

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRAICIABA**

**EFEITOS DO FLÚOR NO  
METABOLISMO  
GLICOLÍTICO DO GERME  
DENTAL DE RATO**

**ADRIANA MARIA BRUNO COSTA**

**PIRACICABA  
1995**

**P18e**

**30239/BC**

**ADRIANA MARIA BRUNO COSTA**

**EFEITOS DO FLÚOR NO  
METABOLISMO  
GLICOLÍTICO DO GERME  
DENTAL DE RATO**

Tese apresentada na Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do Grau de MESTRE  
em Ciências, área de Fisiologia e Biofísica  
do Sistema Estomatognático.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinheiro**  
Prof. Titular Doutor Aposentado do Departamento de Bioquímica da Faculdade  
de Odontologia de Bauru - USP

PIRACICABA  
1995

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar foi  
arquivado  
conforme resolução  
Piracicaba, 29 de Janeiro de 97  
CCPG-036/83

*Carla*

415504

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P18e
V.	Es.
TEMPO BC/	30 239
PROC.	281 92
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/05/97
N.º CPD	

CM-00099454-3

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

P18e

Palma, Adriana Maria Bruno Costa Hinds de.

Efeitos do flúor no metabolismo glicolítico do germe dental de rato / Adriana Maria Bruno Costa Hinds de Palma. - Piracicaba : [s.n.], 1995.

82f. : il.

Orientador : Carlos Eduardo Pinheiro.

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Flúor. 2. Dentes - Bacteriologia. 3. Metabolismo. 4. Rato como animal de laboratório. I. Pinheiro, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 546.731

- 617.63

- 591.133

Índices para o Catálogo Sistemático

- |                           |         |
|---------------------------|---------|
| 1. Flúor                  | 546.731 |
| 2. Dentes - Bacteriologia | 617.63  |
| 3. Metabolismo            | 591.133 |

***Banca Examinadora***

*Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinheiro*  
*Prof<sup>a</sup>. Dra. Ethel Lourenze Barbosa Novelli*  
*Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda*

*Aos meus queridos pais, **Rubens e**  
**Maria Thereza**, as pessoas mais  
especiais e luminosas da minha vida,  
pelo amor, carinho, incentivo e  
confiança no meu esforço e  
competência,*

*dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinheiro, pela valiosa orientação, confiança e disponibilidade que sempre demonstrou.*

*Ao meu noivo **Rafael** pela compreensão, paciência, amor e carinho dedicado à mim, ontem, hoje e sempre.*

*Te amo demais, obrigada.*

*Ao meu futuro sogro, **José Fernando dos Guaranys**, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me e avaliando-me, além de ter possibilitado de forma decisiva o meu ingresso à Informática cedendo-me um computador para a realização deste trabalho. Mais uma vez, o meu mais profundo agradecimento.*

*À minha futura sogra, **Selma Hinds**, uma mistura de mãe e amiga, e um grande exemplo de mulher, agradeço por todo o carinho, apoio e confiança sempre presentes.*

*As minhas irmãs, **Silvana e Fabiana**, por estarem sempre presentes e pelo valioso apoio que sempre recebi de vocês, obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao* Prof. Dr. **José Dias Sobrinho**, Pró Reitor do Programa de Pós-Graduação, pela dedicação à pesquisa.

*Ao* Prof. Dr. **José Ranalli**, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo seu compromisso com esta Instituição de ensino.

*Ao* Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo**, Coordenador da Comissão de Pós-Graduação, pela valiosa contribuição à FOP-UNICAMP.

*Ao* Prof. Dr. **Alcides Guimarães**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, merecedor do reconhecimento pela dedicação sempre demonstrada ao nosso departamento.

*A* Profa. Dra. **Maria Cecília Ferraz de Arruda**, pela amizade, incentivo e pelos importantes ensinamentos teóricos que muito ajudaram para a realização deste trabalho.

*Ao* Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury**, pela orientação, disponibilidade, amizade e pelo fornecimento de materiais imprescindíveis para a realização desse trabalho.

**Ao Prof. Dr. Décio Teixeira**, pela amizade e estímulo dado para o meu ingresso na pesquisa.

**À Profa. Dra. Ethel Lourenze B. Novelli**, pela amizade e pelo apoio dado durante a realização desse trabalho através do fornecimento de ratos do Biotério do Instituto de Biologia do Dep. de Química da UNESP - Botucatu.

