

LAURA ALVARENGA ZUCCO BRÓGLIO

ESTUDO CINÉTICO DO EFEITO DO FLÚOR
SANGÜÍNEO E ÓSSEO NA INCORPORAÇÃO AO
ESMALTE DENTAL DE ANIMAIS
(*Rattus norvegicus* var. *albinus*)
PREVIAMENTE EXPOSTOS OU NÃO E
SUBMETIDOS A UMA DOSE ÚNICA

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências,
Área de Biologia e Patologia
Buco-Dental.

PIRACICABA - SP

- 1994 -

B786e

21711/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

LAURA ALVARENGA ZUCCO [BRÓGLIO nº 286

ESTUDO CINÉTICO DO EFEITO DO FLÚOR
SANGÜÍNEO E ÓSSEO NA INCORPORAÇÃO AO
ESMALTE DENTAL DE ANIMAIS
(*Rattus norvegicus* var. *albinus*)
PREVIAMENTE EXPOSTOS OU NÃO E
SUBMETIDOS A UMA DOSE ÚNICA

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido [Cury

Este exemplar foi
dondamente corrigido
conforme resolução
CCPG/036/83
Piracicaba, 22/03/94
Jaime
Prof. Dr. Jaime A. Cury

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências,
Área de Biologia e Patologia
Buco-Dental.

PIRACICABA - SP

DEDICATÓRIA

A Luis Carlos, meu dileto
companheiro, amigo e espôso
dedico os esforços aplicados
na confecção desta tese.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Pedindo desculpas àqueles que possam ter sido esquecidos, agradeço às pessoas que efetivamente tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY, pela orientação caracterizada de verdadeiro cunho científico, sem a qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

A Sra. MARIZA DE JESUS CARLOS SOARES, técnica de laboratório da área de Bioquímica desta Faculdade, pela efetiva colaboração nas análises laboratoriais e pela amizade.

Ao Sr. WALDOMIRO VIEIRA FILHO, técnico de laboratório da área de Bioquímica desta Faculdade, pela participação na parte experimental deste trabalho.

A Prof^ã Dra. TEREZA SCARPARI BARRICHELLO, pela sua inestimável cooperação e sincera amizade.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia e Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela participação ativa, em minha formação científica, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
REVISTA DA LITERATURA.....	05
PROPOSIÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	57
RESUMO.....	59
SUMMARY.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O flúor^{*}, nas mais diferentes formas, vem de longa data sendo empregado individual ou coletivamente em programas de saúde pública. Contudo, apesar dos inúmeros trabalhos que demonstram sua eficácia na redução da cárie dental (AASENDEN & PEEBLES¹, 1974; KEENE e colab.²², 1976), várias facetas do problema a serem resolvidas, geram a cada pesquisa, novas controvérsias.

Até alguns anos atrás, um dos pontos mais controvertidos referia-se aos efeitos colaterais do flúor com relação a sua toxicidade (MAGALHÃES e colab.²⁵, 1978). Entretanto, trabalhos como de MYERS²⁸ (1983), comprovaram que a margem de risco entre os efeitos benéficos do flúor e as primeiras reações tóxicas detectáveis era extremamente pequena, desde que as quantidades aplicadas ou ingeridas, estivessem dentro de uma margem de segurança.

Até pouco tempo, dizia-se que era preferível fluorose dental à cárie. Entretanto, com a redução da prevalência da mesma observada nos últimos 20 anos, a controvérsia voltou-se para o

* Termo genérico para definir as formas iônica, ionizável e não ionizável do elemento flúor.

aumento de casos de fluorose em regiões em que a população ingere água fluoretada, ou mesmo em regiões onde não há fluoretação da água (WÖLTGENS e colab.⁴², 1989). PENDRYS & STAMM³² (1990), concluem em trabalho de revisão que a prevalência de fluorose em áreas que recebem fluoretação na água aumentou desde 1930. BURT⁷ (1992), também em artigo de revisão, afirma que evidências suportam a conclusão, de que a prevalência de fluorose tem aumentado nos últimos 30 a 50 anos, e associa este fato à falta de critérios no uso do flúor através de dentifrícios, alimentos e sucos de frutas processadas, além da água fluoretada.

O mecanismo de desenvolvimento da fluorose vem sendo estudado ao longo dos anos, não tendo entretanto sido cientificamente identificado. Alguns autores (SINGER & ARMSTRONG³⁵, 1960; ARMSTRONG⁶, 1961) afirmaram que para haver distúrbios na mineralização do esmalte deveriam existir elevados níveis de flúor no sangue, enquanto outros (ANGMAR-MANSSON & WHITFORD⁵, 1985), observaram que distúrbios na amelogênese induzidos pelo flúor, podem ocorrer na ausência de concentrações elevadas do halogênio no plasma. Deste modo, sabe-se que o flúor é mobilizado do osso (ZIPKIN⁴³, 1972; ERICSSON¹⁶, 1982), assim, o distúrbio, segundo ANGMAR-MANSSON e colab.², (1990), seria induzido pelo fluoreto^{**} liberado do osso adjacente ao órgão do esmalte. De acordo com esta hipótese, tal mecanismo também poderia sofrer influência das condições prévias de ingestão de flúor, considerando o grau de saturação óssea (EKSTRAND e colab.¹⁵, 1990).

** Ou ion flúor - Forma iônica e fisiologicamente ativa do elemento flúor.

Tendo-se em vista o relatado, o objetivo deste trabalho foi estudar se tempos após a administração de uma dose única, o flúor incorporado no osso estaria relacionado com fluorose dental, considerando-se as condições experimentais de ingestão prévia.

REVISTA DA LITERATURA

REVISTA DA LITERATURA

1. Fluorose dental.

A fluorose dental é conhecida como uma desordem na mineralização que ocorre em função da ingestão crônica de níveis relativamente baixos de flúor durante a formação e desenvolvimento dos dentes (FEJERSKOV e colab.¹⁷, 1977). Entretanto o mecanismo de desenvolvimento da fluorose ainda é obscuro.

O primeiro relato de alteração dental, chamada na época de esmalte mosqueado, foi feita por BLACK & McKAY em 1916, a qual estava relacionada endemicamente com a água consumida, de acordo com pesquisa posterior feita pelo Serviço Público de Saúde dos Estados Unidos (KEMPF & McKAY²³, 1930). Anos mais tarde, quando descobriu-se que antiga fonte de abastecimento de água da cidade de Bauxita, endemicamente comprometida com esmalte mosqueado, havia 13,7 ppm de fluoreto (CHURCHILL⁸, 1931) é que se relacionou esmalte mosqueado com fluorose dental. Desta maneira, o então chamado "índice de esmalte mosqueado", preconizado por DEAN¹²

(1938) para descrever as alterações do esmalte, passou a ser chamado de índice de fluorose.

DEAN¹¹, em 1942, após extensivas observações não só quantificou a relação entre a dose de flúor ingerida e a prevalência e severidade da fluorose dental, como também definiu sua relação com a relevância de cárie, demonstrando que a redução significativa de cárie dental poderia ser conseguida, ingerindo-se água com uma determinada concentração de íon flúor sem desenvolvimento de fluorose dental inaceitável (BURT⁷, 1992).

De 1945 a 1947 iniciou-se o estudo de agregação de íon flúor ao tratamento de água. Quatro estudos independentes foram conduzidos nos Estados Unidos com o consumo de água com 1,0 ppm F em comparação com cidades vizinhas contendo água com menos de 0,2 ppm F. Nenhuma diferença em termos de saúde geral, crescimento e desenvolvimento foi encontrada nas crianças dos grupos em estudo e controle; chegando-se a conclusão que além da redução de cárie, nenhum efeito sistêmico de saúde foi constatado com o uso de água fluoretada (NEWBRUN³⁰, 1986).

RUSSEL³⁴, em 1962, examinando crianças nascidas e criadas em áreas em que a água apresentava concentrações ótimas de flúor (cerca de 1,0 ppm), observou que 7 a 16 % das crianças exibiam fluorose dental leve ou muito leve nos dentes permanentes. Estes níveis de prevalência foram reportados, em uma época onde somente a água era fluoretada.

Tendo em vista o sucesso da agregação de fluoreto ao tratamento de água para reduzir os níveis da doença cárie das

populações, foram sugeridos métodos alternativos de uso sistêmico do flúor como os comprimidos ou flúor em gotas para regiões deficientes de fluoreto na água. Como o paciente ingere o flúor, problemas relacionados com risco de fluorose dental também estariam presentes. Assim sendo, mudanças de posologia ocorreram tendo em vista relatos inesperados no índice de fluorose dental em crianças (D'ANGELO¹⁰, 1991).

MYERS²⁸, em 1983, demonstrou que a margem de segurança entre o efeito benéfico do flúor e as primeiras reações tóxicas detectáveis é pequena, e que as quantidades usadas deveriam ser precisamente determinadas. Um platô de 1,5 $\mu\text{mol/l}$ de flúor no plasma deveria se estabelecer, pois picos freqüentes de aumento de flúor no plasma poderiam levar a fluorose.

Algumas revisões detalhadas como a de SZPUNAR & BURT²⁸ (1987), concluem que um aumento na prevalência de fluorose tem ocorrido desde 1930, sendo que, embora o aumento seja mais acentuado em comunidades que recebem fluoretação da água, esta prevalência também aumentou em comunidades que não recebem água fluoretada.

PENDRYS & STAMM³² (1990), em estudo de revisão, observaram que a prevalência de fluorose da forma leve para a moderada, segundo a classificação de DEAN, tem aumentado, e correlacionaram este aumento ao uso de água fluoretada, suplementação de flúor, dieta, dentifrícios fluoretados e aplicação tópicos de flúor.

Também estudando o aumento da prevalência de fluorose BURT⁷ (1992), sugere uma troca nos padrões de ingestão de flúor sistêmico, em decorrência do alto grau de variabilidade na quantidade e qualidade da dieta humana com produtos contendo flúor, assim como o conteúdo de flúor em diferentes alimentos e bebidas, e em diferentes amostras de um mesmo alimento ou bebida.

2. Mecanismos de desenvolvimento da fluorose dental.

Há 200 anos atrás defeitos no esmalte dental estavam relacionados com raquitismo, sarampo ou escorbuto. Posteriormente, a sífilis foi incluída como um fator etiológico (SUCKLING³⁷, 1989). Em 1938, DEAN¹² correlacionou o índice de fluorose com a concentração de íon flúor na água consumida. No presente, tenta-se relacionar fluorose com a dose de flúor ingerida, assim como com a concentração de flúor no osso adjacente ao órgão do esmalte (ANGMAR-MANSSON e colab.², 1990).

O trabalho de NEWMAN & NEWMAN³¹ (1958), cita que níveis constantes de flúor no plasma menores que 3 μM poderiam estar associados com fluorose dental, em decorrência de contínua saturação pelo osso e posterior mobilização. O osso adjacente, influenciaria o desenvolvimento do esmalte, um conceito suportados pelos achados de LINDEMANN²⁴ (1967), que observou estrias pigmentadas em incisivos de ratos, após período de 1 a 6 meses após paralisação da administração de altas doses de flúor.

Um trabalho tentando mostrar uma relação entre a concentração plasmática de flúor e a encontrada nos tecidos calcificados de ratos, foi publicado em 1969 por SINGER & ARMSTRONG³⁵. Os autores administraram a ratos, água com 50 ppm F, fazendo análises 20, 40 e 60 dias após. Enquanto a concentração plasmática não variou (0,43, 0,41 e 0,44 ppm) a da dentina dos molares aumentou em função do tempo (0,056, 0,084 e 0,104% F). Os valores do grupo controle para o plasma e dentina foram 0,26 ppm F e 0,026% F respectivamente. A constância de flúor nos líquidos corporais foi a explicação para o pequeno aumento de flúor nos tecidos calcificados observado entre os dias 40 e 60.

ZIPKIN⁴³ (1972) estudou a mobilização de flúor dos ossos e dentes de ratos após 70 dias de administração de 10 ppm F a estes animais, seguida da suspensão por um período subsequente de 350 dias. O autor verificou que enquanto os dentes molares praticamente não perderam flúor, os incisivos perderam tudo aquilo previamente depositado. O autor considerou que a despeito do esqueleto estar perdendo fluoreto após suspensão da dieta não houve reincorporação no incisivo o qual está em crescimento contínuo, isto constatado 70 dias após a paralisação da administração da água fluoretada.

Em artigo de revisão WHEATHERELL e colab.⁴⁰ (1977), apresentaram evidências de que a concentração de flúor no esmalte em formação do incisivo de rato dependia da idade do animal. Segundo os autores, isto se deveria parcialmente a um aumento da concentração de flúor no sangue em função da idade do animal, devendo também refletir a tendência de parte do fluoreto liberado

durante a mineralização de reincorporar-se ao esmalte jovem adjacente que está em formação.

