LAEMMLI (1970).

O peso molecular das proteínas existentes na matriz do esmalte jovem e maduro, foi estimado a partir da comparação com uma eletroforese padrão, contendo proteínas de peso molecular conhecido (albumina de soro bovino, pm = 67000; albumina de ovo, pm = 45000; quimotripsinogenio A, pm = 25000 ; mioglobina Vom Wal, pm = 17000 e citocromo C, pm = 12300) e desenvolvida simultaneamente com as amostras problemas, nas mesmas condições experimentais.

Após realizada a eletroforese, os géis foram mantidos em TCA 50% (ácido tricloracético) durante 30 minutos, sendo, em seguida, corados com solução de Coomassie blue 0,1% dissolvido em solução descorante contendo 250 ml de metanol, 70 ml de ácido acético e 680 ml de água destilada. Os géis foram mantidos no corante por 20 horas e descorados com a solução indicada acima.

Dois animais de cada grupo foram separados para estudo histológico da região de ameloblastos secretores dos incisivos, sendo fixados por perfusão intracardíaca com glutaral-

deído a 2,5% tamponado a pH 7,4 (WARSHAWSKY & MOORE, 1967). As hemimandíbulas foram removidas, pós-fixadas por 2 horas na solução utilizada para perfusão, desmineralizadas em EDTA a 4,13% pH 7,4 (WARSHAWSKY & MOORE, 1967), durante 30 dias, sendo, em seguida, cortadas transversalmente ao nível da face distal do 2º molar, utilizando-se para estudo, sua porção mais posterior que aloja a zona embrionária e a região da secreção do esmalte do incisivo.

Após processamento histológico adequado, as peças foram incluídas em resina no sentido longitudinal e direção vestibulo-lingual do dente, segundo técnica de LUFT (1961). A proporção entre os componentes no preparo da resina tipo Poly Bed 812, seguiu-se a recomendação indicada pelo Centro para Microscopia Eletrônica da Universidade de Illinois Urbana Campaign. Cortes semi-finos de 1 µm de espessura da região em estudo, foram obtidos (ultramicrotomo Porter-Blum MT<sub>2</sub>) e corados com azul de toluidina durante 20 minutos, montados e observados ao microscópio óptico Zeiss.

#### TESTE ESTATÍSTICO

A análise estatística das diferenças entre as médias das dosagens de flúor no plasma e no osso, do grupo controle e grupos experimentais, foi realizada utilizando-se o teste de Tukey, sendo os valores de F estatisticamente significativos ao nível de 5% de probabilidade (VIEIRA, 1981).

## RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento são apresentados sob dois aspectos distintos:

- Análise Bioquímica
- Estudo Histológico

### ANÁLISE BIOQUÍMICA

Os tópicos destacados a seguir referem-se às análises de flúor realizadas no plasma, ossos, esmalte dos incisivos e eletroforese das proteínas da matriz do esmalte dental.

#### 1. CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NO PLASMA

Os animais dos grupos 1 e 2 apresentaram, respectivamente, 42,76 ngF/ml e 50,75 ngF/ml no plasma, após 45 dias consecutivos de administração de fluoreto de sódio. Não se ve

rificou diferença significativa entre a concentração de flúor no plasma dos animais do grupo controle (43,26 ngF/ml) e daqueles que receberam 0,06 mg e 0,12 mgF/kg peso (grupos 1 e 2, respectivamente), como pode ser visto na tabela 1. Entretanto, os animais do grupo 3, que receberam 4,0 mgF/kg peso, apresentaram um nível plasmático de flúor significativamente elevado (159,63 ngF/ml) em relação aos demais grupos (Tab. 1). A figura 1 mostra que o pico (média dos dados obtidos) de flúor no plasma ocorreu aos 15 minutos para os grupos G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e aos 7,5 minutos para o grupo G<sub>3</sub>. Os valores registrados foram G<sub>1</sub> = 130,97 ngF/ml (6,89 µM), G<sub>2</sub> = 206,85 ngF/ml (10,8 µM) e G<sub>3</sub> = 7375 ngF/ml (388,15 µM).

TABELA 1 - Concentração média de flúor no plasma de ratos que receberam injeções intraperitoneais de fluoreto de sódio durante 45 dias consecutivos.

Grupos Experimentais	Dosagem administrada (mgF/Kg peso)	Concentração média de flúor no plasma* (ngF/ml)
Controle	0	43,26 <sup>a</sup>
G <sub>1</sub>	0,06	42,76 <sup>a</sup>
G <sub>2</sub>	0,12	50,75 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	4,0	159,63 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

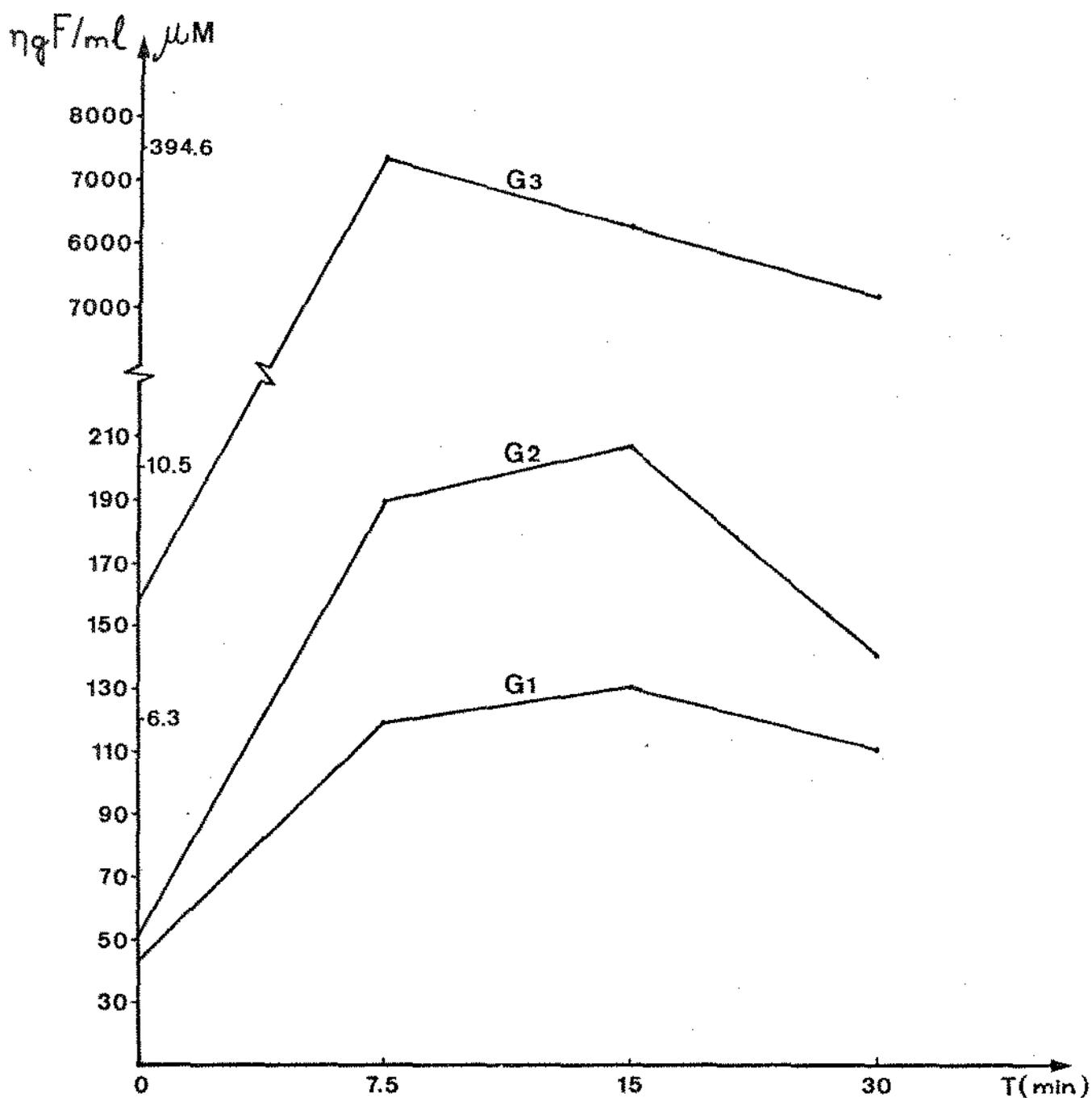


FIGURA 1 - Concentração média de flúor no plasma em diferentes intervalos de tempo, após a administração de flúor a animais dos grupos 1, 2 e 3 ( $G_1 = 0,06$ ,  $G_2 = 0,12$  e  $G_3 = 4,0$  mgF/kg peso), ao final do experimento. Os valores de flúor no plasma no tempo zero ( $t = 0$ ) correspondem à determinação feita 12 horas após a última injeção de NaF.