**Aos Srs. Carlos Alberto Feliciano e Alfredo**, pelo apoio técnico e por todos os momentos de descontração durante a realização da etapa experimental deste trabalho.

**Às Secretárias Shirley R. Sbravatti e Mires C. Recchia**, pelo enorme carinho com que sempre me trataram e pela competência dispensada aos assuntos da P.G..

**Ao Prof. Márcio Lopes**, pela amizade e imensa disponibilidade demonstrada sempre que solicitei sua colaboração.

**Ao Marcos A. Rapetti**, do Departamento de Radiologia pela disposição em me ajudar todas as vezes em que me "enrolava" com o computador.

**Ao Ronaldo, Heloísa, Sueli e Luciana**, da Biblioteca da FOP, pelo carinho sempre presente, colaboração e dedicação.

**À** Amiga **Lúcia Helena dos Reis Freire**, pessoa iluminada que é, agradeço pela amizade, carinho e incentivo e pela fotografia de todos os slides confeccionados para este trabalho.

**Às** Amigas **Astrid M. T. Ferreira, Claudia H. Tambelli e Viviane Fusco**, pela enorme amizade, paciência, atenção e apoio presentes nos momentos mais difíceis desta etapa da minha vida. Obrigada.

**Ao** Tio **Luiz Gonzaga** e Tia **Miriam**, pelo amor com que abriram as portas de sua casa num momento decisivo desta minha caminhada.

**A** todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## **CONTEÚDO**

<i>RESUMO</i> .....	2
<i>ABSTRACT</i> .....	4
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	6
<i>REVISÃO DA LITERATURA</i> .....	11
<i>PROPOSIÇÃO</i> .....	23
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	25
<i>RESULTADOS</i> .....	35
<i>DISCUSSÃO</i> .....	62
<i>CONCLUSÕES</i> .....	72
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	74
<i>GLOSSÁRIO</i> .....	81

## ***RESUMO***

O flúor foi identificado como um ativador da adenilciclase, fato que levou à formulação do presente trabalho. Este, teve como objetivo, analisar os efeitos do flúor no metabolismo glicolítico do germe dental de ratos, o qual está relacionado com a atividade da adenilciclase. Para tanto foram utilizados germes dentais de ratos de oito dias, os quais foram submetidos aos tratamentos com fluoreto de sódio (NaF), monofluorfosfato de sódio (MFP Na) e fluoraluminato ( $\text{AlF}_4^-$ ). Esses experimentos foram conduzidos *in vitro* e *in vivo*. Um grupo experimental complementar foi formado com o intuito de avaliar a ação do flúor na ausência do alumínio. Para tanto, foi acrescentado às soluções, o EDTA que age quelando o íon alumínio. Essa etapa do trabalho foi conduzida *in vitro*. O metabolismo glicolítico foi avaliado através da produção de ácido láctico. Os resultados mostraram que o flúor diminuiu a produção de ácido láctico, ou seja, inibiu o metabolismo glicolítico. O composto que melhor caracterizou esta inibição foi o  $\text{AlF}_4^-$ . O MFP Na não alterou a produção de lactato. A adição de EDTA aboliu o efeito inibitório do flúor no metabolismo glicolítico.

***ABSTRACT***

**F**luoride was identified as an activator of adenylate cyclase. The aim of the present work was to verify its effects on glycolitic metabolism of rat tooth germ, which is related to adenylate cyclase activity. Eight-days old rat germs were submitted to treatments with, sodium fluoride (NaF), sodium monofluoridephosphate (Na MFP) and fluoroaluminate ( $\text{AlF}_4^-$ ). The experiments were carried on *in vitro* and *in vivo*. In order to evaluate the influence of fluoride in absence of aluminum, another group was formed using EDTA as a chelating agent of aluminum ions. This was an only *in vitro* experiment. Glycolitic metabolism was measured by lactate production. The results showed that fluoride decreased acid production, therefore it had inhibited glycolitic metabolism. The compound that best showed this inhibition was  $\text{AlF}_4^-$ . Na MFP didn't influence acid production. Addition of EDTA abolished fluoride inhibitory effect on glycolitic metabolism.

## ***INTRODUÇÃO***

**O** flúor tem despertado nestes últimos cinquenta anos, grande interesse odontológico devido a constatação da sua eficácia como meio complementar para o êxito no controle da cárie dental.