Estudos de farmacocinética de flúor usando eletrodos, realizados por EKSTRAND¹⁴ em 1977, demonstraram que após múltiplas doses orais de 3,0 mg de flúor (após 6 horas) ou 4,5 mg de flúor (após 12 horas), estabelecia-se um estado aparente de equilíbrio de flúor no plasma de 54 e 88 ng/ml, respectivamente, sendo que após 11 horas observava-se um retorno aos níveis de flúor anteriores a dose.

Com o objetivo de estudar os distúrbios na mineralização do esmalte associados com baixos, mas relativamente constantes níveis de flúor no plasma, ANGMAR-MANSSON & WHITFORD⁴ (1982), trataram ratos com água fluoretada contendo 0, 10, 25 ou 60 ppm F por 8 semanas. Dois outros grupos receberam flúor através de implantes subcutâneos (0,14 e 0,32 mg/dia). Ao final do período experimental os níveis de flúor no plasma dos animais que receberam água fluoretada com 10 ppm F era 3,0 μM e dos dois grupos que receberam os implantes 1,5 e 3,1 μM , respectivamente. O esmalte do incisivo de cada um destes grupos mostrou evidências microrradiográficas de fluorose, sendo a fluorose mais severa no grupo que recebeu o implante com uma concentração média de flúor no plasma de 3,1 μM . Os distúrbios na mineralização do esmalte foram mais severos nos grupos que receberam 25 e 60 ppm F na água respectivamente. Estes achados sugeriram aos autores que a fluorose dental está relacionada ao tempo de exposição ao flúor somada a concentração e a forma de administração.

Na seqüência de estudos, ANGMAR-MANSSON e WHITFORD³ (1984), observaram que picos ocasionais na concentração de flúor ao redor de 10 $\mu\text{mol/l}$ ou níveis prolongados e relativamente constantes, tão baixos como 1,5 $\mu\text{mol/l}$ estão associados com distúrbios no desenvolvimento do esmalte de incisivos de ratos. Em 1985, ANGMAR-MANSSON & WHITFORD⁵, afirmaram que distúrbios na mineralização do esmalte, interpretado como fluorótico, pode ocorrer na ausência de níveis elevados de flúor no plasma, sugerindo que a causa seria a liberação de flúor do osso adjacente ao dente em desenvolvimento, em quantidade suficiente para causar fluorose no esmalte.

ROBINSON & KIRKHAM³³ (1990), revisando o papel de flúor, nos estágios de desenvolvimento dos tecidos mineralizados, descrevem os eventos sobre os quais o flúor poderia exercer algum efeito, como sendo: Proliferação celular, Diferenciação celular e a Função celular, que compreenderia a síntese da matriz protéica, secreção da matriz parcialmente mineralizada, alterações na composição da matriz, deposição mineral durante o estágio secretor e incorporação mineral durante a maturação. Os autores discutiram os efeitos das concentrações de flúor que não são citotóxicas na variação de até 1 a 2 $\mu\text{mol/l}$, assim como o efeito do flúor sobre estágios específicos do desenvolvimento dental e ósseo e, observaram que este era pequeno sobre a expressão do gen com relação a odontogênese, embora houvesse evidência de que o flúor fosse osteogênico em tecidos embriológicos e adultos. A expressão das proteínas da matriz extracelular parecia não estar enfraquecida, mas alterações sutis detectadas na matriz do

esmalte poderiam ser devidas a alterações seletivas na absorção de aminoácidos ou a uma interferência no processamento subsequente de proteína. Isto poderia também ser devido a uma extensão do período secretor sem alteração simultânea no processamento da matriz pós-secretora. A remoção da matriz era aparentemente diminuída com concomitante maturação incompleta. Ao final, os autores concluíram que a inibição da mineralização completa afetaria a interação matriz-mineral, embora um efeito direto sobre a modulação dos ameloblastos não pudesse ser desprezada.

NELSON e colab.²⁹ (1989), determinaram a quantidade de flúor no esmalte e dentina de incisivos de carneiros, após durante 3 semanas ou 6 meses, administrarem doses diárias de 0,2 mg F/kg peso para a análise de dentina, e 0,5 mg F/kg peso para a análise de esmalte e dentina. As concentrações de flúor encontradas refletiram que tanto a duração de exposição ao flúor, como a dose usada, afetam o mecanismo de desenvolvimento de lesões fluoróticas.

Em 1990, ANGMAR-MANSSON e colab.², utilizaram em seu trabalho, ratas que receberam uma única dose intraperitoneal de flúor (0, 4, 7 ou 14 mg F/kg peso). Eles observaram que os níveis de flúor no plasma, retornavam aos valores anteriores a dose dentro de 24 horas. Os incisivos dos animais sacrificados 35 ou 70 dias após a dose de flúor, foram analisados com relação a defeitos na mineralização e concentrações de flúor e potássio. Aos 35 dias, todos os animais injetados com flúor apresentavam fluorose dental. Aos 70 dias, período em que o incisivo teria

sido renovado pelo menos 2 vezes, a fluorose ainda era evidente no grupo que recebeu a dose de 14 mg/kg de peso. Os autores explicaram o fato através da hipótese de que, após uma dose aguda e relativamente alta de flúor, o íon seria liberado lentamente através de troca e remodelação do osso adjacente ao órgão do esmalte, o que produziria localmente, concentrações elevadas de flúor, nos fluidos celulares e extracelulares ao redor do esmalte em desenvolvimento.

Em 1992, DENBESTEN & THARIANI¹³, também em estudo de revisão, indicaram que a administração de uma dose aguda alta de flúor, poderia afetar os ameloblastos no estágio secretor, resultando em esmalte fluorótico menos maturo. Observaram também a possibilidade de que altos níveis de flúor administrados no estágio inicial da formação do esmalte, estaria armazenado na forma fracamente ligada ao osso ou a matriz secretora do esmalte, resultando em aumento dos níveis de flúor no local onde o dente está se desenvolvendo.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Tendo em vista o relatado, o objetivo deste trabalho foi estudar se tempos após a administração de uma dose única, o flúor incorporado no osso estaria relacionado com fluorose dental considerando condições experimentais de ingestão prévia.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais.

Foram utilizados no experimento, 186 ratas da linhagem Wistar, com 2 meses de idade. Antes da divisão dos animais em grupos experimentais, eles receberam durante 15 dias água destilada, após o que eles foram divididos da seguinte maneira.

Grupo I - Composto de 78 animais que receberam água fluoretada com 10ppm de flúor durante 45 dias. Decorrido este período, 72 desses animais receberam uma dose de 7 mg F/kg peso via intraperitoneal, sendo em seguida sacrificados 6 animais por tempo nos seguintes intervalos: 15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 96 horas e 8 e 16 dias. Após a dose, os animais receberam água destilada até o momento do sacrifício. Os seis animais remanescentes foram sacrificados sem receber a referida dose, logo após decorridos os 45 dias da administração da água fluoretada.

Grupo II - Composto de 72 animais que receberam água destilada durante 45 dias. Decorrido este período, os ani-

mais receberam uma dose de 7 mg F/kg peso via intraperitoneal. Após a administração da dose foram sacrificados 6 animais a cada período de tempo de 15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 96 horas e 8 e 16 dias. Após a dose, os animais receberam água destilada até o momento do sacrifício.

Grupo III - 36 animais que receberam apenas água destilada durante 45 dias, sendo então sacrificados 3 animais por tempo nos intervalos de 15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 96 horas e 8 e 16 dias. Os animais receberam água destilada, durante todo o período experimental.

Para todos os animais a alimentação foi suspensa 24 horas antes do sacrifício. Em todo o experimento os animais foram alimentados com ração Produtor, na qual constatamos a ausência de flúor livre ou fluoreto ionizável. A água fluoretada a 10ppm foi preparado com NaF da Merck.

2. Determinação do íon flúor no plasma.

As ratas foram anestesiadas com éter etílico e o sangue total foi coletado por rompimento do plexo branquial. Isto é conseguido através de uma incisão cutânea na região anterior torácica e afastamento da pele para formar uma "bolsa" lateral que recebeu o sangue oriundo da hemorragia. O sangue foi coletado com seringa heparinizada (heparina Evan's, Glaxo) e o plasma foi ob-

tido através de centrifugação (centrífuga Excelsion Baby) a 2.500 rpm durante 10 minutos, obtendo-se então o mínimo de 1 ml de plasma por animal. As amostras de plasma foram armazenadas a -10°C até o momento da análise. Os teores de flúor no plasma foram determinados através de potenciômetro Orion modelo 701A e eletrodo específico para íon flúor modelo 96-09. Na calibração dos eletrodos foram empregados padrões contendo de $0,025\mu\text{g}$ a $0,5\mu\text{g}$ de flúor por mililitro em solução de TISAB 50%, obtendo-se uma curva de calibração, onde as leituras das concentrações de flúor na solução foram expressas em milivolt.

A concentração de flúor na amostra de plasma, expressa em ngF/ml, foi calculada pela análise de regressão linear dada pela fórmula:

$$b = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$$y = a - b \cdot \log x_i$$

$$x = \text{antilog} \frac{a - y}{b}$$

Onde: x_i representa as concentrações de flúor existentes nos padrões e y_i a leitura em mV correspondente a cada um destes padrões.

3. Determinação de flúor no osso alveolar em contato com o esmalte jovem.

Após a obtenção do sangue, com conseqüente morte das ratas, suas mandíbulas foram retiradas e divididas em hemimandíbulas, com remoção dos tecidos moles aderidos. Com auxílio de motor (Betil) e disco de carborundum, retirou-se a porção do osso alveolar em contato com o esmalte jovem, que foi aproveitada (Figura 1).

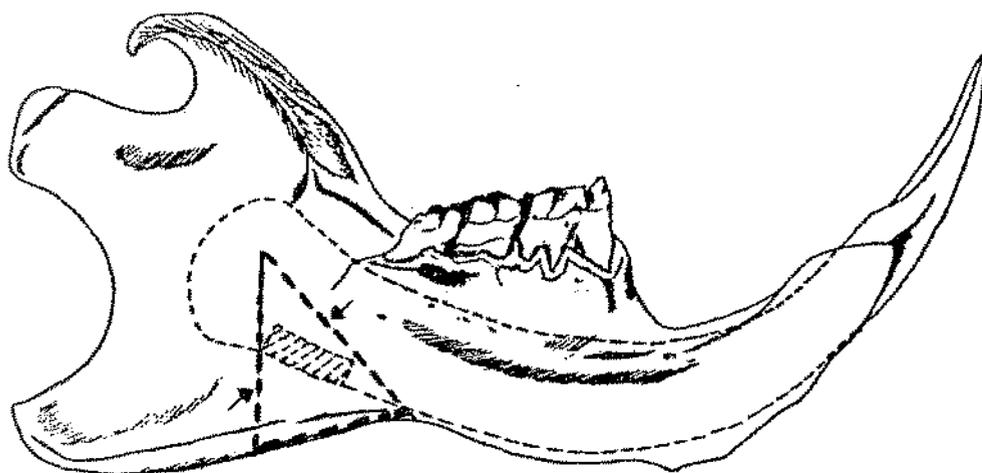


Figura 1. Porção do osso alveolar em contato com o esmalte jovem.

3.1. Determinação do flúor no osso alveolar total em contato com o esmalte jovem.

O osso alveolar proveniente da hemimandíbula esquerda foi desidratado em estufa a 80°C por 24 horas, sendo então pulverizado em almofariz de porcelana e os pós armazenados em estufa a 65°C até o momento da análise. Inicialmente padronizou-se a determinação potenciométrica, pesando-se em copos plásticos amostras de 11 mg de pó de osso alveolar, os quais durante 1 hora foram desmineralizados em 1 ml de HCl M, após o que 4 ml de citrato trissódico 0,5 M foram acrescentados. Previamente às determinações, uma curva de calibração foi elaborada a partir de soluções padrões de íon flúor preparadas em citrato 0,4 M e HCl 0,2 M e contendo de 2,5 a 10 µg F/ml, obteve-se então uma leitura das concentrações de 2,5 a 10 µg F/ml na solução que eram expressas em milivolt. A seguir utilizamos a fórmula oriunda da análise de regressão linear como já descrito no item anterior.

3.2. Determinação do flúor no osso alveolar superficial em contato com o esmalte jovem.

O osso alveolar proveniente da hemimandíbula direita foi encerado com cera 7 em toda sua porção externa.

Uma porção de osso alveolar em contato com o esmalte jovem, foi removida através de desmineralização, com 0,5 ml de HCl 0,5 M, sendo a desmineralização paralisada por 0,5 ml de TISAB (contendo 20 g NaOH/l), de acordo com o descrito por

MELLBERG²⁶ (1980) para esmalte dental. As descalcificações foram feitas em tubos plásticos durante agitação constante (agitador Klíne) por 1 minuto, a seguir as concentrações de fósforo e íon flúor foram determinadas. O fósforo foi determinado pelo método de FISKE-SUBBAROW¹⁸ (1955) sendo as absorvâncias lidas em um espectrofotômetro Micronal digital B34211/1-A 660 nm. Todas as dosagens de fósforo foram feitas em duplicata. As determinações de íon flúor foram potenciométricas, utilizando-se um potenciômetro Orion modelo EA940. Os eletrodos foram calibrados utilizando-se padrões contendo de 0,1 a 1,0 µg de flúor por mililitro em solução de TISAB (20 g de NaOH/l) a 50% e HCl 0,25 M.