## 2. CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NO FÊMUR

Os grupos controle, 1 e 2 apresentaram, respectivamente, 374,52, 484,92 e 512,56 ppm de flúor nos fêmures dos ratos que receberam diferentes dosagens de fluoreto de sódio durante 45 dias, e as diferenças nas concentrações médias de flúor entre estes grupos não foram comprovadas estatisticamente pelo teste de Tukey (Tab. 2). Os animais do grupo 3, que receberam 4,0 mgF/kg peso, apresentaram em seus fêmures, uma maior concentração de flúor (1900 ppm), cuja média foi estatisticamente significativa quando comparada com as médias dos demais grupos experimentais. Estes resultados são indicados na tab. 2.

TABELA 2 - Concentração média de flúor no fêmur de ratos que receberam injeções intraperitoneais de fluoreto de sódio durante 45 dias consecutivos.

Grupos Experimentais	Dosagem administrada (mgF/kg peso)	Concentração média de flúor no fêmur* (ppm)
Controle	0	374,52 <sup>a</sup>
G <sub>1</sub>	0,06	484,92 <sup>a</sup>
G <sub>2</sub>	0,12	512,56 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	4,0	1900,00 <sup>b</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3. CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR, CÁLCIO E FÓSFORO NO ESMALTE DENTAL

As determinações de flúor no esmalte jovem e no esmalte maduro mostraram que os teores de flúor (ppm) nos diferentes grupos foram sempre maiores no esmalte jovem do que no esmalte maduro (Tab. 3 e Fig. 2).

As concentrações de cálcio e fósforo no esmalte dental dos animais estudados, obtidas em porcentagem (%) foram analisadas em termos da concentração molar entre cálcio e fósforo (Ca:P). Os resultados mostraram que a relação molar Ca:P manteve-se praticamente constante para todos os grupos experimentais, ou seja, permaneceu em torno de 1,0, independente das dosagens de fluoreto administradas para os animais dos diferentes grupos experimentais (Tab. 3 e Fig. 2).

TABELA 3 - Concentração de flúor (ppm) e relação Ca:P (concentração molar) no esmalte jovem e esmalte maduro de incisivos de ratos, que receberam injeções intraperitoneais de diferentes dosagens de fluoreto de sódio, durante 45 dias consecutivos.

Grupos Experimentais	Dosagem Administrada (mgF/kg peso)	ESMALTE JOVEM		ESMALTE MADURO	
		Flúor (ppm)	Ca:P (Molar)	Flúor (ppm)	Ca:P (Molar)
Controle	0	27,58	1,03	17,22	1,01
G <sub>1</sub>	0,06	24,81	0,97	12,29	0,95
G <sub>2</sub>	0,12	35,07	0,97	27,44	1,07
G <sub>3</sub>	4,0	146,76	0,83	109,92	0,92

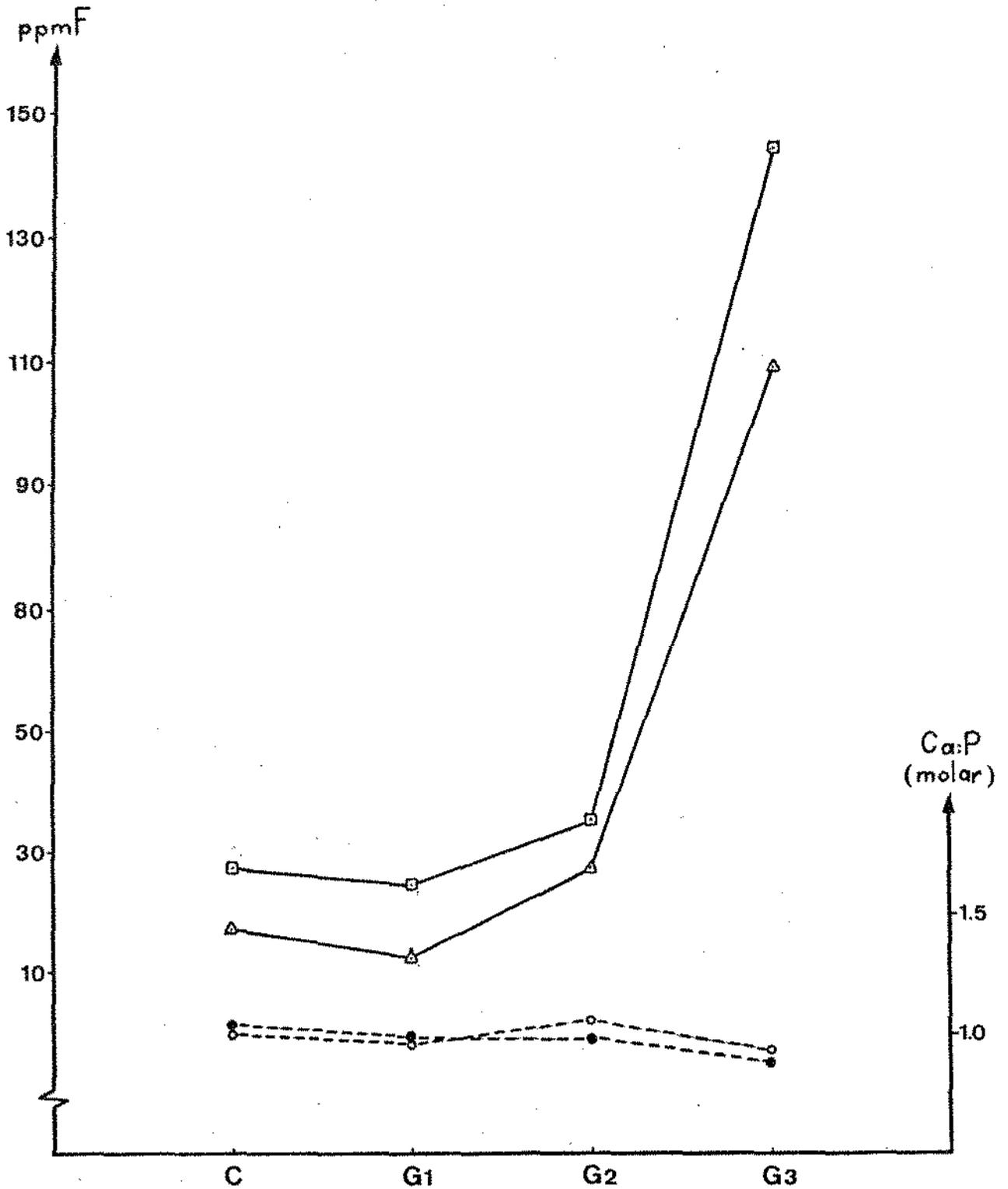


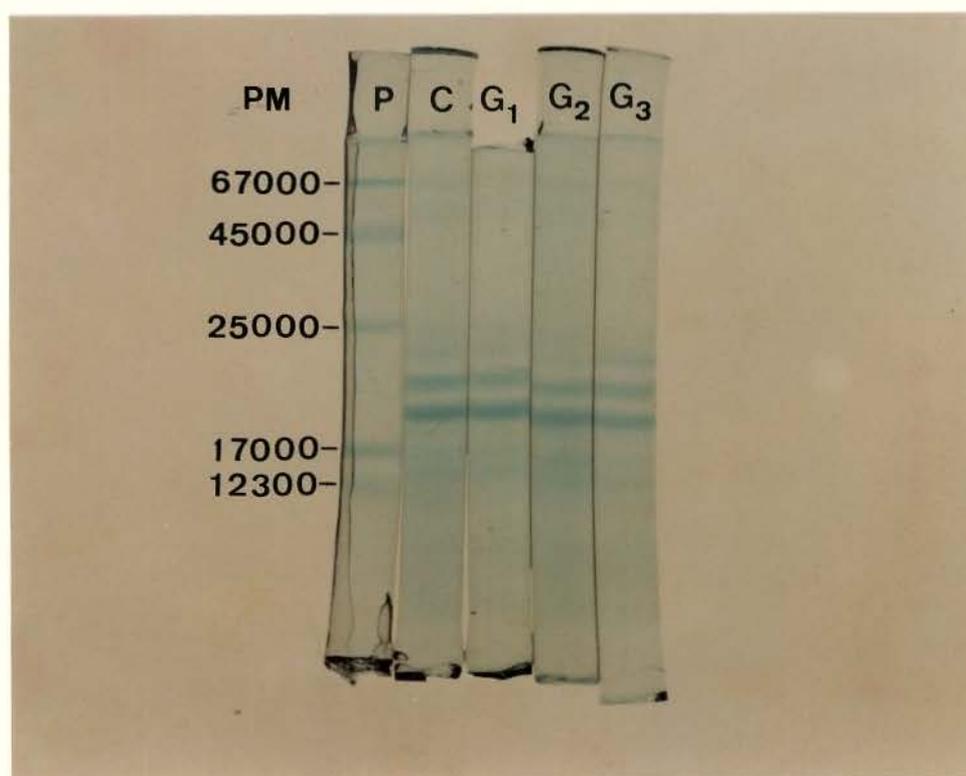
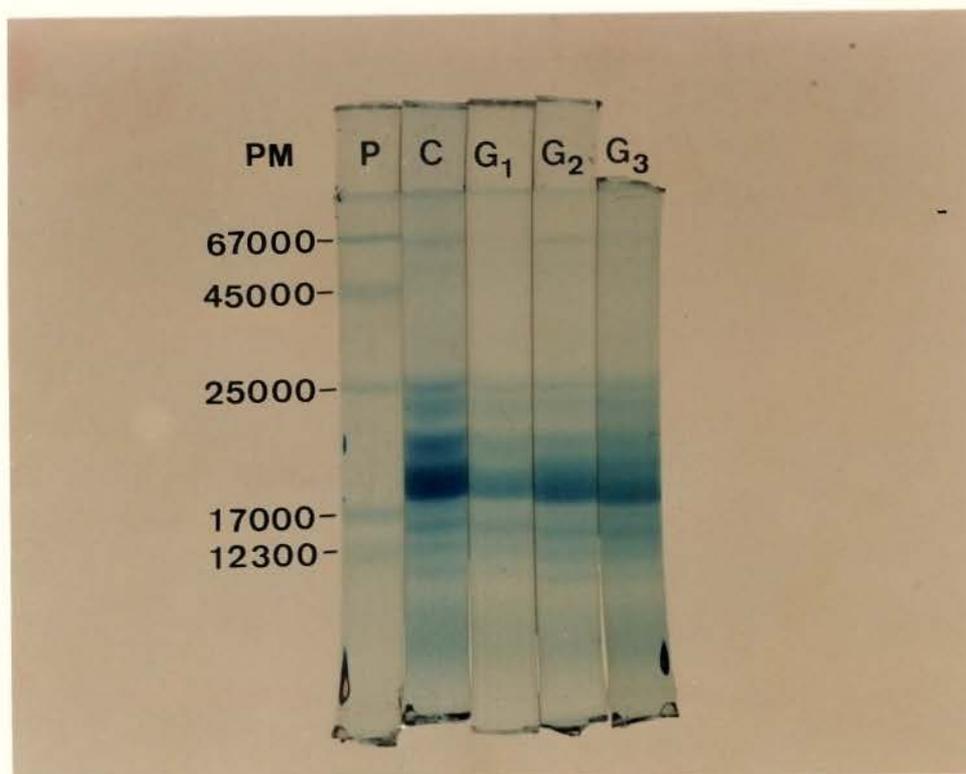
FIGURA 2 - Concentração de flúor (ppm) e relação Ca:P (concentração molar), respectivamente, no esmalte jovem (□-□ e ●-●) e esmalte maduro (Δ-Δ e o-o) de incisivos de ratos injetados com diferentes dosagens de fluoreto de sódio, durante 45 dias consecutivos.