**O** flúor vem sendo utilizado sob várias formas, administrado por via sistêmica e tópica. Para que o seu uso seja racional deve-se conhecer o seu mecanismo de ação e os seus efeitos.

Até pouco tempo atrás, pensava-se que a incorporação de flúor no esmalte era o mecanismo responsável pela ação cariostática desse elemento, concedendo-se então, grande ênfase ao tratamento com flúor sistêmico. Atualmente sabe-se que o flúor age de forma dinâmica quando presente nos fluidos orais interferindo no processo de desmineralização e remineralização do dente.

Assim, o uso sistêmico do flúor, continua sendo de grande importância no combate à cárie

pois quando se ingere água fluoretada, o flúor entra em contato com os dentes e depois de deglutido, é absorvido pelo estômago retornando à cavidade oral através da saliva e fluido gengival, mantendo-se constante no meio bucal.

A hipomineralização do esmalte induzida pelo flúor, ou seja, a fluorose dental, ocorre principalmente devido ao uso inadequado do flúor sistêmico, durante a maturação do esmalte, onde sua concentração apresenta-se acima daquela considerada ideal para a prevenção de cáries. Entretanto o mecanismo envolvido no desenvolvimento da fluorose é pouco conhecido. Não está claro se essa alteração está relacionada aos produtos de secreção dos ameloblastos ou à fase mineral e, ainda, qual o estágio da amelogênese seria o mais sensível à ação do flúor.

Estudos realizados em ratos, mostram que durante a diferenciação celular e formação do dente, a taxa de consumo energético é muito alta e a nível celular ocorrem várias alterações metabólicas para suprir essa demanda. No tecido calcificado, o metabolismo de carboidratos realiza-se com predominância da via glicolítica, provavelmente devido à baixa concentração de oxigênio molecular do meio e ao número reduzido de mitocôndrias nas células formadoras nesse tecido. Nos germes dentais, onde estão presentes diferentes tipos celulares, pertencentes ao órgão do esmalte, dentina e papila

dentária, o metabolismo observado é resultante da atividade metabólica de cada tecido.

O flúor tem despertado grande interesse biológico pela sua capacidade de ativar a proteína G. Essa proteína funciona como intermediária na transmissão de sinais que envolvem receptores e efetores da membrana plasmática. Uma das funções reguladas pela proteína G é a ativação e a inibição do sistema adenilciclase que por sua vez está diretamente relacionada com o processo glicolítico, responsável pela produção de energia no interior da célula. A proteína G é regulada pela associação do GTP (guanosina trifosfato) com uma de suas subunidades (subunidade  $\alpha$ ). O flúor parece interferir neste processo, interagindo no sítio de ligação GTP-proteína. Essa interação do flúor com a proteína G depende, segundo os conceitos atuais, do tipo de composto molecular em que se encontra o flúor, isto é, se na sua forma iônica ou de complexo.

Recentemente tem sido demonstrado que o composto de flúor mais ativo na interação com a proteína G é o  $\text{AlF}_4^-$  (fluoraluminato). Esse composto, pelas suas características moleculares assemelha-se muito ao grupo  $\gamma$  fosfato da molécula do GTP (guanosina trifosfato), possibilitando assim a sua interação com a proteína G.

Considerando a importância do flúor na prevenção da cárie dentária e na ocorrência da fluorose

dental, propusemo-nos à realizar esse trabalho, com o objetivo de verificar a influência de diversos compostos fluoretados (iônico, ionizável e complexo) no metabolismo glicolítico do germe dental de rato *in vivo* e *in vitro*.

***REVISTA DA LITERATURA***

*D*urante os primeiros estudos da adenilciclase, o flúor foi identificado como estimulador da atividade dessa enzima, mas o mecanismo dessa ativação permaneceu sem respostas (**RALL & SUTHERLAND, 1958**).

**ALLMANN et al (1975)**, verificaram que ratos tratados com NaF ou SnCl<sub>2</sub>, apresentaram uma acentuada diminuição da atividade da piruvato desidrogenase no fígado, da concentração de piruvato e da relação NAD/NADH, assim como um aumento na excreção de AMPcíclico, sugerindo que estes compostos teriam ativado a adenilciclase, responsável por esses efeitos.