Obtida a concentração de íon flúor na solução, a concentração da amostra foi calculada a partir da quantidade de osso na solução, a qual é decorrente da dosagem de fósforo e da consideração de que a composição do osso é semelhante à da dentina (JENKINS²¹, 1978), deste modo suas concentrações de fósforo na amostra expressa em µg P/mg de osso foi determinada pela fórmula:

$$CA = DOA \times \frac{CP}{DOP}$$

$$CA = DOA \times \frac{7,5}{DOP} = \mu\text{g P}/0,01$$

$$\mu\text{g P} = DOA \times \frac{750}{DOP} = \text{quantidade de P } (\mu\text{g}) \text{ removido}$$

$$100 \mu\text{g osso} \longrightarrow 10,5 \mu\text{g P}$$

$$\mu\text{g (y)} \longrightarrow \text{DOA} \times \frac{750}{\text{DOP}}$$

$$y = \text{DOA} \times \frac{75.000}{\text{DOP} \times 10,5}$$

Onde: CA = Concentração da amostra

DOA = Densidade óptica da amostra

CP = Concentração do padrão

DOP = Dosagem óptica padrão

4. Determinação de flúor no fêmur.

Os fêmures direitos das ratas sacrificadas foram retirados e removido o tecido mole aderido. A seguir foram desidratados em estufa a 80°C por 24 horas. Com um disco de Carburundum adaptado em motor Betil, removeram-se fragmentos da diáfise da porção superior do fêmur. Cada fragmento foi pulverizado separadamente em almofariz de porcelana e os pós armazenados em estufa a 65°C até o momento da análise, para a qual utilizaram-se amostras de 3,0 mg até 20 mg de pó de fêmur desmineralizado por uma hora em 1 ml de HCl M, após o que 4 ml de citrato trissódico 0,5 M foi acrescentado.

Previamente às determinações, uma curva de calibração foi elaborada a partir de soluções padrões de íon flúor preparadas em citrato 0,4 M e HCl 0,2 M, contendo de 0,25 a 10,0 $\mu\text{g F/ml}$. As

leituras das amostras foram submetidas a análise de regressão linear já descrita em item anterior.

5. Determinação de flúor no esmalte jovem dos incisivos inferiores.

O esmalte jovem de 4 animais foi removido com o auxílio de um holleback (Figura 2), e sendo a quantidade de esmalte jovem por incisivo muito pequena, foi necessário fazer-se um *pool* do material para cada período de tempo analisado. O esmalte jovem removido foi armazenado em estufa a 80°C por 24 horas. Amostras de 3,5 a 10,0 mg de esmalte foram pesadas em copos plásticos, desmineralizadas em 1,0 ml de HCl M por 1 hora, após o que 4 ml de citrato de sódio 0,5 M foi acrescentado para regularizar o pH. Previamente às determinações, uma curva de calibração foi elaborada a partir de soluções padrões de flúor preparados em citrato 0,4 M e HCl 0,5 M e contendo 1,0 a 10,0 µg F/ml.

As análises foram realizadas em potenciômetro Procyon PHIE 800 , sendo as leituras dadas em milivolt.

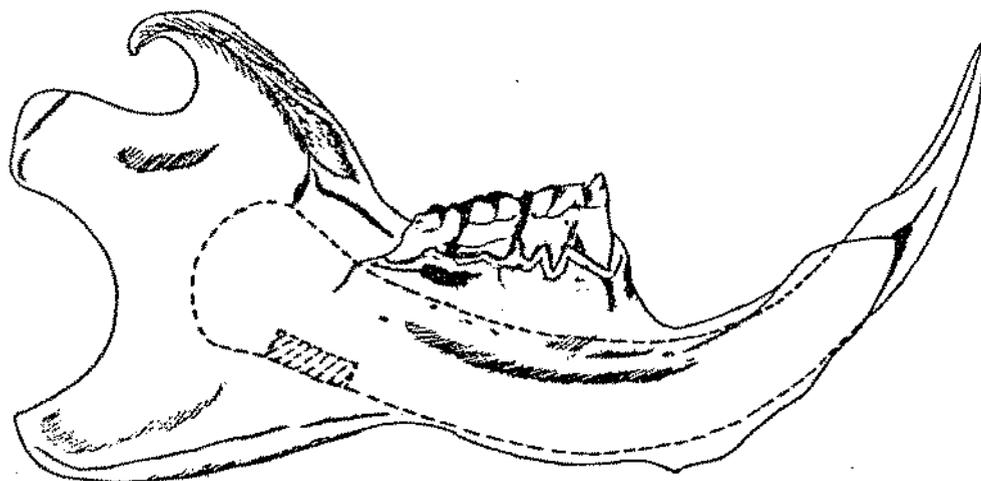


Figura 2. Diagrama do incisivo central inferior do rato, onde a região pontilhada corresponde a porção do esmalte jovem removida.

6. Análise estatística.

As concentrações de flúor nas amostras de plasma, fêmur e osso alveolar total e superficial, nos tempos de 15 minutos a 384 horas foram analisadas segundo o esquema fatorial, seguindo as recomendações de MONTGOMERY²⁷ (1976). Antes porém, foi feita a análise de resíduos objetivando detectar possíveis violações das suposições no modelo estatístico adotado, seguindo recomendações de WETHERILL e colab.⁴¹, (1986).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Concentração de flúor no plasma.

A Tabela I expressa as médias da variação da concentração de íon flúor no plasma de ratas, que receberam água fluoretada e destilada durante 45 dias e a seguir receberam uma dose de 7 mg F/kg (Grupos I e II). Esta tabela também expressa a média de concentração de íon flúor em ratas que somente receberam água destilada durante todo o período experimental (Grupo III). A significância estatística entre os tratamentos em cada tempo também está expressa (Teste de Tukey).

Tabela I - Média da concentração de íon flúor no plasma de ratas que foram submetidas a diferentes condições experimentais e então sacrificadas nos intervalos de tempo expressos na tabela.

Grupos Experimentais	PERÍODOS DE SACRIFÍCIO												
	0	15'	30'	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	192 h	384 h
Grupo I	0,049	3,576a	5,160a	8,284a	2,321a	0,772a	0,749a	0,150a	0,118a	0,107a	0,068a	0,058a	0,062a
Grupo II		3,449a	4,215a	4,234a	2,001a	0,744a	0,266a	0,128a	0,108a	0,045a	0,060a	0,046a	0,057a
Grupo III		0,083b	0,046b	0,036b	0,021b	0,031b	0,031c	0,027b	0,022b	0,031b	0,031b	0,019b	0,019b

* Resultados expressos em µg F/ml.

** Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de 5%.

A ilustração destes resultados pode ser vista no Gráfico 1.

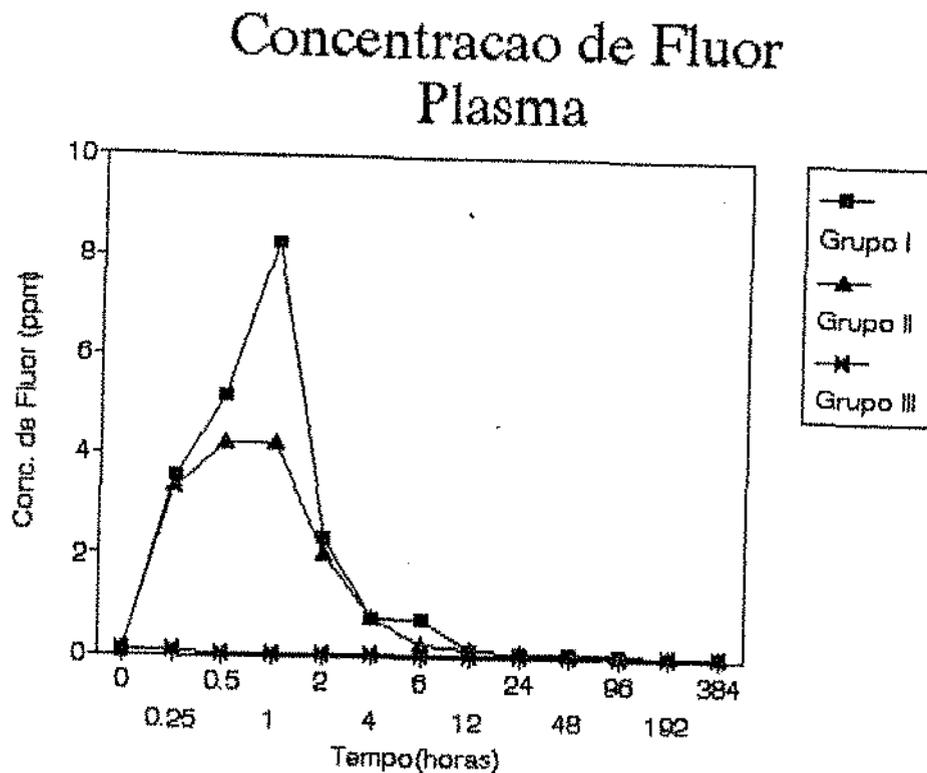


Gráfico 1 - Médias da concentração de flúor ($\mu\text{g}/\text{ml}$) após a ingestão de H_2O fluoretada e ou destilada durante 45 dias, seguida de dose de 7 mg F/kg peso. Após a dose os animais foram sacrificados nos períodos de tempo expressos no gráfico.

Os resultados do teste mostraram que a maior média encontrada foi para o Grupo I, ou seja, animais que por 45 dias receberam água fluoretada seguido de uma dose de 7 mg F/kg peso.

Quando fez-se a comparação das médias dentro de cada tempo, pudemos observar que apenas no tempo de 6 horas o Grupo I diferiu do Grupo II, sendo que ambos os tratamentos diferiram do controle (Grupo III) em todos os períodos de tempo (Tabela I).

Através da regressão polinomial para os níveis de tempo dentro de cada grupo experimental, observou-se que as maiores médias para concentração de flúor no plasma foram obtidas nos tempos de 15 e 30 minutos e 1 hora, tanto para o Grupo I como para o Grupo II.

2. Concentração de flúor nas amostras de osso alveolar em contato com o esmalte jovem.

A Tabela II expressa a média da variação da concentração de ion flúor em amostras de osso alveolar em contato com o esmalte jovem de ratas dos Grupos I e II. Esta tabela também expressa a média da concentração de ion flúor em ratas que só receberam água destilada durante todo o período experimental. A significância estatística entre os tratamentos em cada tempo também está visualizada na tabela (Teste de Tukey).

Tabela II - Média da concentração de íon flúor no osso alveolar de ratas (superficial e total) que foram submetidas a diferentes condições experimentais, e então sacrificadas nos intervalos de tempo expressos na tabela, e significância estatística (Teste de Tukey).

Tempo	Grupos	Médias	
		Superficial*	Total*
0	I	290,97	344,70
15'	I	359,7286c	428,7168a
	II	168,1932b	183,5376b
	III	79,3146a	103,0453c
30'	I	306,0584c	578,6058a
	II	134,7064b	118,5864b
	III	79,3146a	114,3056b
1 h	I	428,9510c	537,8406a
	II	195,0104b	219,8136b
	III	79,3146a	163,6671b
2 h	I	368,7863c	580,8934a
	II	201,4750b	278,1401b
	III	79,3146a	196,1564c
4 h	I	271,4930c	489,5307a
	II	210,1484b	296,5718b
	III	71,7629a	167,2275c
6 h	I	246,2249c	487,5368a
	II	198,4379b	211,3419b
	III	71,7629a	167,2275b
12 h	I	577,1665c	446,0780a
	II	195,6345b	303,8689b
	III	68,2173a	169,2446c
24 h	I	311,1356b	361,5478a
	II	239,8063b	343,1040a
	III	68,2173a	171,9841b
48 h	I	407,6507c	473,2217a
	II	215,7105b	285,0743b
	III	71,7629a	167,2275c
96 h	I	385,0210c	554,6839a
	II	202,3380b	294,3316b
	III	79,9667a	175,7671c
192 h	I	350,2229c	588,3997a
	II	178,2228b	310,7757b
	III	79,9667a	162,0452c
384 h	I	360,6946c	362,0627a
	II	123,3824b	162,0452b
	III	79,9667a	154,7612b

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de 5%

* µg/g (ppm)

Os Gráficos 2 e 3 ilustram os resultados expressos na Tabela II.