#### 4. ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE DENTAL

As proteínas extraídas dos esmaltes jovem e maduro submetidas, separadamente, a eletroforese utilizando-se géis de poliacrilamida com SDS apresentaram um comportamento eletroforético típico, ou seja, uma maior quantidade de bandas protéicas no esmalte jovem do que no esmalte maduro, conforme pode ser visto nas figuras 3 e 4.

Na figura 3, referente ao esmalte jovem dos diferentes grupos experimentais, podem-se ver bandas protéicas com baixos pesos moleculares (menores que 12300 daltons) e outras com altos pesos moleculares (próximos a 67000 daltons), sendo que as principais bandas se concentraram entre 17000 e 25000 daltons. A matriz protéica do esmalte jovem, secretado durante o período experimental, apresentou basicamente as mesmas bandas protéicas no grupo controle (gel C) e grupos experimentais, cujos animais receberam diferentes concentrações de flúor por via intraperitoneal (géis G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub>).

Com a maturação do esmalte (Fig. 4) ocorreu uma diminuição visível no espectro das bandas protéicas dos vários grupos (C, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub>) entre 17000 e 25000 daltons, e uma forte tendência ao desaparecimento das bandas com peso molecular abaixo de 27000 daltons. No esmalte maduro dos animais que receberam 4,0 mgF/kg peso (gel G<sub>3</sub>) houve persistência de uma banda protéica com peso molecular próximo a 25000 daltons.



FIGURAS 3 e 4 - Perfil eletroforético de géis de poliacrilamida com SDS de proteínas do esmalte jovem (Fig. 3) e esmalte maduro (Fig. 4) de animais que receberam diferentes concentrações de flúor, intraperitonealmente, durante 45 dias. PM = peso molecular; P = padrão com proteínas de pesos moleculares conhecidos; Grupo C (controle) e G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub> que receberam 0,06; 0,12 e 4,0 mgF/kg<sup>1</sup> peso, respectivamente.

## ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cortes histológicos semi-finos, obtidos do 1/3 apical do incisivo inferior, foram observados ao microscópio óptico. Tendo sido a referida fração do dente, incluída no sentido longitudinal, e o corte obtido na direção vestibulo-lingual, em um único corte pode-se visualizar a porção do órgão do esmalte correspondente aos ameloblastos na fase de secreção do esmalte interno, seu estrato intermédio, bem como estruturas da polpa dental em cuja superfície estão os odontoblastos e sua matriz (pré-dentina e dentina).

A apresentação dos resultados para os diferentes grupos experimentais será feita através da descrição das ilustrações que se seguem, tomando-se como base a classificação morfológica para incisivos de ratos (WARSHAWSKY & SMITH, 1974) e apresentadas na figura 6. Esta figura consta de 2 pranchas: 6A e 6B, com quatro fotografias cada uma, numeradas de 1 a 4 e de 5 a 8 respectivamente. Na prancha A estão as figuras que se referem aos grupos controle (6A<sub>1</sub> e 6A<sub>2</sub>) e I (6A<sub>3</sub> e 6A<sub>4</sub>). Na prancha B encontram-se as figuras referentes aos grupos II (6B<sub>5</sub> e 6B<sub>6</sub>) e III (6B<sub>7</sub> e 6B<sub>8</sub>). Nessas pranchas todas as figuras de números ímpares mostram uma visão panorâmica da região de ameloblastos secretores, e as de números pares ilustram, em maior aumento, uma área da figura correspondente colocada à sua esquerda.

GRUPO CONTROLE - fig. 6A<sub>1</sub> - Observa-se em toda a extensão de um lado a outro da figura, parte do órgão do esmalte composto de uma fileira de ameloblastos secretores (A), sua matriz (E) e o estrato intermédio. Verifica-se na polpa, numerosos vasos dilatados, alguns dos quais interpondo-se entre os ameloblastos, aspecto que não coincide com a histologia nor

mal do tecido. A seguir as faixas de pré-dentina e de dentina (D). No lado direito dessa figura aparece a porção do dente mais próxima da região apical, evidenciada pela faixa mais estreita da matriz do esmalte quando comparada com a do extremo esquerdo. A fig. 6A<sub>2</sub> mostra, em maior aumento, ameloblastos secretores (A) que se caracterizam por se apresentarem como células altas, com projeções citoplasmáticas alongadas (processos de Tomes), inclinadas em direção à porção apical, com núcleos alongados dispostos em dois níveis alternados. Na porção basal da célula podem ser vistas as mitocôndrias (m), agrupadas na forma de grumos, que se coram mais fortemente. O estrato intermédio (EI) é constituído por apenas uma camada contínua de células cubóides.

GRUPO 1 - Na fig. 6A<sub>3</sub>, vista panorâmica da região secretora de esmalte, pode-se observar em toda a extensão da figura, entre a porção apical dos ameloblastos e sua matriz, uma linha clara (seta), evidenciada em maior aumento (fig. 6A<sub>4</sub>) por um espaçamento com aspecto rendilhado. Esse aspecto difere dos prolongamentos ameloblásticos (processos de Tomes) que, em condições normais, na região do esmalte interno, apresentam-se interdigitados, como pode ser visto no grupo controle (fig. 6A<sub>2</sub>).

Os ameloblastos (fig. 6A<sub>4</sub>) apresentam-se altos, com núcleos na porção basal, porém o citoplasma parece conter grande número de pequenos vacúolos em toda a porção média e apical da célula.

GRUPO 2 - Na fig. 6B<sub>5</sub> pode-se observar a região de ameloblastos secretores e demais estruturas dentais que se apresentam com aspecto morfológico alterado em relação à morfo

logia normal característica dessa região. Os ameloblastos (fig. 6B<sub>6</sub>) mostram-se bastante estreitos e inclinados em relação à superfície do esmalte (E), e seu citoplasma cora intensamente pelo azul de toluidina mascarando os núcleos. Os processos de Tomes parecem mais curtos e não interdigitados. As células do estrato intermédio (EI) aparecem achatadas ao invés de cúbicas. A polpa (P) adquiriu aspecto totalmente vacuolizado lembrando um tecido adiposo, com grandes lacunas localizadas na polpa e na sua superfície entre os odontoblastos (O).

GRUPO 3 - A fig. 6B<sub>7</sub> mostra, em toda a extensão da região secretora, algumas alterações melhor observadas na figura 6B<sub>8</sub>. Por exemplo, os processos de Tomes apresentam um aspecto fragmentado, separados entre si por vacúolos, adquirindo o espaço entre os ameloblastos e a matriz um aspecto rendilhado. Quase toda a espessura da matriz do esmalte, ao invés de homogênea, apresenta-se com aspecto semelhante aos processos de Tomes interdigitados, como se pode observar na superfície da matriz próxima à porção apical dos ameloblastos no animal controle (fig. 6A<sub>2</sub>).