Já em **1976, GUO & MESSER**, determinaram algumas propriedades das ATPases da polpa de incisivos de ratos e verificaram que as características dessas proteínas são muito semelhantes àquelas presentes

em tecidos relacionados com o transporte ativo de cálcio (ossos, córtex renal, cérebro, placenta, e mucosa intestinal).

Concomitantemente, experimentos estavam sendo realizados na tentativa de restituir a atividade da adenilciclase através da reconstituição dos seus componentes.

Logo foi verificado que a ativação da adenilciclase dependia da presença de um nucleotídeo da guanina (GTP ou análogos) (ROSS et al, 1977), e que o sistema adenilciclase é composto de pelo menos dois componentes separáveis, onde um deles revelava um sítio de ligação para o GTP (PFEUFFER, 1977 ; ROSS & GILMAN, 1977), o que permitiu a localização do componente ativado pelo flúor.

Com o mesmo propósito, ROSS et al (1978) e STERNWEIS & GILMAN (1979), separaram os componentes da adenilciclase em dois fatores: um termolábil representando a unidade catalítica da adenilciclase e outro termoestável representando a porção reguladora da proteína, a qual é ativada pelo flúor.

Numa linha de pesquisa voltada para a odontologia, foi verificado, que em ratos tratados com fluoreto de sódio na água de consumo ( 1ppm ), houve um aumento na concentração de AMPcíclico presente nos tecidos, sendo sugerido então que este fato ocorreu devido à

capacidade do flúor de estimular a adenilciclase (**ALLMANN et al, 1978 e KLEINER & ALLMANN, 1982**).

O flúor age na ligação GTP da proteína reguladora da atividade estimulatória do sistema adenilciclase (**HOWLETT et al, 1979**), atualmente conhecida como proteína G<sub>s</sub>, pertencente à família das proteínas G, que por sua vez pertence à família das proteínas nucleotídeo-ligadas.

Esta proteína forma um conjunto separado da adenilciclase, e age como um regulador intermediário entre o receptor e a ciclase (**ROSS & GILMAN, 1980**).

As proteínas G pertencem à uma família de proteínas acopladas às membranas celulares, que se ligam à um nucleotídeo guanina e funcionam como transdutoras de informações quimicamente codificadas. São intermediárias no caminho de sinalização transmembrana. Esse caminho consiste de três componentes:

- receptores
- proteínas regulatórias (proteína G)
- proteínas catalíticas ou efectoras (adenilciclase, guanilciclase, outros)

Finalmente, em 1980, **NORTHUP et al** purificaram a proteína G e esta se mostrou ativada pelo flúor e análogos do GTP (guanina trifosfato) na presença de magnésio e ATP (adenosina trifosfato) (**STERNWEIS et al, 1981**).

As funções das proteínas G são reguladas ciclicamente pela associação do GTP à sua subunidade  $\alpha$ , à hidrólise do GTP em GDP e Pi e a dissociação do GDP. A ligação do GTP está relacionada com a ativação da proteína G e com a regulação do efetor apropriado. A hidrólise do GTP inicia a desativação e a dissociação do GDP parece ser um limitador da reação e é controlada pelo receptor (**ROSS & GILMAN, 1980**).

A subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_s$ , troca o GDP por GTP em resposta à um receptor de membrana estimulado por agonistas. A forma ativa da proteína (GTP ligado à subunidade  $\alpha$ ), se liga à adenilciclase, tornando esta enzima ativa, resultando na formação de milhares de moléculas de AMPcíclico, antes que a atividade da GTPase intrínseca da subunidade  $\alpha$  torne essa proteína inativa. Como resultado, as proteínas G controlam a conversão dos sinais trazidos através da membrana plasmática em, mensageiros intracelulares (**ROSS & GILMAN, 1980**).

A administração de flúor na água em concentrações utilizadas com a finalidade de prevenir cáries, não causou alterações estatisticamente significantes na

concentração de AMPcíclico em plasma humano (MÖNSTAD & DIJKEN, 1982).

STERNWEIS & GILMAN (1982), revelaram que um contaminante presente nas preparações comerciais do ATP era responsável pela aparente necessidade desse nucleotídeo para a ativação da adenilciclase em presença de flúor. Os experimentos foram inicialmente dificultados pelo fato dos tubos de ensaio conterem quantidades significantes de um fator de ativação. Esse fator, presente nas preparações comerciais de vários nucleotídeos e nos tubos de ensaio, foi identificado como sendo o alumínio, embora esse não fosse capaz de ativar a proteína G na ausência do flúor.