Concentração de Fluor Osso Alv. Superficial

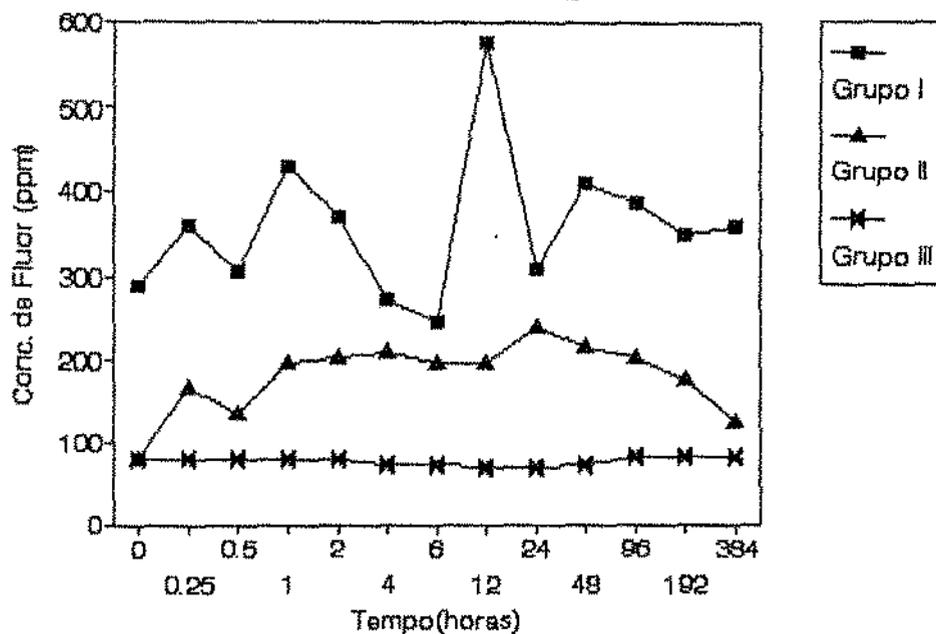


Gráfico 2 - Médias da concentração de íon flúor na superfície de amostras de osso alveolar, para os diferentes períodos de tempo, nos diferentes grupos.

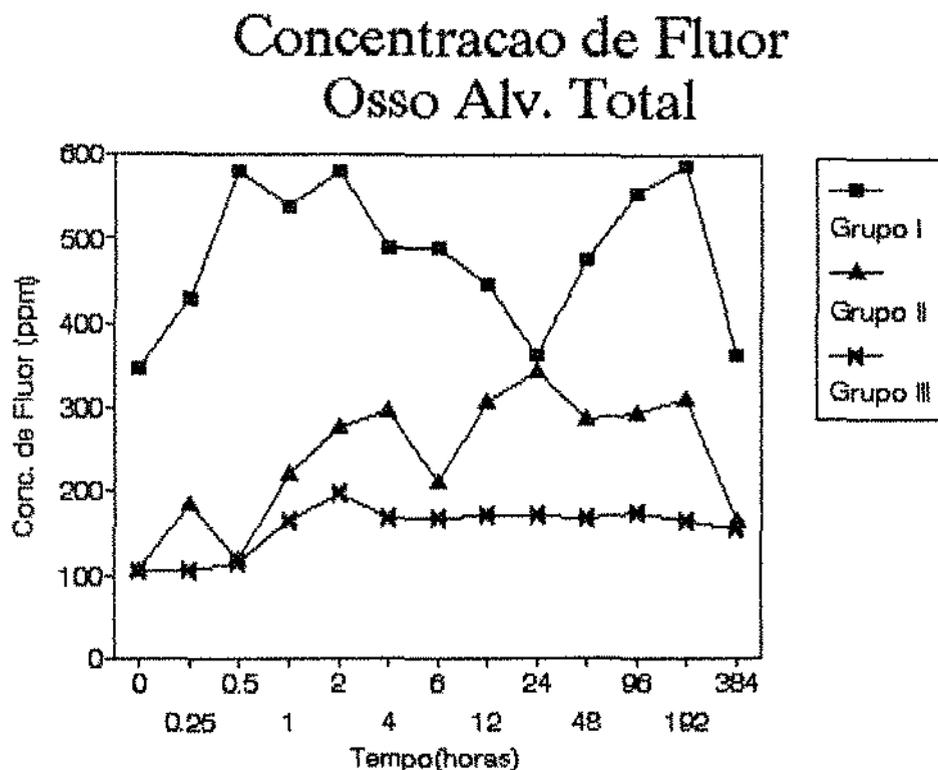


Gráfico 3 - Médias da concentração de íon flúor nas amostras de osso alveolar total, para os diferentes períodos de tempo, nos diferentes grupos.

As médias obtidas para concentração de íon flúor nas amostras de osso alveolar em contato com o esmalte jovem obtidas através de ataque ácido e osso total, foram submetidas a análise de variância, e verificou-se que todos os grupos, bem como a interação entre eles foram significativos.

Quando as médias foram submetidas ao teste de Tukey, observou-se que a maior média encontrada foi para o Grupo I, tanto nas amostras obtidas por biópsia como nas obtidas por osso total, em todos os tempos analisados.

A análise das médias também nos permitiu verificar que nas amostras obtidas na superfície, as maiores médias foram encontradas nos tempos de 4, 24 e 48 horas no grupo que recebeu água destilada durante 45 dias seguido de dose aguda, enquanto que no grupo que recebeu água fluoretada durante 45 dias seguido de dose aguda as maiores médias foram encontradas nos períodos de tempo de 1, 12 e 48 horas. Para o grupo controle as médias foram muito semelhantes entre si.

Os resultados obtidos na análise das amostras de osso total, nos mostrou que para os animais do Grupo II as maiores médias estavam no tempo de 12 e 24 horas e 8 dias. No grupo I as maiores médias foram encontradas nos tempos de 30 minutos, 1, 2 e 96 horas e 8 dias. Os resultados para o grupo controle foram semelhantes entre si.

3. Determinação da concentração de íon flúor no fêmur.

A Tabela III expressa a média da concentração de íon flúor em amostras de fêmur de ratas que receberam água fluoretada ou não (Grupos I e II) durante 45 dias e a seguir receberam a dose única assim como as médias para o grupo controle (Grupo III). A significância estatística entre os tratamentos em cada tempo está expressa na tabela (teste de Tukey).

Tabela III - Médias de concentração de íon flúor em amostras de fêmur de ratas, obtidas em diferentes períodos de tempo, nos diferentes grupos experimentais, e significância estatística (Teste de Tukey).

Períodos de sacrifício	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	I	II	III
0	1.488,94		
15'	1.588,47a	516,26b	363,95b
30'	1.577,51a	616,31b	403,23b
1 h	1.963,71a	652,76b	309,30c
2 h	1.826,63a	729,74b	323,14c
4 h	2.533,63a	1.166,96b	334,27c
6 h	2.425,59a	1.218,66b	334,27c
12 h	1.172,72a	970,48a	202,16b
24 h	2.092,19a	1.579,98a	323,71b
48 h	1.595,95a	949,00b	334,27c
96 h	1.638,81a	835,13b	263,59c
192 h	2.118,71a	875,62b	214,17c
384 h	1.670,12a	693,98b	214,17c

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de 5%.

** Resultados expressos em ppm (µg/g).

O Gráfico 4 ilustra os resultados da Tabela III.

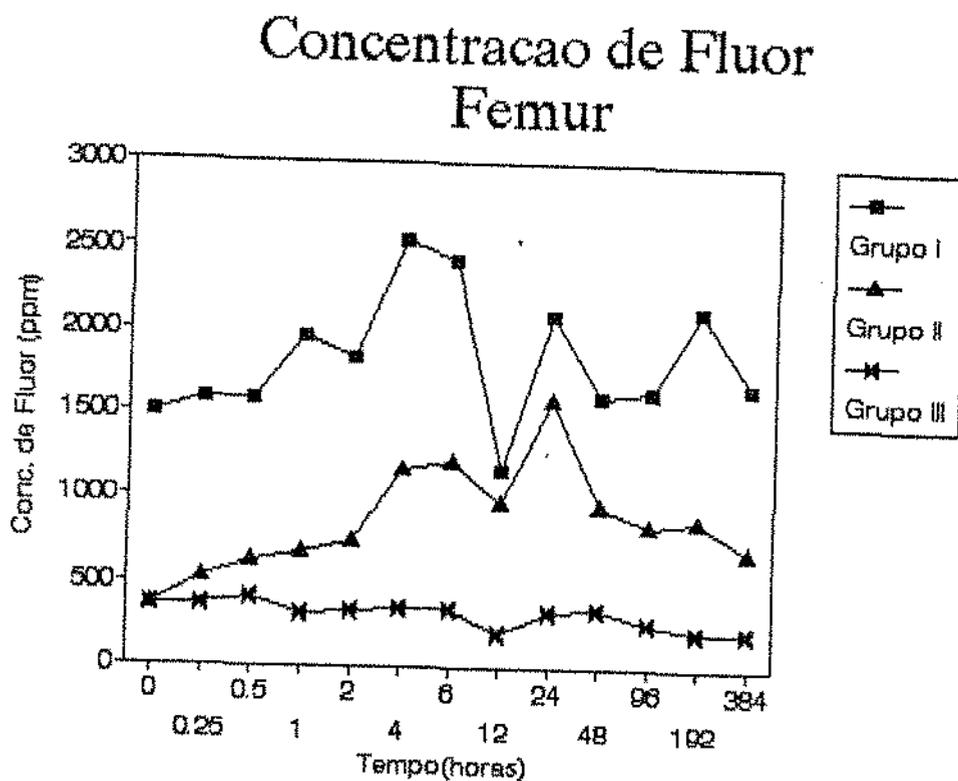


Gráfico 4 - Médias das concentrações de íon flúor em diáfise de fêmur de ratas, para os diferentes tempos de sacrifício nos diferentes grupos.

Os resultados nos permitiram verificar que as maiores médias encontradas foram para o Grupo I, seguidas das médias obtidas no Grupo II e finalmente pelas médias obtidas no Grupo III. Observou-se também através dos dados obtidos pela análise estatística que o grupo I diferiu significativamente do grupo controle em todos os períodos de tempo, o mesmo ocorrendo com relação ao Grupo II. O Grupo II só não diferiu do grupo controle nos períodos de 15 e 30 minutos.

Verificou-se também, um pico na concentração de flúor no Grupo I, no período de tempo de 4 horas. Nas amostras do Grupo II, a maior média de concentração ocorreu no período de 24 horas. Um fato a salientar, é que mesmo após 16 dias tanto o grupo I como o II apresentavam médias superiores ao período inicial e diferiam do grupo controle em nível significativo, havendo também uma diferença significativa entre o Grupo I e II.

4. Concentração de íon flúor no esmalte jovem.

A Tabela IV expressa a concentração de íon flúor em esmalte jovem de incisivos inferiores de ratas que receberam água fluoretada e destilada durante 45 dias (Grupos I e II) e a seguir a dose única. Essa tabela também expressa a média da concentração de íon flúor em ratas que só receberam água destilada durante todo o período experimental.

Tabela IV - Concentrações de flúor em pool de amostras de esmalte jovem de incisivos de ratas, obtidas sob diferentes condições experimentais e intervalos de tempo.

Grupos Experimentais	PERÍODOS DE SACRIFÍCIO												
	0	15'	30'	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	192 h	384 h
Grupo I	410,0	600,0	600,0	942,0	1.186,4	1.186,4	1.603,7	1.335,0	1.354,1	1.818,1	1.129,0	703,7	535,2
Grupo II		250,0	415,0	450,0	745,7	942,0	947,3	1.309,0	1.578,9	1.333,3	607,9	493,4	270,4
Grupo III		175,0	115,3	210,0	239,0	254,7	254,7	126,8	133,3	273,6	254,7	173,9	173,9

* Resultados expressos em ppm.

O Gráfico 5 ilustra os resultados expressos na Tabela IV.