Os ameloblastos (A) apresentam-se altos, com muitas vacuolizações no citoplasma infra e supra-nuclear.

PRANCHA 6A

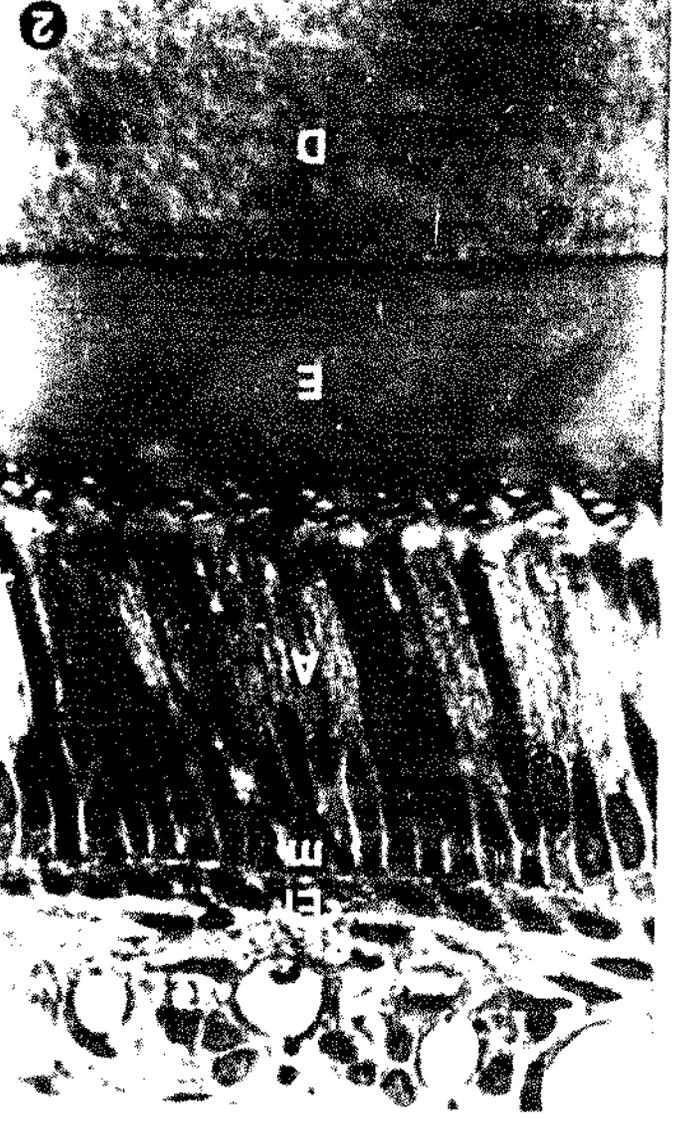
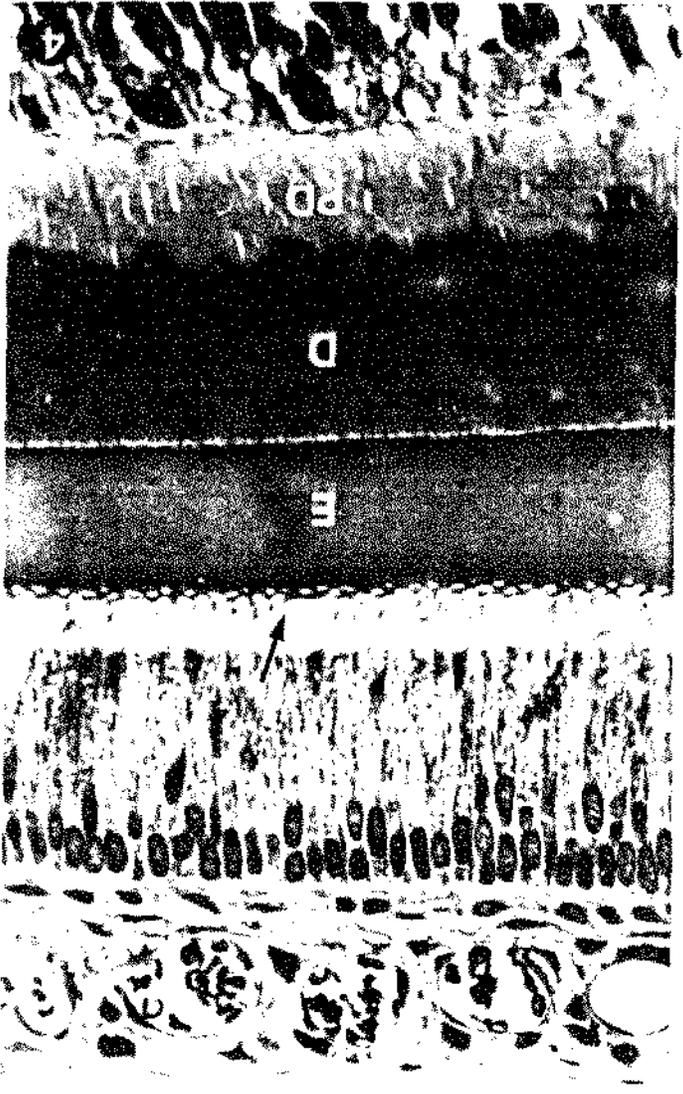
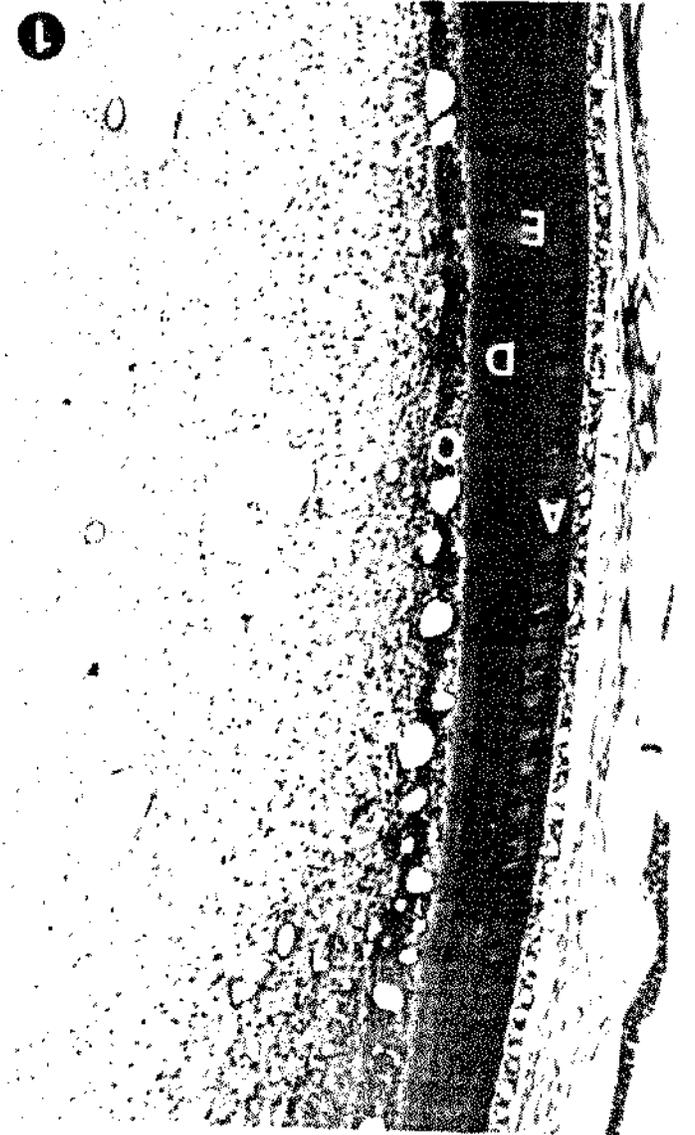
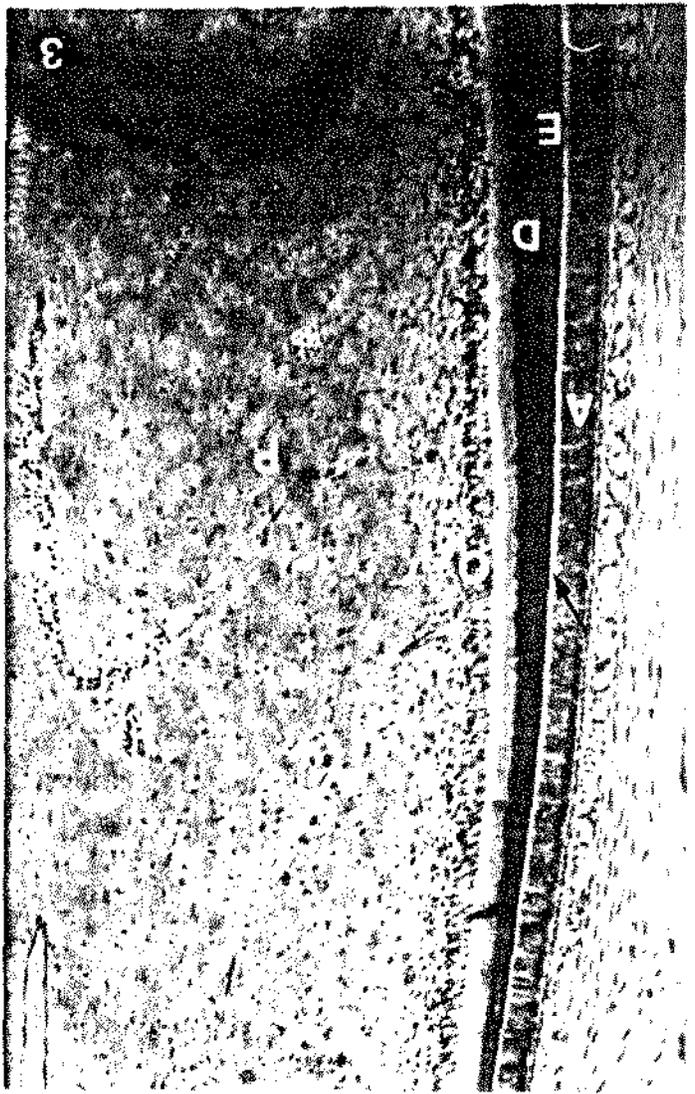
Cortes longitudinais, semi-finos, da região secretora de incisivos inferiores de ratos. Azul de toluidina. A = ameloblastos, m = mitocôndrias, E = matriz do esmalte, EI = estrato intermédio, D = dentina, PD = pré-dentina, O = odontoblastos, P = polpa dental.