Estudos com a subunidade  $\alpha$  da proteína transducina (tipo de proteína G), sugerem que o composto envolvido nessa ativação seja o fluoraluminato ( $\text{AlF}_4^-$ ), o qual imitaria a ação do GTP na ligação deste nucleotídeo com a subunidade  $\alpha$  dessa proteína ou seja, o fluoraluminato funcionaria como um substituto do grupo  $\gamma$  fosfato na molécula do GTP. Essa suposição deve-se ao fato de haver semelhanças moleculares entre o  $\text{AlF}_4^-$  e o  $\text{PO}_4^{3-}$ . Ambos são tetraedros, os tamanhos atômicos do Al e do P são similares, o F e o O possuem os mesmos raios de Van der Waals de 1,35Å e os comprimentos de ligação Al-F e P-O são aproximadamente os mesmos (BIGAY et al, 1985).

Em 1986, **LANGE et al**, trabalhando com microsomas hepáticos, mostraram que a estabilização e a inibição da glicose-6-fosfohidrolase (componente hidrolítico do sistema glicose-6-fosfatase) pelo flúor necessita da presença do íon alumínio. Em concentrações mM (1 - 10mM) , o fluoreto de sódio (NaF) inibiu a hidrólise da glicose-6-fosfato. A presença de EDTA (2-5mM) aboliu esse efeito, pois evitou a formação do composto ativo fluoraluminato por quelação do íon metálico alumínio.

**BRANDT & ROSS (1986)**, estudando os efeitos do fluoraluminato no ciclo da GTPase estimulado por catecolaminas, em vesículas fosfolipídicas reconstituídas que continham o receptor  $\beta$ -adrenérgico purificado e a proteína  $G_s$ , verificaram que este composto ativou a proteína e que o seu efeito necessitava da presença de  $Mg^{2+}$ .

Em hepatócitos isolados de ratos, o fluoraluminato imitou os efeitos dos hormônios mobilizadores de cálcio através da ativação da proteína  $N_p$ , além de inibir o acúmulo de AMPcíclico estimulado por agonistas sendo essa inibição mediada pela proteína  $G_i$ .  
**(BLACKMORE & EXTON, 1986)**

**DUCROCO et al (1987)**, através de estudos de ressonância magnética nuclear de alta resolução em células fagocitárias, demonstraram que, quando essas

células eram tratadas com NaF ocorria uma inibição da glicólise.

Em hepatócitos de ratos, o NaF aumentou a entrada de cálcio e a atividade da fosforilase **a**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente, e esses efeitos foram potencializados pela adição de  $\text{AlCl}_3$ , embora este não tenha mostrado nenhum efeito na ausência de NaF. O experimento evidenciou que o NaF ativa os mesmos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que são ativados por hormônios. (**HUGHES & BARRIT, 1987**)

**GARANT et al (1987)**, demonstraram a presença de atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  na membrana plasmática de células do órgão do esmalte através de estudos histoquímicos utilizando a ouabaina, um potente bloqueador da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ .

Em **1988**, **STADEL & CROOKE** mostraram que o modelo de atuação do fluoraluminato proposto para a ativação da **transducina** (proteína G do sistema visual), não se aplica à proteína  $G_s$ . Presume-se que na transducina, o fluoraluminato se ligue ao fosfato terminal do GDP, que encontra-se fortemente ligado à subunidade  $\alpha$  da proteína, formando um complexo que imita a forma ativa do nucleotídeo, o GTP. Estudos com a  $G_s$ , mostraram que uma única proteína modula a ativação da adenilciclase e também a afinidade do receptor por um agonista. Neste experimento, verificou-se que apesar do fluoraluminato estimular a atividade da adenilciclase, ele não diminuiu a

afinidade do receptor pelo agonista como era de se esperar, pois quando o GTP ou análogos foram usados, ambos os efeitos foram observados. Esse resultado sugere que o fluoraluminato não atue no sítio nucleotídeo guanina da +proteína G acoplada à adenilciclase para imitar o nucleotídeo GTP.