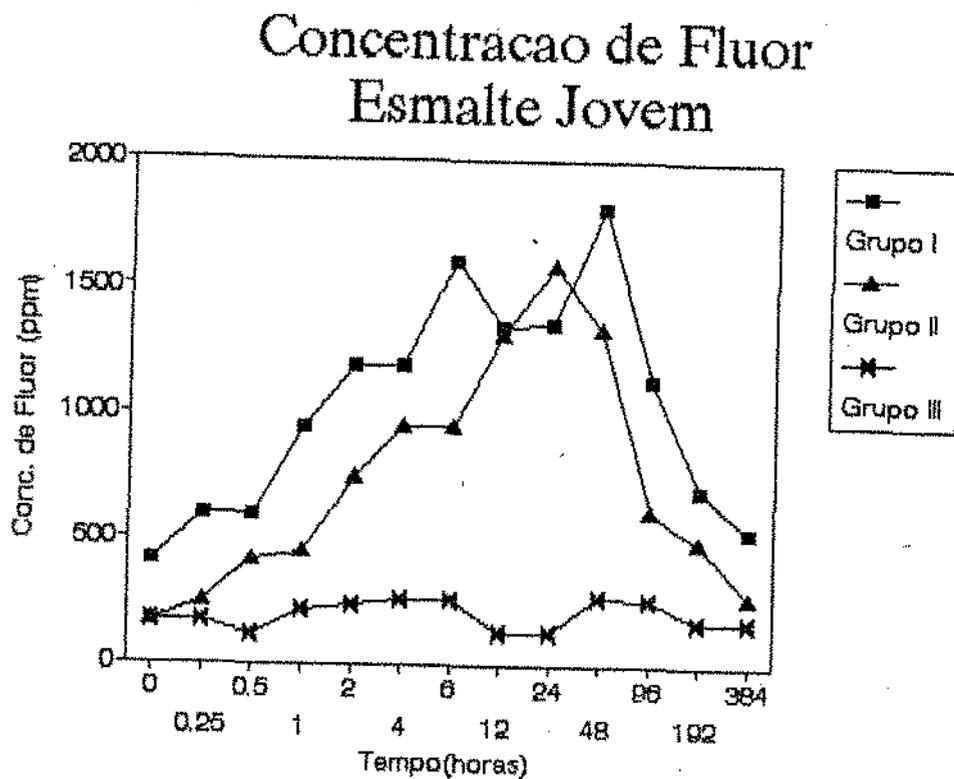


Gráfico 5 - Concentrações de flúor em pool de amostras de esmalte jovem de incisivos de ratas dos grupos I, II e III

Como foi realizada somente um pool para cada período de tempo, não foi possível realizar a análise estatística entre tempos e dados. Entretanto, foi realizada uma comparação gráfica dos teores de flúor obtidos no esmalte jovem com aqueles das amostras de osso alveolar (total e superficial) e fêmur.

Os gráficos a seguir ilustram essas comparações.

O Gráfico 6 ilustra os resultados expressos nas Tabelas II e IV para o Grupo I.

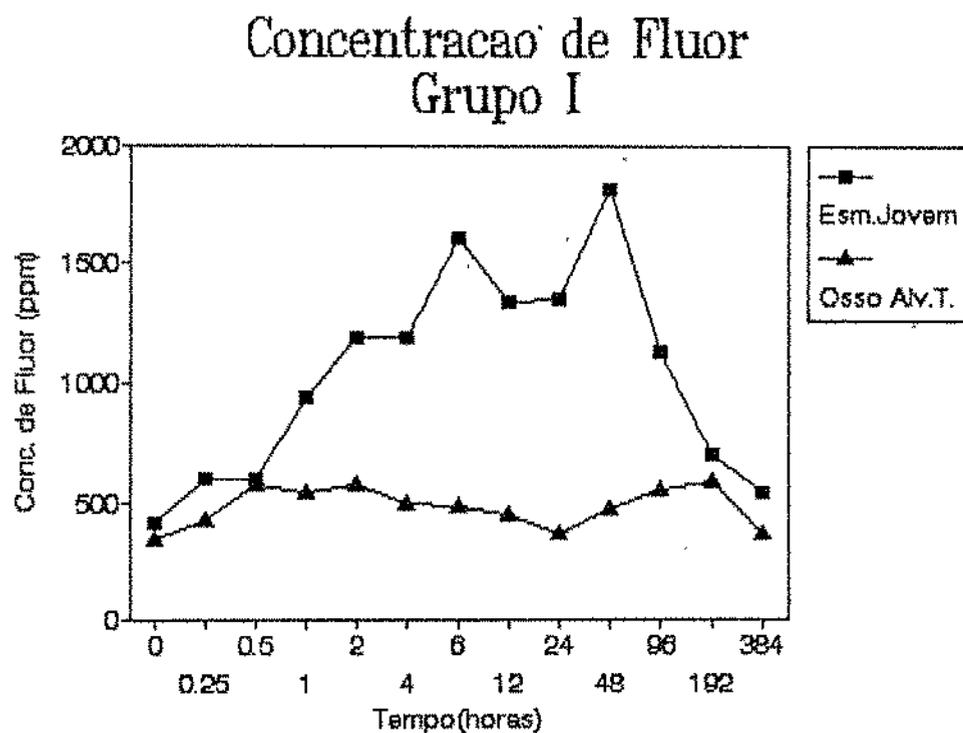


Gráfico 6 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no osso alveolar total do Grupo I.

O Gráfico 7 expressa os resultados das Tabelas II e IV para o Grupo II.

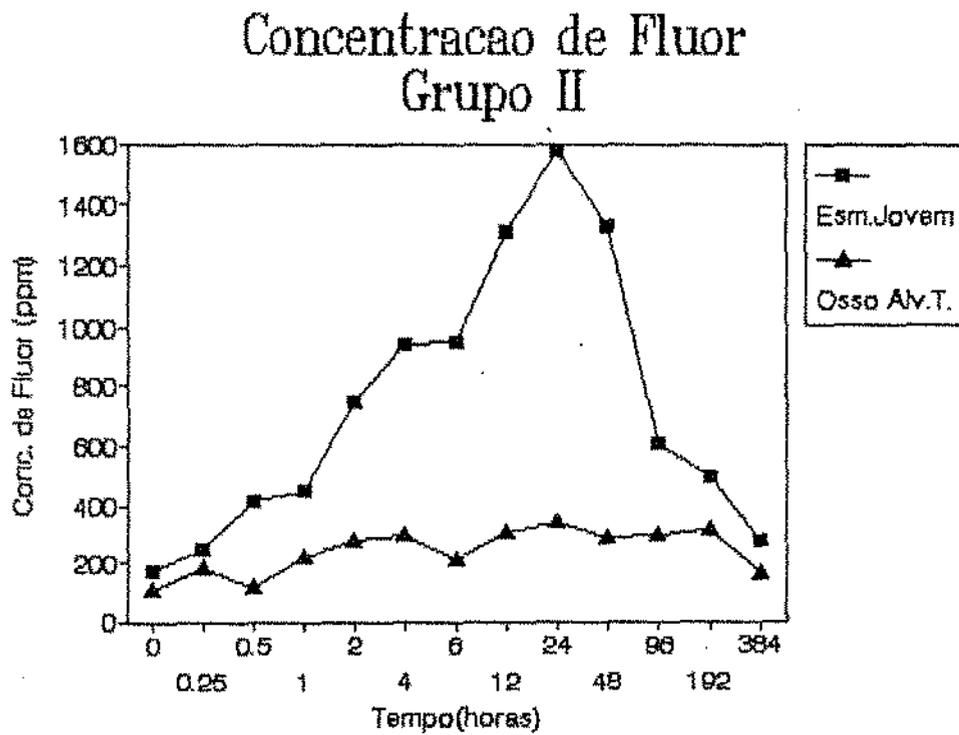


Gráfico 7 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no osso alveolar total do Grupo II.

O Gráfico 8 expressa os resultados das Tabelas II e IV para o Grupo III.

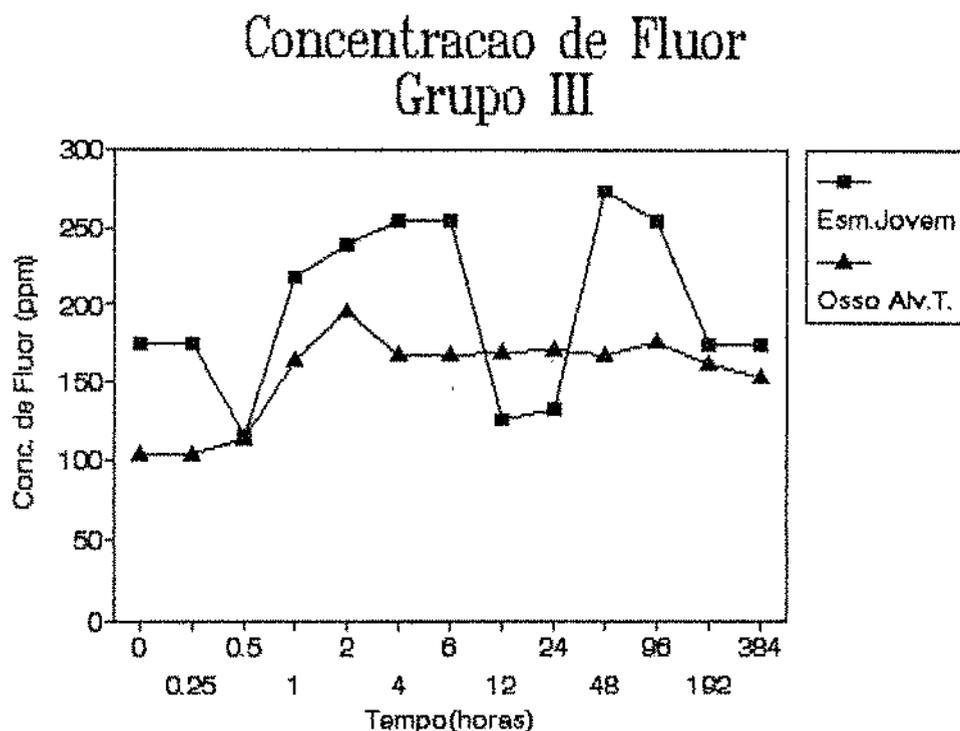


Gráfico 8 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no osso alveolar total do Grupo III.

Quando comparados os resultados da concentração de flúor determinados no osso total e no esmalte jovem de incisivos inferiores de ratas (Gráficos 6, 7 e 8), observou-se que a incorporação de flúor no osso alveolar foi inferior a do esmalte jovem dos mesmos períodos de tempo, em todos os Grupos (I, II e III). Observou-se também que após o período de 16 dias os valores da concentração de flúor tanto para o esmalte jovem como para o osso alveolar total praticamente retornaram aos valores encontrados logo após a dose de 7 mg F/kg peso, entretanto, permaneceram elevados em relação ao controle (Grupo III).

O gráfico 9 expressa os resultados das tabelas II e IV para o Grupo I.

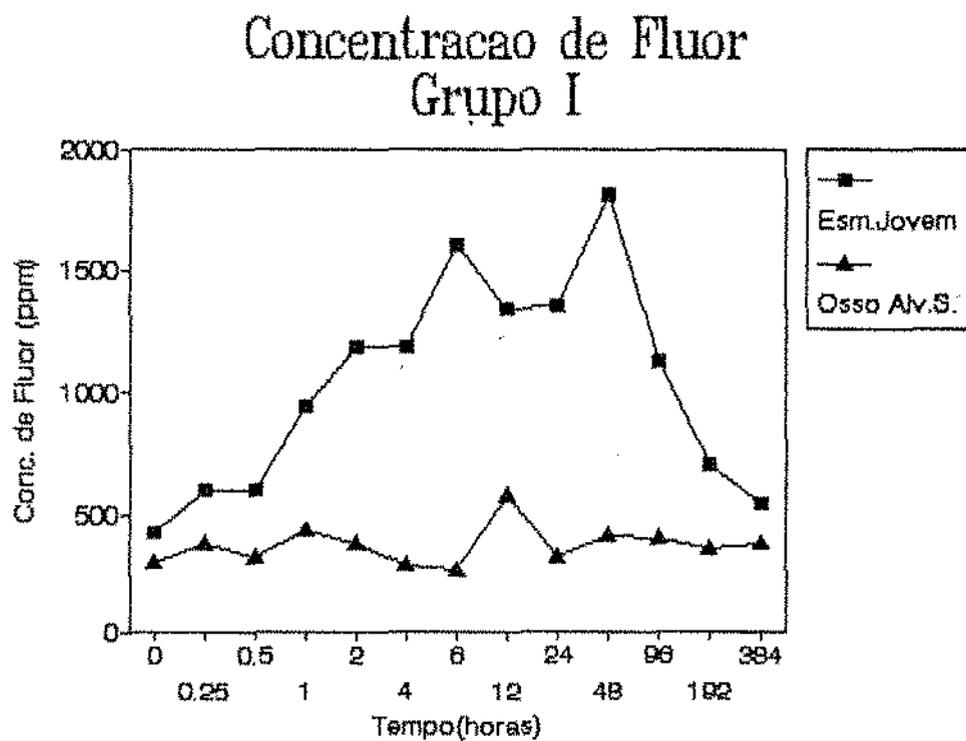


Gráfico 9 - Relação cinética entre flúor no esmalte e na superfície do osso alveolar do Grupo I.

O Gráfico 10 ilustra os resultados das Tabelas II e IV para o Grupo II.