FIGURAS 1 E 2 : GRUPO CONTROLE - animais que receberam injeções de cloreto de sódio, intraperitonealmente, durante 45 dias consecutivos. 97X e 970X, respectivamente.

Pode-se observar uma morfologia normal para a região secretora da matriz do esmalte, com exceção dos vasos da polpa que se apresentam dilatados (Fig. 1). A figura 2 mostra, em maior aumento, os ameloblastos com os processos de Tomes interdigitados na superfície da matriz do esmalte.

FIGURAS 3 E 4 : GRUPO I - animais que receberam injeções de fluoreto de sódio (0,06 mgF/kg peso), intraperitonealmente, durante 45 dias consecutivos. 124X e 388X, respectivamente.

Observar, entre os ameloblastos e sua matriz, uma linha clara indicada pela seta (Fig. 3). Em maior aumento (Fig. 4), essa linha corresponde a um espaço com aspecto rendilhado (seta). O citoplasma celular encontra-se com grande número de pequenos vacúolos.



PRANCHA 6B

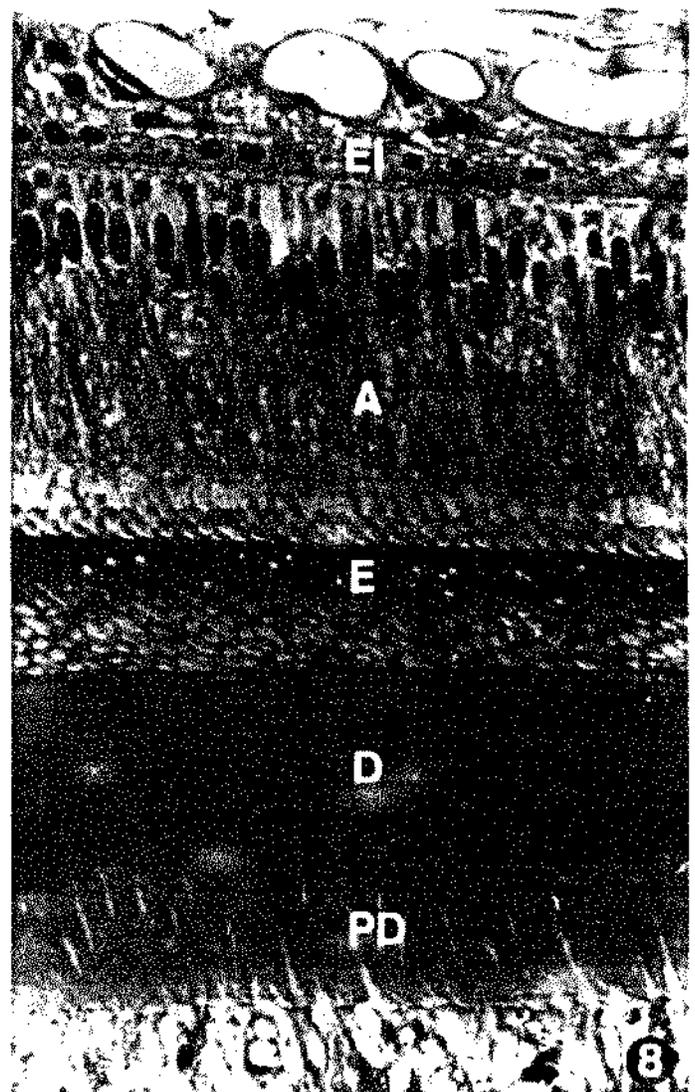
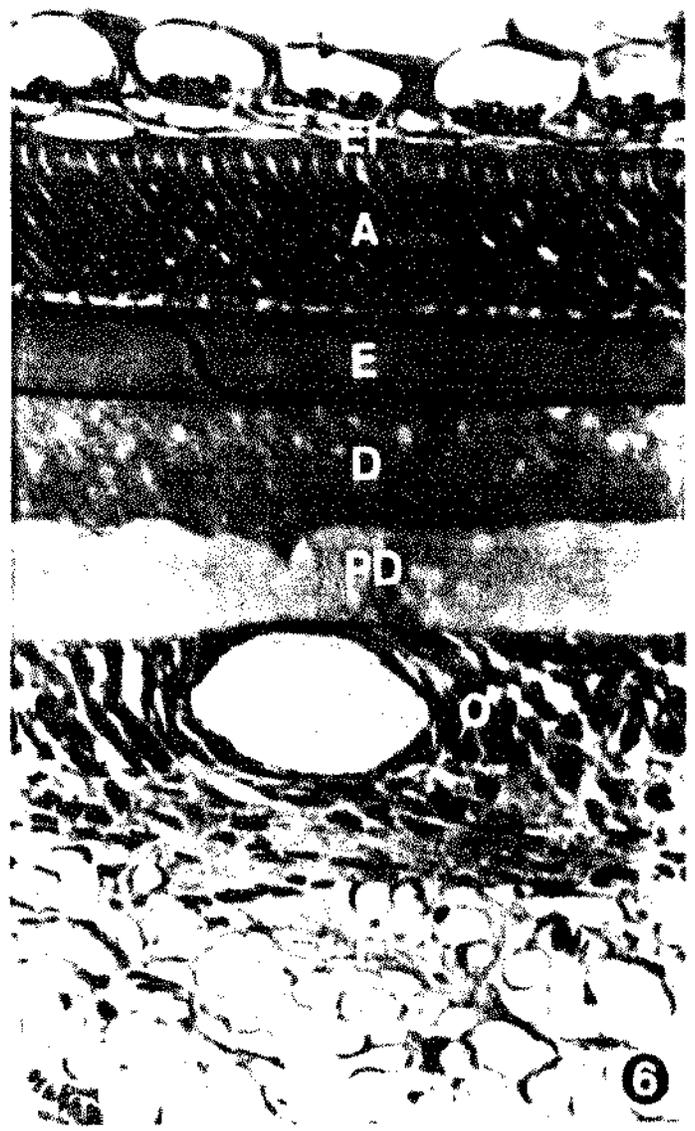
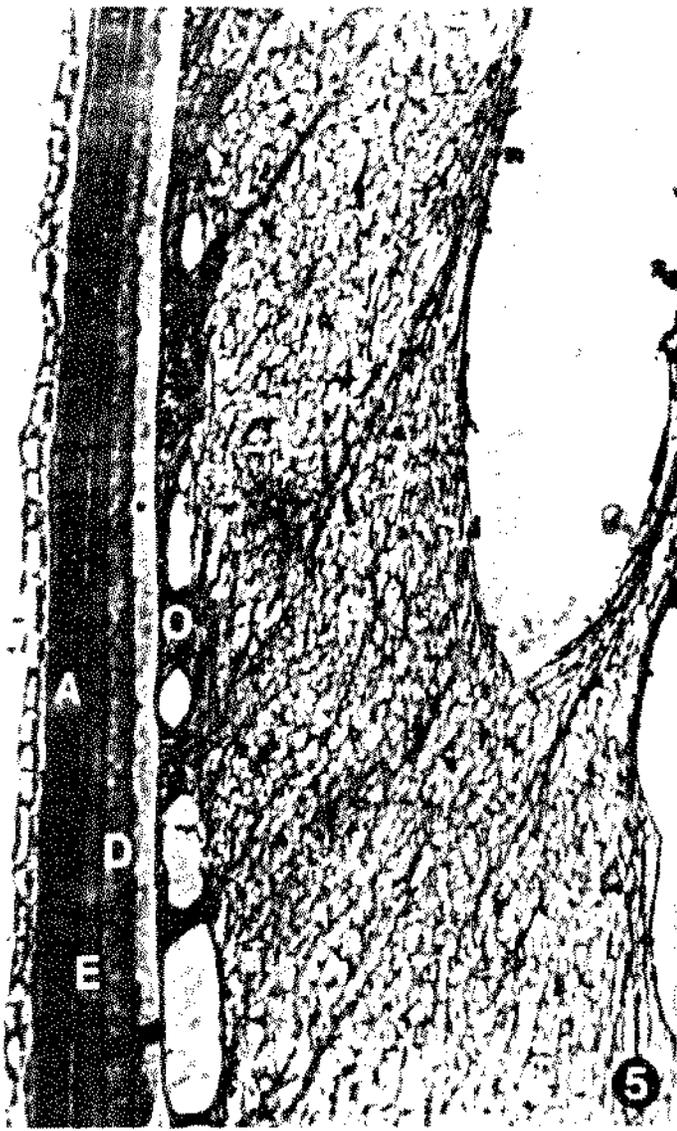
Cortes longitudinais, semi-finos, da região secretora de incisivos inferiores de ratos. Azul de toluidina. A = ameloblastos, E = matriz do esmalte, EI = estrato intermédio, D = dentina, PD = pré-dentina, O = odontoblastos, P = polpa dental.