**MISSIAEN et al (1988)**, concluíram que o fluoraluminato inibe reversivelmente as ATPases de transporte de cátion tipo-P,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ , de forma não competitiva para o ATP e os substratos catiônicos da ATPase,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Propuseram que o fluoraluminato atue no sítio de ligação do fosfato da ATPase. Este efeito não foi observado quando o alumínio foi quelado pela deferoxamina e quando foi utilizado o  $\text{AlCl}_3$  na ausência de NaF. Sugeriram então que, sob as condições de incubação utilizadas para o experimento, a espécie de fluoraluminato predominante de acordo com as constantes de estabilidade publicadas, seria o  $\text{AlF}_4^-$ .

Já em **1989**, **MISSIAEN et al** verificaram que em experimentos de contração no miométrio de útero de ratas, a aplicação de fluoraluminato inibe a atividade da ATPase ( $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ ) do retículo endoplasmático desse músculo, resultando em contrações as quais são independentes da ativação da proteína G.

Em cultura de células o fluoraluminato não apresentou efeito nos níveis de AMPcíclico, mas inibiu

o acúmulo de AMPcíclico estimulado por agonistas. Em preparações de membranas, o fluoraluminato estimulou a atividade da adenilciclase em concentrações de 1 à 10mM mas não em concentrações maiores e inibiu a atividade da adenilciclase estimulada por agonistas em concentrações maiores à 1mM. Desta forma, o fluoraluminato ativou a proteína  $G_i$  (inibitória da adenilciclase) mas não a  $G_s$  (estimulatória da adenilciclase) em células e foi ativo em ambas as proteínas G em membranas. (INOUE et al, 1990)

Em 1990, HALL et al, estudando os efeitos do fluoraluminato no músculo liso de traquéia de bois verificaram que esse composto provocou contrações concentração-dependente entre 1 à 10mM de flúor e estimulou a formação de inositol fosfato em concentrações maiores que 1mM de flúor. O fluoraluminato também aumentou a incorporação de inositol na membrana plasmática além de provocar um pequeno aumento nos níveis de AMPcíclico.

No mesmo ano, RENDU et al demonstraram que a adição de  $AlCl_3$  a 10mM de NaF, potencializou a agregação plaquetária, a síntese de tromboxana e a formação de diacilglicerol, provavelmente por estimulação de uma proteína G que regula a ativação do polifosfoinositol específico da fosfolipase  $c$ , modulando a resposta das plaquetas a agonistas fisiológicos.

**HALL**, em **1990**, publicou um trabalho interessante para aqueles que estudam as proteínas nucleotídeo ligadas. Nele o autor discute à respeito de RAS (Rat Sarcoma Protein), uma das proteínas dessa família, a qual está relacionada com um oncogene. Esse conjunto de proteínas parece estar relacionado com o controle de diversas funções celulares, como o crescimento, a diferenciação e a secreção e transporte de vesículas intracelulares. Mutações nos genes que codificam essas proteínas, levando à substituições de aminoácidos na sua estrutura, são frequentemente encontradas em câncer humanos. Essas mutações bloqueiam a capacidade da GAP (proteína de ativação da GTPase) de estimular a atividade da GTPase da RAS, embora não afete a sua ligação a essa proteína, resultando numa forma ativa permanente da RAS, ou seja, ligada ao GTP, a qual permanece enviando sinais de forma descontrolada, podendo levar, por exemplo, à uma proliferação celular anormal.

Em miócitos e fibroblastos tratados com fluoraluminato, ocorreu estimulação da proteína quinase de ativação mitogênica sugerindo que a ativação de uma proteína G em células intactas, pode iniciar eventos que resultam na fosforilação da tirosina e na ativação dessa proteína quinase. **(ANDERSON et al, 1991)**

Compostos de fluoralumínio e fluorberílio inibiram as sulfatases, de forma reversível e mais lenta quando comparada à inibidores naturais como o

sulfato e o fosfato, sugerindo que estes compostos funcionam como análogos do sulfato, assim como funcionam como análogos do fosfato na ativação da proteína G. **(ROY, 1991)**

O flúor inibiu a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana do retículo sarcoplasmático (SR) de células musculares, formando um complexo com essa enzima, convertendo o seu sítio de ligação do cálcio na forma de baixa afinidade onde esse se apresenta voltado para o lúmen do SR. Este complexo é mais resistente à inativação térmica que outros complexos dessa enzima. Tais resultados sugerem que a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-flúor, envolva mudanças estruturais da enzima. O flúor mostrou ser um inibidor lento e de forte ligação e agiu juntamente com o magnésio no sítio de fosforilação da enzima. **(MURPHY & COLL, 1992)**

No mesmo ano, **MURPHY & HOOVER** verificaram que a inibição da  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase pelo flúor foi independente da presença do alumínio. Foram necessárias a ligação de duas moléculas de flúor à enzima. Como no trabalho anterior, o flúor exerceu seu efeito no sítio de fosforilação, sendo a reação reversível, porém lenta.