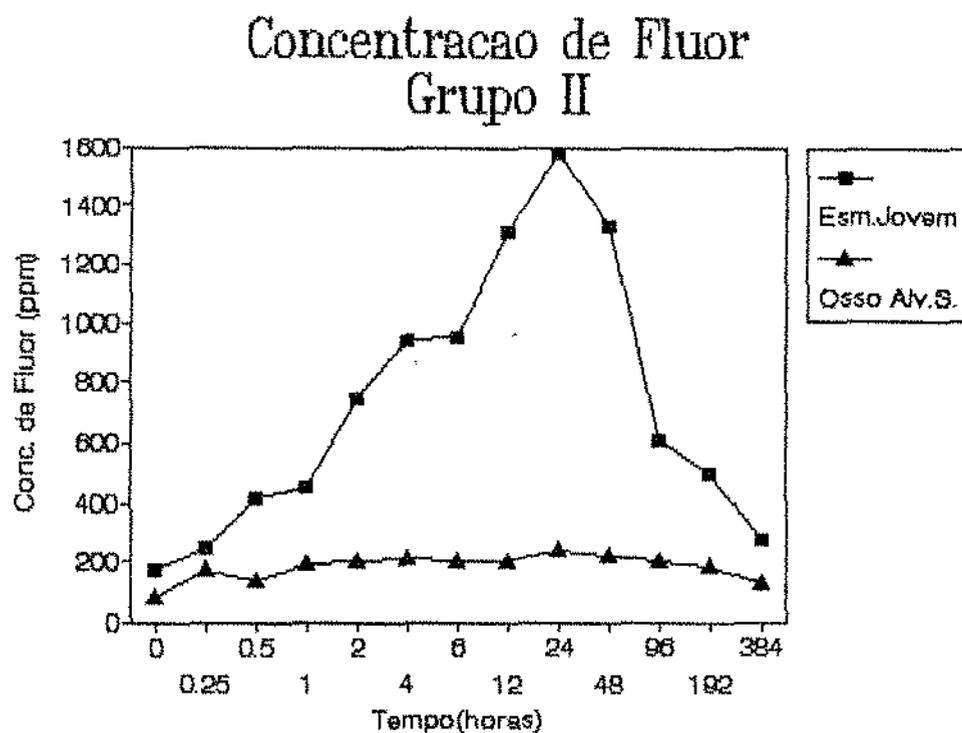


Gráfico 10 - Relação cinética entre flúor no esmalte e na superfície do osso alveolar do Grupo II.

O Gráfico II nos permitiu visualizar a comparação das médias da concentração de íon flúor expressas nas Tabelas II e IV para o Grupo III.

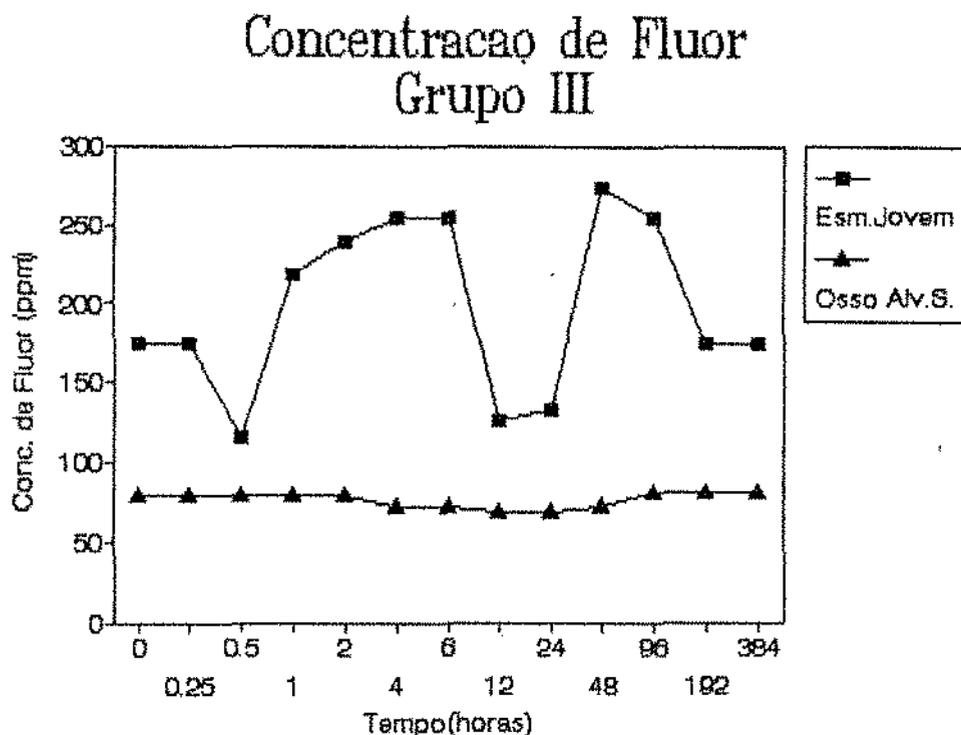


Gráfico II - Relação cinética entre flúor no esmalte e na superfície do osso alveolar do Grupo III.

Os resultados expressos nos Gráficos 9, 10 e 11 nos permitiram observar que a concentração de flúor nas amostras de esmalte jovem eram superiores as detectadas nas amostras de osso alveolar superficial. Observou-se também, após a dose aguda de flúor,, um aumento gradual da concentração no esmalte jovem tanto no Grupo I (até 48 horas), como no Grupo II (até 24 horas), quando então ocorria um decréscimo da mesma até o período de 16 dias. Entretanto, mesmo após 16 dias os valores permaneciam

superiores aos anteriores a dose única. O mesmo padrão de comportamento foi observado com relação ao osso alveolar total.

Nos gráficos 12, 13 e 14 temos a relação gráfica das médias da concentração de flúor em pool de amostras de esmalte jovem e amostras de fêmur, obtidas a partir dos Grupos I, II e III.

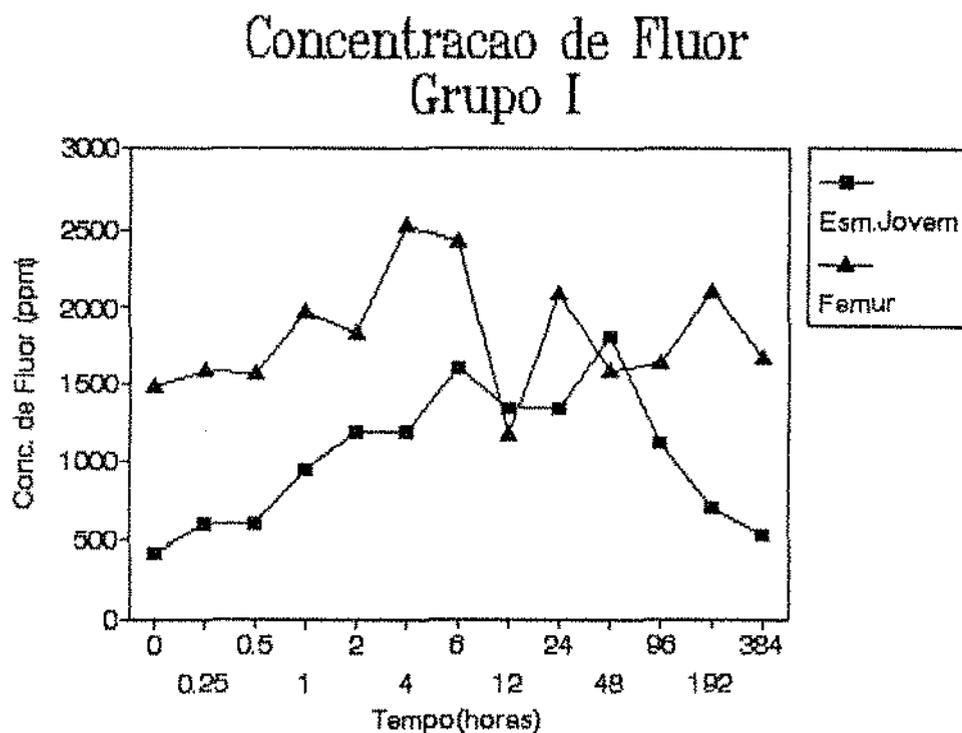


Gráfico 12 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no fêmur do Grupo I.

Concentracao de Fluor Grupo II

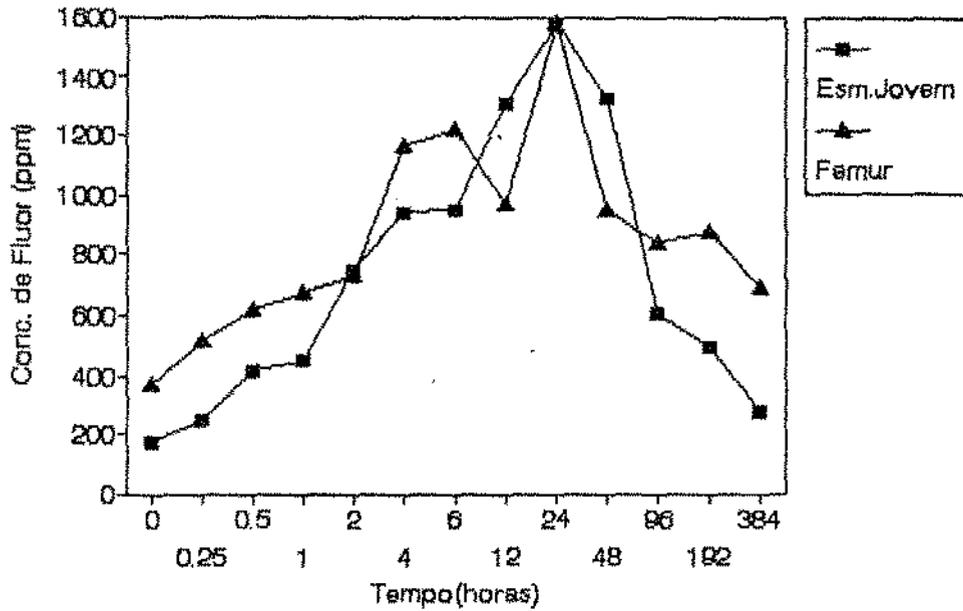


Gráfico 13 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no fêmur do Grupo II.

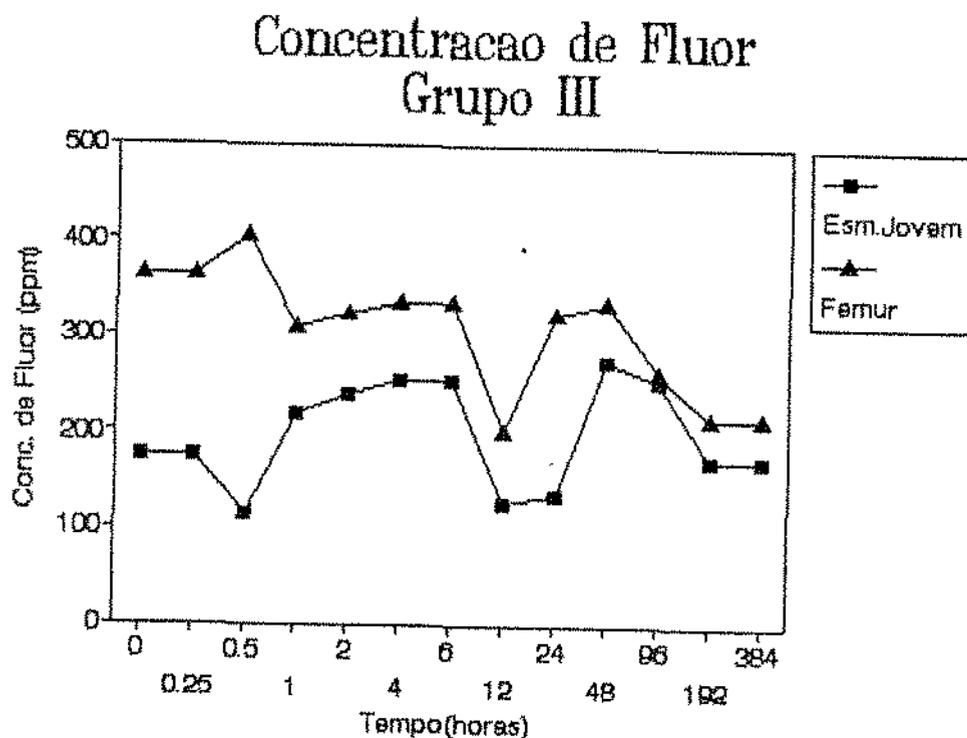


Gráfico 14 - Relação cinética entre flúor no esmalte e no fêmur do Grupo III.

Na análise dos Gráficos 12, 13 e 14, observou-se uma maior incorporação de flúor nas amostras obtidas a partir do Grupo I, tanto com relação ao esmalte jovem como em relação ao fêmur, sendo que a incorporação pelo fêmur era superior nos três grupos. Observou-se também, que mesmo após 16 dias da dose única de flúor, a concentração permanecia elevada em relação ao período inicial, tanto nas amostras de esmalte jovem como nas de fêmur nos Grupos I e II.

Os Gráficos 15, 16 e 17 ilustram a comparação das médias da concentração de flúor em pool de amostras de esmalte jovem e em plasma de ratas nos Grupos I, II e III, respectivamente.