FIGURAS 5 E 6 : GRUPO 2 - animais que receberam injeções de fluoreto de sódio (0,12 mgF/kg peso), intraperitonealmente, durante 45 dias consecutivos. 155X e 620X, respectivamente.

Na figura 5 observa-se que o tecido está completamente alterado, sendo que a polpa (P) adquiriu aspecto de tecido adiposo com grandes cavidades em toda a área pulpar. Em maior aumento (Fig. 6), os ameloblastos (A) apresentam-se mais estreitos, intensamente corados e bastante inclinados em relação à superfície do esmalte (E). Entre os odontoblastos (O) o espaço visualizado lembra um vaso muito dilatado ou uma cavidade cística.

FIGURAS 7 E 8 : GRUPO 3 - animais que receberam injeções de fluoreto de sódio (4,0 mgF/kg peso), intraperitonealmente, durante 45 dias consecutivos. 155X e 388X, respectivamente.

Uma linha clara entre os ameloblastos (A) e sua matriz (E) pode ser vista em toda a extensão da figura 7. Em maior aumento (Fig. 8) esta linha aparece como um grande espaço com aspecto rendilhado. Os ameloblastos (A) apresentam grande número de vacúolos, inclusive na sua porção basal. A matriz do esmalte (E) perdeu o aspecto homogêneo característico dessa região.



## DISCUSSÃO

O efeito crônico do flúor, tanto na matriz do esmalte como nas células que a secretam, tem sido estudado principalmente em dentes de roedores.

Sabe-se que as alterações induzidas pelo flúor são correlacionadas com o seu teor no sangue (O. FEJERSKOV et alii, 1979). Estudos do metabolismo do flúor (SINGER & ARMSTRONG, 1964; ARMSTRONG, 1961) chegaram a sugerir que, apesar da variação do teor de flúor ingerido, o organismo possuía uma notável capacidade para manter constante a concentração de flúor no fluido corporal, sendo o mecanismo de homeostasia realizado pelos ossos e pelo rim, que opera como efetivo órgão excretor de flúor. Tendo em vista que a concentração de flúor no sangue é linearmente relacionada à dose ingerida (O. FEJERSKOV, 1979; TAVES & GUY, 1979), e, que a concentração deste no sangue diminui quando a administração é suspensa (EKS

TRAND et alii, 1981; CURY, 1984) torna-se difícil explicar o mecanismo de homeostasia descrito acima.

Segundo EKSTRAND et alii (1981) o que ocorre é a obtenção de um estado aparente de equilíbrio de flúor no sangue, a partir do qual a concentração de flúor passa a ser linearmente relacionada à dose ingerida. De acordo com estes autores, após 14 dias de ingestão contínua de água fluoretada (25, 50, 100 ou 150 ppm) a concentração de flúor no plasma dos ratos atingiu um estado aparente de equilíbrio com exceção dos animais que receberam 150 ppmF. A manutenção deste estado de equilíbrio aparente da concentração de flúor no sangue é função da ingestão contínua e parece ser mantido pela concentração de flúor nos ossos (CURY, 1984).

Em nosso estudo, os níveis de flúor no sangue dos diferentes grupos experimentais (Tab. 1), obtidos após 45 dias e com os animais em jejum, provavelmente refletem a concentração que estava em equilíbrio com o flúor dos ossos.

Segundo CURY (1984) o nível plasmático de fluoreto não depende exclusivamente da concentração total de flúor no osso, mas sim daquela quantidade que se mantém em equilíbrio com o sangue (F lábil) e é perdida quando a administração de flúor é suspensa.

Os animais do grupo 3 que receberam diariamente uma dose de 4,0 mgF/kg peso, apresentaram, no final de 45 dias, sinais de intoxicação como perda de peso e manchas nos incisivos, caracterizadas por estriações transversais de bandas brancas e marrons alternadas e que são compatíveis com o diagnóstico de fluorose (LINDEMANN, 1967; DEN BESTEN & CRENSHAW, 1984). Nestes animais a concentração média de flúor no sangue foi 159,63 ngF/ml, valor este que é maior do que o encontrado

(142,0 ngF/ml) por EKSTRAND et alii (1981) em ratos que ingeriram 150 ppm de flúor e que 14 dias após, ainda não haviam atingido o estado aparente de equilíbrio de flúor no sangue. Também nos ossos, a concentração total de flúor acumulado durante o período experimental foi elevada nos animais do grupo 3 (Tab. 2) quando comparada com os demais grupos experimentais.

Em nosso estudo a concentração de flúor determinada na ração foi de 17 ppmF iônico. Sabendo-se que um animal adulto jovem ( $\pm$  200 g peso corporal) ingere em média 20 g de ração por dia, a concentração recebida pelos animais dos diferentes grupos experimentais, através desta dieta foi de 0,34 mgF/dia. As injeções diárias de flúor administradas nos animais do grupo 1 (0,06 mgF/kg peso corporal) e grupo 2 (0,12 mgF/ peso corporal) acrescentaram uma quantidade de 0,012 mgF/dia e 0,024 mgF/dia, respectivamente. Estes valores são inferiores à concentração de flúor que os animais receberam pela ração e devido a isto não foi possível verificar, estatisticamente, diferença na concentração de flúor no sangue (Tab.1) e ossos (Tab.2) entre os grupos controle, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Além dos ossos, o esmalte dental que também é um tecido mineralizado, está sujeito à interferência do flúor na época de sua formação.

Em nosso trabalho, as concentrações de flúor (ppm) nos diferentes grupos experimentais foram sempre maiores no esmalte jovem do que no esmalte maduro (Tab. 3). Esses resultados confirmam os achados de HAMMARSTROM (1971), WEATHRELL et alii (1975), SPEIRS (1975, 1978), ROBINSON et alii (1979) os quais verificaram que a concentração de flúor é sempre maior no esmalte jovem do que no esmalte maduro altamente mi-

neralizado. Em 1971, HAMMARSTROM sugeriu que o flúor poderia estar ligado à matriz orgânica, ou mais especificamente às proteínas da matriz orgânica (CRENSHAW, WENNBORG e BAWDEN, 1978) sendo por isso encontrado em maior concentração no esmalte jovem. Segundo ROBINSON, KIRKHAM e HALLSWORTH (1988) a ligação de íons como o flúor no esmalte em desenvolvimento parece depender da porosidade e do estado de hidratação do tecido. Devido a isto o esmalte jovem que é um tecido mais hidratado que o esmalte maduro contém, então, maior concentração de flúor principalmente na forma de íons livres em solução. Posteriormente o flúor presente no esmalte jovem, ligado à matriz orgânica ou na forma iônica, seria perdido, durante a fase de maturação do esmalte, que é caracterizada pela deposição mineral com perda de proteínas e água (ROBINSON et alii, 1979).

Com relação aos íons minerais, eles estão presentes na matriz até mesmo nos estágios iniciais do seu desenvolvimento (ROBINSON, 1979). Uma menor concentração do conteúdo mineral foi identificado por SHINODA (1975) como uma marcante hipocalcificação do esmalte maduro dos animais que ingeriram água fluoretada (113 ppm) durante 70 dias. Também DEN BESTEN e CRENSHAW (1984) documentaram a interferência do flúor com a deposição mineral no esmalte. Estes autores observaram uma redução na concentração de fósforo na região de pigmentação do esmalte fluorótico dos animais que receberam 75, 100 ou 150 ppm de flúor na água por 5 semanas. Embora a concentração de fósforo estivesse reduzida na região de pigmentação do esmalte fluorótico, esta redução não foi detectada na região precedente ou seja, na zona de maturação do esmalte.

Em nosso estudo, a concentração de cálcio e fósforo, expressa em termos da relação molar Ca:P, manteve-se pratica-

mente constante no esmalte jovem e maduro dos diferentes grupos experimentais (Tab. 3), inclusive no esmalte fluorótico dos animais do grupo 3. Esses resultados coincidem, parcialmente com os de HILLER e col. (1975) que verificaram que não existe variação consistente na relação molar Ca:P ao longo do desenvolvimento do incisivo de ratos. As diferenças básicas entre os nossos resultados (Ca:P = 1,0) e os de HILLER (Ca:P= 1,6) provavelmente ocorreram porque nossas amostras não foram incineradas para a realização da análise.

As proteínas da matriz orgânica do esmalte jovem e maduro foram identificadas através de géis de poliacrilamida com SDS. O esmalte jovem apresentou uma maior concentração de amelogeninas, proteínas de peso molecular menor que 30000 daltons (TERMINE et alii, 1980) do que o esmalte maduro. Segundo TERMINE et alii (1980) as enamelinas, proteínas de peso molecular acima de 30000 daltons, estão presentes no esmalte em menor concentração que as amelogeninas e muito raramente foram detectadas em nossos géis.

A injeção complementar de flúor, durante 45 dias consecutivos, não interferiu com a qualidade do perfil eletroforético da matriz protéica depositada na fase de secreção do esmalte (Fig. 3). Esses resultados confirmam os achados de DRINKARD, CRENSHAW e BAWDEN (1983) e DEN BESTEN (1986) que não observaram diferenças nas proteínas do esmalte jovem (fase de secreção), analisadas por géis de poliacrilamida com SDS, dos animais controles e animais tratados com flúor. Entretanto em ambos os trabalhos citados o flúor ocasionou retenção de amelogeninas no esmalte parcialmente mineralizado dos molares (DRINKARD, CRENSHAW e BAWDEN, 1983) ou incisivos (DEN BESTEN, 1986) de ratos.

Em nosso estudo, a técnica eletroforética utilizada

(LAEMLLI, 1970) foi a mesma usada por DEN BESTEN (1986) para análise das proteínas do esmalte dos animais que receberam 10, 25, 50 ou 100 ppm de flúor na água por 5 semanas. Este autor dividiu a fase de maturação do esmalte em duas regiões: esmalte parcialmente mineralizado e esmalte mineralizado. A retenção de proteínas de baixo peso molecular (amelogeninas) foi mais nítida somente no esmalte maduro, parcialmente mineralizado, dos animais que receberam 25 ppm ou mais de flúor na água.

Convém ressaltar que, em nosso estudo o esmalte maduro do incisivo foi coletado em sua totalidade, a partir da banda opaca, e a retenção de amelogeninas nesta região de maturação, foi visível, entre 17000 e 25000 daltons, no gel do grupo 3 (gel G<sub>3</sub>) cujos animais receberam uma dose complementar de 4,0 mgF/kg peso durante 45 dias (Fig. 4) e apresentaram fluorose do esmalte.

As alterações morfológicas dos ameloblastos secretores descritas na literatura, quando da administração do flúor, referem-se principalmente ao acúmulo de vacúolos e grânulos no interior da célula e alterações na região apical onde se encontra o processo de Tomes.

KRUGER (1967) verificou que após duas doses de 7 mg de NaF durante 3 dias consecutivos, o citoplasma dos ameloblastos secretores apresentaram acúmulo de corpos escuros e vacúolos claros. Posteriormente (KRUGER, 1968) observou ao M. E. que os vacúolos claros resultavam da confluência de vesículas vizinhas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso.

WALTON & EISENMANN (1974) e NEIMAN & EISENMANN (1975) sugeriram que o acúmulo dos vacúolos claros e corpos escuros no citoplasma celular dos ameloblastos, observados em incisivos de ratos injetados com altas doses de flúor, pode-

riam refletir uma interferência com a síntese protéica e secreção celular.

Em nosso estudo, a presença de um maior número de vacúolos claros no citoplasma dos ameloblastos secretores foram visíveis nos animais do grupo 1 e mais acentuadamente nos do grupo 3, quando comparados com o controle. Estes resultados concordam com os trabalhos citados acima e também com os estudos feitos "in vitro" (BRONCKERS, JANSEN e WOLTGENS, 1984; LYARUU et alii, 1986) que descreveram estas alterações nos ameloblastos de germes dentais de hamsters cultivados na presença do flúor. No grupo 2 as alterações da região em estudo foram tão discrepantes que torna-se difícil uma comparação com os demais grupos e com a literatura consultada, principalmente em se considerando que o nº de amostras foi reduzido, por perda, a um único animal.

Além das alterações intracelulares descritas, algumas modificações morfológicas na região do processo de Tomes foram documentadas em animais injetados com solução de NaF.

WALTON & EISENMANN (1974) observaram ao M.E., que após 2 injeções de 17 mgF/kg peso durante 4 dias, o processo de Tomes dos ameloblastos secretores parecia fragmentado.

Em outro estudo MORNSTAD e HAMMARSTROM (1978) descreveram a presença de um espaço com aspecto rendilhado na região do processo de Tomes entre os ameloblastos e a matriz do esmalte de molares de ratos tratados com uma dose muito alta (60 mgF/kg peso corporal) de NaF. Vinte e quatro horas após, os espaços vazios das formações com aspecto rendilhado, muitas vezes confluíam formando verdadeiras cavidades císticas. Estudos subsequentes (NORDLUND et alii, 1986) comprovaram, através da ultraestrutura celular que nas regiões císticas eram visíveis as fragmentações do processo de Tomes, além da

degeneração do RER e complexo de Golgi. Sugeriram então, que estas alterações degenerativas poderiam impedir o transporte intracelular de proteínas causando assim o acúmulo de produtos secretores vistos no interior da célula. Além do mais a exocitose normal das proteínas do esmalte através do processo de Tomes havia sido prejudicada após sua fragmentação.

Em nosso estudo, alterações na região do processo de Tomes, entre os ameloblastos secretores e a matriz do esmalte, caracterizadas por um espaço com aspecto rendilhado foram observadas nas ilustrações referentes aos grupos 1 e 3. Nos animais do grupo controle, que receberam flúor pela ração, alterações morfológicas nos ameloblastos secretores não foram visíveis ao M.O. Esses animais apresentaram, após 45 dias, uma concentração de flúor no sangue, estatisticamente semelhante ao grupo 1. Entretanto a injeção diária de 0,06 mg e 4,0 mgF/kg peso referentes aos grupos 1 e 3, resultava num pico transitório de flúor no sangue de 6,8  $\mu$ M e 388,0  $\mu$ M, respectivamente. Provavelmente, estes picos de flúor temporários e elevados tenham sido os responsáveis pelas injúrias verificadas nos ameloblastos secretores dos animais destes grupos. A cronicidade do estudo pode ter sido um fator relevante no desenvolvimento das lesões celulares que foram mais acentuadas nos animais do grupo 3 cuja dosagem de NaF recebida (4,0 mgF/Kg/dia) foi comprovadamente tóxica e fluorótica após 45 dias.

Segundo ANGMAR-MANSSON et alii (1976) e ANGMAR-MANSSON & WHITFORD (1982) picos transitórios de no mínimo 10  $\mu$ M de flúor no sangue são necessários para interferir com a formação do esmalte pelos ameloblastos e provocar distúrbios na sua mineralização. Entretanto estes autores chegaram a estes resultados através de microrradiografias do esmalte e não por estu

dos histológicos dos ameloblastos.

Nossos resultados sugerem que picos transitórios de flúor no plasma, inclusive menores que  $10 \mu\text{M}$ , produzidos por injeções diárias de NaF, administradas cronicamente, podem alterar a morfologia dos ameloblastos secretores, todavia, mais estudos são necessários neste sentido para confirmar estes achados.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram constatar que:

- Administração de 4,0 mgF/kg peso, durante 45 dias consecutivos, resultou numa concentração elevada de flúor no sangue e nos ossos, sendo comprovadamente tóxica e fluorótica para todos os animais;

- Independente da quantidade de flúor administrada, a concentração de flúor foi sempre maior no esmalte jovem do que no esmalte maduro;

- O esmalte fluorótico apresentou retenção de amelogéninas na fase de maturação;

- Alterações morfológicas observadas nos ameloblastos secretores parecem estar relacionadas com os picos transitórios de flúor no plasma, provocados pelas injeções diárias de NaF.

## RESUMO

Ratos Wistar com  $180 \pm 10$  g de peso corporal receberam injeções diárias de NaF (0,06; 0,12 e 4,0 mgF/kg peso) ou NaCl (controle), por via intraperitoneal, durante 45 dias.

O plasma e o osso fêmur foram submetidos à determinação de flúor. Dosagens de flúor, cálcio, fósforo e eletroforese das proteínas do esmalte foram realizadas nas matrizes do esmalte jovem e maduro dos incisivos. Para estudo histológico dos ameloblastos, cortes semi-finos foram obtidos da região de secreção do esmalte dos incisivos inferiores.