Concentração de Flúor Grupo I

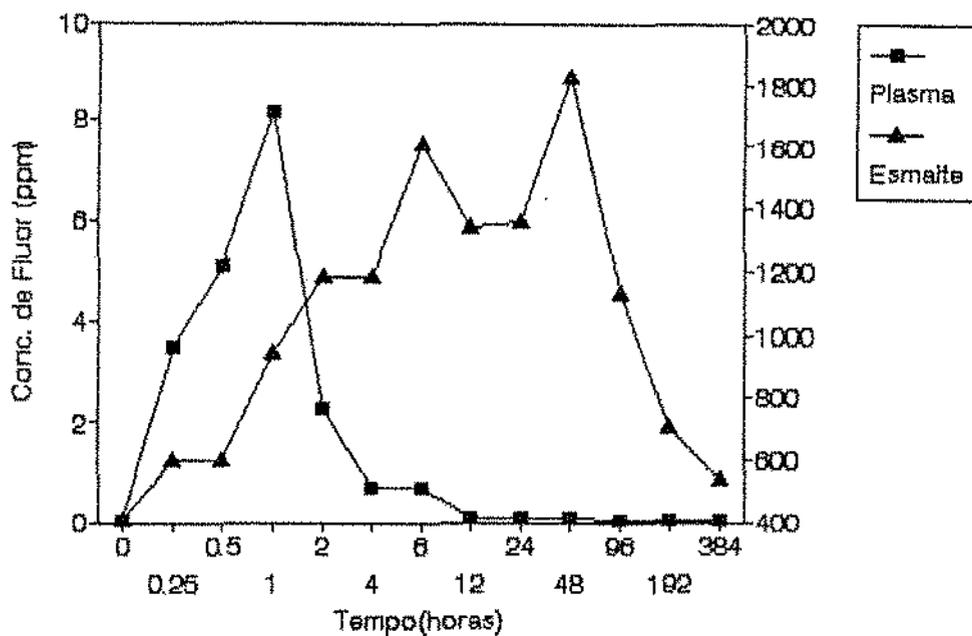


Gráfico 15 - Relação cinética entre flúor no plasma e no esmalte dos animais do Grupo I.

Concentração de Fluor Grupo II

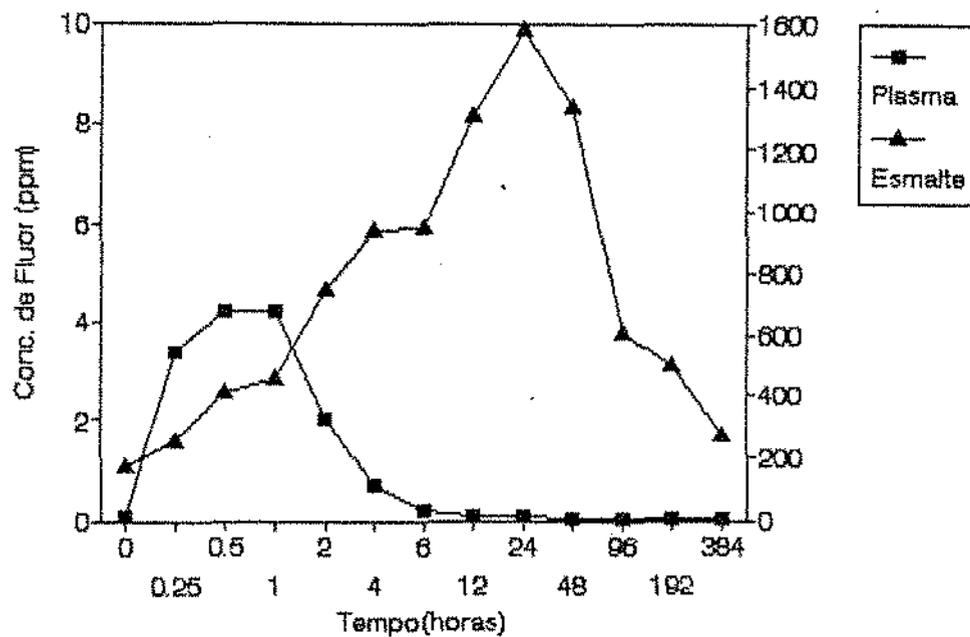


Gráfico 16 - Relação cinética entre flúor no plasma e no esmalte dos animais do Grupo II.

Concentração de Fluor Grupo III

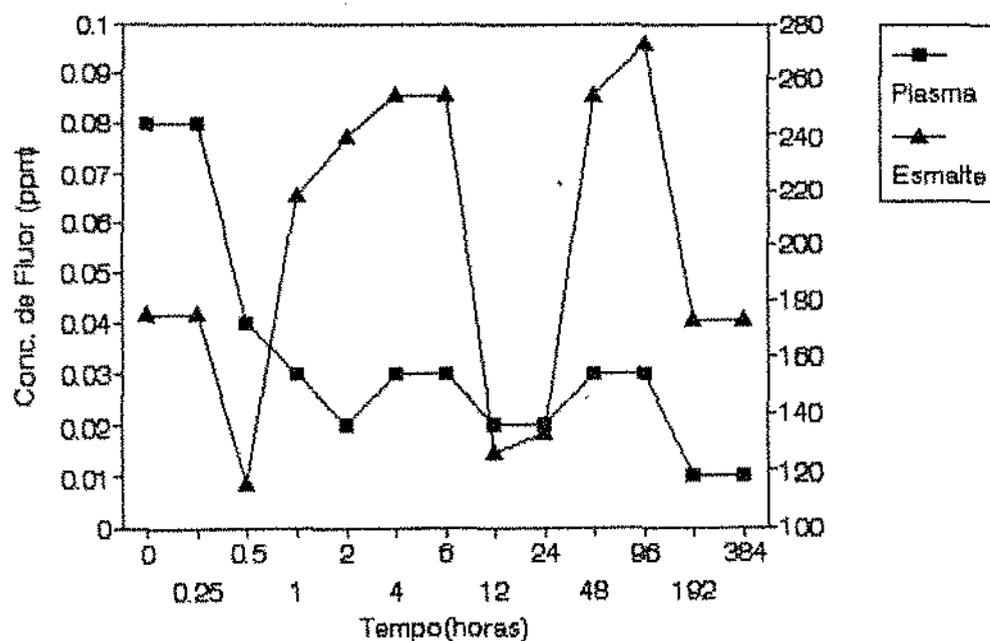


Gráfico 17 - Relação cinética entre flúor no plasma e no esmalte dos animais do Grupo III.

A análise dos Gráficos 15 e 16 nos permitiu observar que enquanto a concentração de flúor no plasma retornava aos valores basais após 12 horas da dose única, no esmalte jovem permanecia elevada a valores superiores aos iniciais mesmo após 16 dias.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho, em relação ao flúor no sangue (Gráfico 1), mostram aumento significativo da concentração circulante logo após a administração da dose. Observa-se tendência, embora nem sempre estatisticamente significativa, de maior concentração no plasma dos animais previamente expostos ao flúor (Grupo I), o que refletiria grau de saturação óssea (ISSAO & ZUCAS²⁰, 1973) em termos do conhecimento atual sobre metabolismo do flúor (CURY⁹, 1989).

A análise cinética do flúor no sangue em função do tempo após a administração da dose (Gráfico 1), mostra pico de concentração no período de aproximadamente 1 hora. Os valores da concentração máxima no plasma foram de 435,6 e 221,0 μM , respectivamente, para os animais submetidos previamente ou não ao flúor, os quais são suficientes para provocar distúrbios de formação dos esmalte, pois segundo ANGMAR-MANSSON & WHITFORD⁵, 1985, estes ocorreram quando de picos ocasionais de 10 μM . Como se observa pela curva do Gráfico 1, após aproximadamente 12 horas da administração da dose há uma redução drástica da concentração de flúor no sangue. A primeira vista, isto poderia sugerir que o

Flúor não mais influenciaria na formação do esmalte, após este período. Entretanto, quando se analisa a concentração de flúor no plasma dos animais 16 dias após a administração da dose, observa-se que elas são superiores e estatisticamente significativas em relação ao controle. As concentrações encontradas no plasma, mesmo após 16 dias de administração da dose, são de aproximadamente 3,0 μM , e portanto suficientes para provocar distúrbios no desenvolvimento do esmalte, pois segundo ANGMAR-MANSSON & WHITFORD³ (1984), níveis constantes de 1,5 μM de flúor circulantes estão também associados com alterações no esmalte dental. A razão desta concentração significativa de flúor, mesmo após este longo período, só poderia ser explicada pela concentração óssea decorrente (CURY⁹, 1989).

De acordo com ANGMAR-MANSSON e colab.², (1990), os distúrbios de formação durante o desenvolvimento do esmalte, após longos períodos de administração de flúor, seriam explicados pelo flúor liberado do osso adjacente ao órgão do esmalte. Este fato pode contribuir, entretanto os dados do presente trabalho mostram que o flúor circulante decorrente do nível ósseo de todo o organismo também tem um significado. Neste particular, enquanto alterações maiores de formação no esmalte poderiam ser esperadas logo após a dose quando da exposição prévia, tempos após alterações não estariam relacionadas ao nível circulante, e poderiam ser explicadas pela concentração local.

Deste modo, as análises de flúor no osso adjacente ao esmalte e no esqueleto como um todo poderiam fornecer subsídios para uma discussão. Ao analisar a concentração de flúor no fêmur

(Tabela III e Gráfico 4), o qual representaria o esqueleto, observou-se aumento na concentração de flúor logo após a administração da dose. Constatou-se que a concentração no osso dos animais previamente expostos ao flúor tende sempre ser maior do que dos animais não expostos, sendo estas estatisticamente superiores ao controle. O que chamou a atenção nos resultados é o relativo aos animais não expostos previamente e submetidos a dose de flúor em relação ao controle. Assim, não foram observadas diferenças significativas logo após a dose, as quais tornaram-se significantes, como um pico em torno de 24 horas após o que houve um decréscimo de concentração. Entretanto, mesmo 16 dias após a dose observou-se concentração maior e significativa em relação ao controle. Esta concentração óssea explicaria portanto o nível circulante e concomitante distúrbio de desenvolvimento do esmalte mesmo após longo período de administração de uma dose única. Por outro lado, 16 dias após não foram observadas diferenças significativas na concentração de flúor no sangue dos animais expostos previamente ou não ao flúor, embora fossem constatadas diferenças ósseas. Isto poderia ser explicado pela existência de duas formas de flúor no osso, uma lábil, ou renovável, que seria a responsável pelo nível de flúor no plasma, e uma outra fortemente ligada (HALL e colab.¹⁹, 1977).

Com relação à concentração de flúor no osso adjacente ao esmalte em formação, os dados da Tabela II e Gráficos 2 e 3, mostraram um aumento rápido de concentração logo após a administração. Cineticamente houve tendência de se atingir uma concentração máxima no período de aproximadamente 48 horas,

decrecendo daí em diante. Entretanto, mesmo após 16 dias da administração da dose, concentrações maiores e significativas em relação ao controle foram observadas. Fato a destacar é a comparação entre os resultados obtidos entre o grupo não exposto previamente e submetido a dose em relação ao controle, pois embora não tenham sido observadas diferenças significativas em relação ao osso total, a análise de flúor na superfície óssea (Tabela II) revelou significância. Isto validaria a hipótese de ANGMAR-MANSSON e colab.² (1990) de que o flúor liberado do osso imediatamente em contato com o esmalte poderia provocar distúrbio no desenvolvimento dental. Se isto é verdade, alteração maior ocorreria quando da exposição prévia, pois concentrações ósseas maiores foram observadas neste grupo (Tabela II).

A análise de flúor no esmalte (Tabela IV e Gráfico 5) e sua correspondência cinética em relação ao osso (Gráficos 6-14) forneceram dados adicionais que justificaram esta discussão.

Assim, a concentração de flúor no esmalte jovem (Tabela IV) mostrou que antes de administrar a dose, era maior nos animais expostos previamente. Logo após a administração da dose de flúor observou-se aumento (Gráfico 5) da concentração no grupo previamente exposto. No período de aproximadamente 48 horas da administração da dose ocorre um pico de concentração no esmalte. Isto reflete o nível circulante (Gráficos 15 a 17) decorrente em relação à velocidade de crescimento do dente do rato. Atingida esta concentração máxima no esmalte, observou-se após este período uma diminuição, o que reflete a diminuição rápida no sangue discutida anteriormente. Entretanto quando se analisou a

concentração de flúor no esmalte decorridos 8 a 16 dias da administração da dose observou-se que ela continuava alta, e inclusive superior ao período inicial (tempo 0). Considerando o crescimento contínuo que sofre o dente do rato (TSE e colab.³⁹, 1987), em 8 dias todo o esmalte jovem teria se renovado, portanto o flúor incorporado no esmalte no período superior a 8 dias não poderia ser explicado pelo nível sangüíneo decorrente da dose, mas sim por uma mobilização óssea geral e local. Deste modo, ao analisar a concentração de flúor no esmalte comparando os grupos previamente expostos ou não a flúor, observaram-se concentrações maiores no grupo exposto mesmo 8 e 16 dias após a dose. Considerando que neste período não existiam diferenças plasmáticas entre os dois grupos (Tabela I), temos base para sugerir que a concentração local de flúor no osso adjacente ao esmalte em formação tem grande significado. De fato, a concentração de flúor na superfície óssea adjacente ao esmalte (Tabela II) foi maior no grupo previamente exposto, o que poderia levar a uma alteração maior no desenvolvimento do esmalte.