A dose diária de 4,0 mgF/kg peso resultou, no final de 45 dias, numa concentração elevada de flúor no sangue e nos ossos, sendo comprovadamente tóxica e fluorótica para todos os animais. O esmalte fluorótico apresentou retenção de amelogeninas na fase de maturação. As alterações observadas

na morfologia dos ameloblastos secretores parecem estar relacionadas com os picos transitórios de flúor no sangue, provocados pelas injeções intraperitoneais de NaF.

## SUMMARY

Three groups of 30 rats each received daily intraperitoneal injection, during 45 days, of 0,06, 0,12 and 4,0 mgF/kg of b.w., respectively. A fourth group used as control, received during the same period daily injections of 2,5% NaCl solution.

The amount of F was determined in blood plasma, bone (femur) and enamel. Only the 4,0 mg F group showed very high levels of F and clear signs of fluoroses and toxicosis. The relation Ca/P in the enamel was in all groups similar to the control group.

Protein analysis, by SDS electrophoresis on polyacrylamide gels, of young and mature enamel showed that some amount of amelogenins were retained in the mature enamel of the 4,0 mg F group.

The secretory ameloblasts of the lower incisors, of 2 animals of each group, were examined in 1  $\mu$ m-thick sections, stained with toluidine blue. All experimental groups showed some alterations in the ameloblasts being the vacuolization of cytoplasm and Tomes' processes the main ones. These morphologic changes seemed to be related not only to the amount of F given but also with the peak of F which occurred in blood plasma at 7,5 and 15 min after the F injections in all experimental groups.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGMAR-MANSSON, B.; ERICSSON, Y.; EKBERG, O. Plasma fluoride and enamel fluorosis. Calcif. Tiss Res., 22: 77-84, 1976.

\_\_\_\_\_ & WHITFORD, G.M. Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat. Caries Res., 16: 334-9, 1982.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. Caries Res., 18: 25-32, 1984.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Single fluoride doses and enamel fluorosis in the rat. Caries Res., 19: 145-52, 1985.

ARMSTRONG, W.D. Mechanisms of fluoride homeostasis. Archs Oral Biol., 4(Special suppl.): 156-9, 1961.

- BRONCKERS, A.L.J.J.; JANSEN, L.L.; WOLTGENS, J.H.M. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentration of fluoride on enamel formation in Hamster tooth-germs in organ culture in vitro. Archs oral Biol., 29: 811-9, 1984.
- CRENSHAW, M.A.; WENBERG, A.; BAWDEN, J.W. Fluoride-binding by the organic matrix of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 23: 285-7, 1978.
- CURY, J.A. Metabolismo do flúor em função da sua administração a ratas por períodos pré-natais sucessivos. Piracicaba, 1984. 136p. [Tese(Livre-Docência) FOP-UNICAMP].
- DEN BESTEN, P.K. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. J. dent.Res., 65: 1272-7, 1986.
- \_\_\_\_\_ & CRENSHAW, M.A. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. Archs oral Biol., 29: 675-9, 1984.
- DRINKARD, C.R.; CRENSHAW, M.A.; BAWDEN, J.W. The effect of fluoride on the electrophoretic patterns of developing rat molar enamel. Archs oral Biol., 28: 1131-4, 1983.
- EASTOE, J. J. dent. Res., 58(Special suppl. B): 986-7, 1979 .  
Apud TERMINE, J.D. et alii.
- EKSTRAND, J. A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. Calcif. tiss. Res., 23: 225-8, 1977.

- EKSTRAND, J.; LANGE, A.; EKBERG, O.; HAMMARSTROM, L. Relationship between plasma; dentin and bone fluoride concentration in rats following long-term fluoride administration. Acta pharmacol. et toxicol., 48: 433-7, 1981.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem., 66: 375-40, 1925.
- FUKAE, M. & SHIMIZU, M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Archs oral Biol., 19: 381-6, 1974.
- HAMMARSTRON, L. Scand. J. dent. Res., 79: 369-76, 1971. Apud WEATHERELL, J.A. et alii.
- HILLER, C.R.; ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A. Variations in the composition of developing rat incisor enamel. Calcif. tiss. Res., 18: 1-12, 1975.
- KRUGER, B.J. Histological effects of fluoride and molybdenum on developing dental tissues. Aust. Dent. J., 12: 54-60, 1967.
- \_\_\_\_\_. Ultrastructural changes in ameloblasts from fluoride treated rats. Archs oral Biol., 13: 969-77, 1968.
- \_\_\_\_\_. The effect of different levels of fluoride on the ultrastructure of ameloblasts in the rat. Archs oral Biol., 15: 109-14, 1970.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, 227 :

680-5, 1970.

- LEVENSON, G.E. The effect of fluoride on ameloblasts of mouse molar tooth germs "in vitro". J. biol. buccale, 8:255-63, 1980.
- LINDEMANN, G. Pigment alterations and other disturbances in rat incisor enamel in chronic fluorosis and in recovery. Acta odont. Scand., 25: 525-39, 1967.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. biophys. biochem. Cytol., 9: 409-14, 1961.
- LYARUU, D.M.; JONG, M.; BRONCKERS, A.L.J.J.; WOLTGENS, J.H.M. Ultrastructural study of fluoride-induced in vitro hypermineralization of enamel in hamster tooth germs explanted during the secretory phase of amelogenesis. Archs oral Biol., 31: 109-17, 1986.
- MCCANN, H.G. Determination of fluoride in mineralized tissues using the fluoride ion electrode. Archs oral Biol., 13: 475-7, 1968. Apud CURY, J.A.
- MORNSTAD, H. & HAMMARSTROM, L. Morphologic changes in the rat enamel organ following a single intraperitoneal injection of sodium fluoride. Scand. J. dent. Res., 86: 211-20, 1978.
- NEIMAN, A. & EISENMANN, D. The effect of strontium, cobalt and fluoride on rat incisor enamel formation. Anat. Rec., 183: 303-22, 1975.

NORDLUND, A.L.; SIMMELINK, J.W.; HENELL, F.; HAMMARSTROM, L.  
Ultrastructure of fluoride-induced cysts in the rat molar  
enamel organ. Scand. J. dent. Res., 94: 327-37, 1986.

\_\_\_\_\_ ; EKSTRAND, J.L.; HAMMARSTROM, L. Fluoride-induced  
cysts changes in the enamel organ of the rat molar. J. o-  
ral Pathol., 15: 87-92, 1986.

O. FEJERSKOV; LARSEN, M.J.; JOSEPHSEN, K.; THYLSTRUP, A. Ef-  
fect of long-term administration of fluoride on plasma  
fluoride and calcium in relation to forming enamel and den-  
tin in rats. Scand. J. dent. Res., 87: 98-104, 1979.

ROBINSON, C.; BRIGGS, H.D.; ATKINSON, P.J.; WEATHERELL, J. A.  
Matrix and mineral changes in developing enamel. J. dent.  
Res., 58: 871-80, 1979.

\_\_\_\_\_ ; KIRKHAM, J.; HALLSWORTH, A.S. Volume distribution  
and concentration of protein, mineral and water in develo-  
ping bovine enamel. Archs oral Biol., 33: 159-62, 1988.

SINGER, L. & ARMSTRONG, W.D. Regulation of plasma fluoride  
in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 686-9, 1964.

SHINODA, H. Effects of long-term administration of fluoride  
on physico-chemical properties of the rat incisor enamel.  
Calcif. tissue Res., 18: 91-100, 1975.

SPEIRS, R.L. Fluoride incorporation into developing enamel  
of permanent teeth in the domestic pig. Archs oral Biol.,  
20: 877-83, 1975.

SPEIRS, R.L. Incorporation of a dietary fluoride supplement into bone and developing teeth of the domestic pig. Archs oral Biol., 23: 1013-7, 1978.

TAVES, D.R. & GUY, W.S. Distribution of fluoride among body compartments. In: JOHANSEN, E. et alii. Continuing evaluation of the use of fluorides. AAAS Selected Symposium Series 11. Boulder, Westview Press, 1979. Chapt 7.

TERMINE, J.D.; BELCOURT, A.B.; CHRISTNER, P.J.; CONN, K. M. ; NYLEN, M.U. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. 1. Principle molecular species in developing bovine enamel. J. biol. Chem., 255: 9760-8 , 1980.

VIEIRA, S. Introdução a bioestatística. Rio de Janeiro, Campus, 1981. p. 223-35.

WALTON, R.E. & EISENMANN, D.R. Ultrastructural examination of various stages of amelogenesis in the rat following parenteral fluoride administration. Archs oral Biol., 19: 171-82, 1974.

WARSHAWSKY, H. & MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 15: 542-9, 1967.

\_\_\_\_\_ & SMITH, C.E. Morphological classification of rat incisors ameloblast. Anat. Rec., 179: 423-46, 1974.

WEATHRELL, J.A.; DEUTSCH, D.; ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A. S.

Fluoride concentration in developing enamel. Nature, 256:

230-2, 1975.