De um modo geral, os dados do presente trabalho mostraram que o nível de flúor circulante, mesmo 16 dias após a administração de uma dose, poderia estar relacionado com distúrbios do desenvolvimento dental, o qual seria potencializado pela mobilização de flúor do osso adjacente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Concentrações circulantes de flúor mesmo após 16 dias de administração de uma dose, podem estar relacionadas com distúrbios de desenvolvimento do esmalte.

2. Flúor liberado do osso adjacente ao esmalte em desenvolvimento, estaria envolvido com o agravamento de alterações na formação do esmalte.

RESUMO

RESUMO

Tem-se observado nos últimos anos um aumento da prevalência de fluorose dental em populações, que estão consumindo ou não água fluoretada. O mecanismo pela qual o flúor provoca esta alteração no esmalte é desconhecido, e até pouco tempo atrás era atribuído ao alto nível circulante no organismo. Recentemente, esta alteração, também tem sido atribuída à concentração de flúor no osso adjacente ao esmalte, que seria responsável por distúrbios, mesmo decorrido algum tempo após a administração de doses únicas. Assim, o objetivo deste trabalho, foi tentar colaborar no sentido de validar ou não esta hipótese. Para tal, 186 ratas de 60 dias de idade foram submetidas a uma dose única, intraperitoneal, de 7,0 mg F/kg. De tempos em tempos, e por até 16 dias, 04 animais de cada grupo, foram sacrificados para a análise de: a) flúor no plasma; b) flúor no esmalte jovem; c) flúor no osso (fêmur e mandíbula). As análises de íon flúor foram feitas com eletrodo específico Orion 96-09. Os resultados mostraram correspondência cinética entre os aumentos da concentração de flúor no sangue, e as concentrações no esmalte e osso imediatamente após a administração da dose única. Foi

observado, sempre uma tendência de concentrações maiores, no grupo de animais previamente expostos ao flúor. Também se observou que, mesmo 16 dias após a administração da dose, os níveis de flúor no esmalte estavam significativamente aumentados, o que pode ser explicado pelas concentrações ósseas, já que estas também continuavam significativamente altas após 16 dias da dose única. Concluiu-se, a partir dos resultados, que os níveis de flúor nos ossos em geral contribuem para manter um nível de flúor circulante significativo, o qual em acréscimo ao flúor liberado do osso adjacente ao esmalte, seriam os responsáveis pelas alterações que possam ocorrer durante o desenvolvimento dental.

SUMMARY

SUMMARY

In recent years increasing dental fluorosis has been observed in populations which are drinking or not as fluoridated water. The process by which fluoride causes such enamel alteration is unknown, and until recently it was ascribed to the high fluoride level circulating in the body. In recent times such alteration has also been ascribed to the fluoride concentrations in the bone adjacent to the enamel organ, which is thought to be responsible for disturbances even after some time from the administration of single doses. Thus the aim of this work was to try to cooperate toward either validation or confutation of this hypothesis. For this purpose, 186 60-day-old female rats that had previously ingested or not water 10,0 ppm F were given a single intraperitoneal dose of 7,0 mg F/kg body weight. From time to time for a period of up 16 days, 4 animals from each dosage group were sacrificed for analysis of: a) fluoride in plasma; b) fluoride in young enamel; c) fluoride in bones (femur and mandible). Analysis of the fluoride ion were made by means of specific Orion 96-09 electrode. The data showed kinetic correspondenve between the increased fluoride concentration in

blood and the concentration in enamel and bone immediately after administration of the single dose. A tendency toward higher concentration has always been observed in the group of animals previously exposed to fluoride. It has also been observed that, even 16 days after the administration of the dose, the enamel F levels were significantly increased, which can be accounted for by bone concentration in as much as these also were found to remain significantly high after 16 days from the single dose. The results obtained led to the conclusion that the bone levels contribute to maintaining significant circulating F level, which in addition to fluoride released from the bone adjacent to the enamel organ, would be responsible for the alterations that may occur during the dental development.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 01 - AASENDEN, R., PEEBLES, T.C. Effects of fluorid supplementation from birth on human deciduous and permanent teeth. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v.19, n.4, p321-326, Apr. 1974.
- 02 - ANGMAR-MANSSON, B., LINDH, V., WHITFORD, G.M. Enamel and dentin fluoride levels and fluorosis following single fluoride doses: a nuclear microprobe study. *Caries Res.*, Basel, v.24, n.4, p.258-262, July/Aug. 1990.
- 03 - _____, WHITFORD, G.M. Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. *Caries Res.*, Basel, v.18, n.1, p.25-32, Jan./Feb. 1984.
- 04 - _____, _____. Plasma fluorid levels and enamel fluorosis in the rat. *Caries Res.*, Basel, v.16, n.4, p.334-339, July/Aug. 1982.
- 05 - _____, _____. Single fluoride doses and enamel fluorosis in the rat. *Caries Res.*, Basel, v.19, n.2, p.145-152, Mar/Apr. 1985.
- 06 - ARMSTRONG, W.D. Mechanisms of fluoride homeostasis. *Archs Oral Biol.*, Oxford, v.4, p.156-159, 1961. *ÅsupplementA*.
- 07 - BURT, B.A. The changing patterns of sistemic fluoride intake. *J. dent. Res.*, Washington, v.71, n.5, p.1228-1237, May, 1992.
- 08 - CHURCHILL, H.V. Occurence of fluoride in some waters of the United States. *Indian east. Chem.*, London, v.23, n. ,p.996-999, 1931.
- 09 - CURY, J.A. Uso do flúor. *In: BARATIERI, L.N. et al. Dentística: procedimentos preventivos e restauradores.* São Paulo: Quintessence, 1989 cap.2, p.43-67.

* De acordo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaçara dos periódicos conforme o World List of Scientific Periodicals.

- 10 - D'ANGELO, N. Segurança da aplicação tópic de flúor em gel. Piracicaba, 1991. ATeses (Doutoramento) - FOPÅ. Universidade Estadual de Campinas, 1991.
- 11 - DEAN, H.T., ARNOLD, F.A., ELVOVE, E. Domestic water and dental caries. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children aged 12-14 years, of 13 cities, in 4 states. Publ. Hlth, Rep., Washington, v.57, n. , p.1155-1179, , 1942.
- 12 - _____., McKAY, F.S., _____. Method enamel survey of Bauxite, Ark., ten years after a change in the public water supply. Publ. Hlth, Rep., Washington, v.53, n. , p.1736-1748, , 1938.
- 13 - DENBESTEN, P.K., THARIANI, H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of sistemic exposure of fluoride with respect to fluorosis. J. dent. Res.. Washington, v.71, n.5, p.1238-1243, May, 1992.
- 14 - EKSTRAND, J. A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. Calcif. tiss. Res., Berlin, v.23, n.3, p.225-228, , 1977.
- 15 - _____., SPACK, C.J. VOGEL, G. Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. J. dent. Res., Washington, v.69, p.550-555, Feb. 1990. ASpecial IssueÅ.
- 16 - ERICSSON, Y. Influence of sodium chloride and fluoride reactions with dental tissues. Caries Res., Basel, v.16, n.4, p.287-297, July/Aug. 1982.
- 17 - FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A. LARSEN, M.J. Clinical and structural festures and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. Scand. J. dent. Res., Copenhagen, v.85, n.7. p.510-534, 1977.
- 18 - FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. J. biol. Chem., Baltimore, v.65, n. , p.375, 1955.
- 19 - HALL, L.L., SMITH, F.A., HODGE, H.C. Kinetic model of fluoride metabolism in the rabbit. Envir. Res., , v.13, n. , p.285-302, 1977.
- 20 - ISSAO, M. ZUCAS, S.M. Influência do período e tempo de ingestão de flúor pela rata na cessão ao rato recém-nascido. Revta Fac. Odont. Univ. S. Paulo, São Paulo, v.11, n.2, p.299-308, jul/dez. 1973..
- 21 - JENKINS, G.N. The physiology and biochemistry of the meuth. 4 ed. London: Black Well, 1978.

- 22 - KEENE, H.J., CATALONATTO, F.A., MICKEL, G.J. Prevalence of cariesfree in recruits from cities with fluoride and non fluoridated water supplies. *J. dent. Res.*, Washington, v.56, n.4, p.704, July/Aug. 1976.
- 23 - KEMPF, G.A., MCKAY, F.S. Mottled enamel in a segregated population. *Publ Hlth, Rep.*, Washington, v.45, n. . p.2923-2940, 1930.
- 24 - LINDEMANN, G. Pigment alteration and other disturbance in rat incisors enamel in chronic fluorosis and in recovery. *Acta odont, scand.*, Oslo, v.25, n.5, p.525-539, Dec. 1967.
- 25 - MAGALHÃES, D., MATHEUS, G., MARTINELLI, C. Administração de doses excessivas de flúor em ratas prenhes e seu efeito sobre o maxilar e dentes dos filhotes. *Arq. Dent. Est. Cur. Odont.*, , v.15, n. , p.113-121, , 1978.
- 26 - MELLBERG, J.R. Penetration of fluoride from sodium monofluorophosphate into artificially produced incipient enamel lesions. *Caries Res.*, Basel, v.14, n.2, p.115-120, Mar. 1980.
- 27 - MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. New York: John Wiley 1976. 418p.
- 28 - MYERS, H.M. Dose-response relationship between water fluoride levels and the category of questionable dental fluorosis. *Commun. dent. oral Epidemiol.*, Copenhagen, v.11, n.2, p.109-112, Apr. 1983.
- 29 - NELSON, D.G.A., *et al.* Proton microprobe determination of fluoride profiles in the enamel and dentine of erupting incisors from sheep given low and higher daily doses of fluoride. *Archs oral. Biol.*, Oxford, v.34, n.6, p.419-429, June, 1989.
- 30 - NEWBRUN, E. Fluorides and dental caries. 3.ed. Springfield: Charles Thomas, 1986. cap.8, p.217.
- 31 - NEWMAN, W.F., NEWMAN, M.W. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago: University of Chicago, 1958, p.81-100.
- 32 - PENDRYS, D.G., STAMM, J.W. Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. *J. dent. Res.*, Washington, v.69, p.529-538, Feb. 1990. *ASpecial IssueA*.
- 33 - ROBINSON, C., KIRKHAM, J. Effects of fluoride on the developing mineralized tissues. *J. dent. Res.*, Washington, v.69, p.653-659, Feb. 1990. *ASpecial IssueA*.

- 34 - RUSSEL, A.L. Dental fluorosis in Grand Rapids during the seventeenth year of fluoridation. J. Am. dent. Ass., Chicago, v.65, n.5, p.608-612, Nov. 1962.
- 35 - SINGER, L., ARMSTRONG, W.D. Relation between the fluoride content of rat calcified tissues. J. dent. Res., Washington, v.48, n.5, p.947-950, Sept/Oct. 1969.
- 36 - _____, _____. Regulation of human plasma fluoride concentration. J. appl. Physiol., Washington, v.15, n.3, p.508-510, _____, 1960.
- 37 - SUCKLING, G.W., NELSON, D.G.A., PATEL, M.J. Macroscopic appearance and scanning electron microscopic and hardness values of development defects in human permanent tooth enamel. Adv. dent. Res., Washington, v.3, n.2, p.219-233, Sept. 1989.
- 38 - SZPUNAR, S.M. & BURT, B.A. Trends in the prevalence of dental fluorosis in the United States: a review. Hlth, Dent., Richmond, v.47, n.2, p.71-79, Spring, 1987.
- 39 - TSE, M.C.P., *et al.* The effects of cerebral hemedecortication on the eruption rats and uptake of (³H) glycine by the periodontal ligament of the rat incisor. Archs oral. Biol., Oxford, v.33, n.8, p.605-611, Aug. 1988.
- 40 - WEATHERELL, J.A., *et al.* Assimilation of fluoride by enamel throughout the tooth. Caries Res., Basel, v.11, n.85-115, 1977. ASupplement 1A.
- 41 - WETHERILL, G.B. Regression analysis with applications. Cambridge, University Printing House, 1986. 311p.
- 42 - WÖLTGENS, J.H., *et al.* Use of fluoride by young children and prevalence of mottled enamel. Adv. dent. Res., Washington, v.3, n.2, p.177-182, Sep. 1989.
- 43 - ZIPKIN, I. Mobilization of fluoride from the bones and tooth of growing and mature rats. Archs oral Biol., Oxford, v.17, n.3, p.479-494, Mar. 1972.