## ***PROPOSIÇÃO***

Considerando a importância do flúor na prevenção da cárie dentária e de seu uso generalizado pela população em diferentes faixas etárias, como também, a uma ação sobre o germe dental, quando acima de 1ppm na água de abastecimento, causando a fluorose dental, é que nos propusemos à estudar e avaliar a ação de diversos compostos de flúor (NaF,  $AlF_4^-$  e MFP Na) sobre o metabolismo glicolítico (glicogenólise e glicólise) do germe dental *in vitro* e *in vivo*.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

No presente estudo, foram utilizados 160 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com oito dias de idade, pois nesse período os germes dentais dos molares estão no estágio precoce de maturação (HOSKINS, 1928). Os ratos foram oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP e do biotério do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biológicas - UNESP - Botucatu.

Após o nascimento, as ninhadas foram padronizadas com dez animais de ambos os sexos, separados ao acaso. As ratas, com as suas respectivas ninhadas, foram mantidas em gaiolas individuais, alimentadas com ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de trinta ratos, de acordo com o composto de flúor recebido. Cada um desses grupos continha três subgrupos de dez ratos correspondente às

diferentes formas as quais os tratamentos foram aplicados (flúor à 10ppm e 20ppm no experimento *in vitro*, e concentração de 5mg/Kg de peso corpóreo no experimento *in vivo*). Um grupo composto de quarenta ratos, recebeu como tratamento soluções de flúor com EDTA. Este foi dividido em quatro subgrupos de dez ratos de acordo com a solução de flúor empregada (NaF e  $\text{AlF}_4^-$ ). Essa etapa do experimento foi conduzida somente *in vitro*, com concentração de 10ppm de flúor.

#### **GRUPO 1 - controle**

- 1.a - água destilada (*in vitro*)
- 1.b - água destilada (*in vitro*)
- 1.c - cloreto de sódio 0,9% (*in vivo*)

#### **GRUPO 2 - fluoreto de sódio (NaF)**

- 2.a - 10ppm (*in vitro*)
- 2.b - 20ppm (*in vitro*)
- 2.c - 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

#### **GRUPO 3 - monoflúorfosfato de sódio (MFP Na)**

- 3.a - 10ppm (*in vitro*)
- 3.b - 20ppm (*in vitro*)
- 3.c - 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

#### **GRUPO 4 - fluorossilicato (AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>)**

- 4.a - 10ppm (*in vitro*)
- 4.b - 20ppm (*in vitro*)
- 4.c - 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

## **GRUPO EDTA**

1. água destilada (*in vitro*)
2. água destilada + EDTA 1mM (*in vitro*)
3. EDTA 1mM + NaF 10ppm (*in vitro*)
4. EDTA mM +  $\text{AlF}_4^-$  10ppm (*in vitro*)

O metabolismo de carboidratos dos germes dentais foi avaliado pela atividade glicolítica e glicogenolítica em meio aeróbico, sendo considerado como índice metabólico, a produção de ácido láctico.

### ***Remoção dos germes dentais e tratamentos***

Dez frascos de vidro, devidamente numerados, foram preparados previamente com o meio de incubação para a glicogenólise, sendo estes posteriormente reutilizados para a glicólise.

Ao completarem oito dias de idade os ratos foram sacrificados por decaptação.

Para a remoção dos germes dentais, procedeu-se da seguinte forma: os maxilares superior e inferior foram separados; as saliências correspondentes aos germes dentais dos quatro primeiros molares (superior e inferior), localizadas e com uma agulha de calibre grosso,

retirou-se os germes, os quais foram colocados no frasco contendo o meio de incubação para a glicogenólise. Em seguida, o frasco foi levado ao banho-maria a uma temperatura constante de 37°C, por quarenta e cinco minutos, sendo agitado à cada quinze minutos. Após esse tempo, o conteúdo líquido do frasco foi transferido para um tubo de ensaio numerado, o qual foi vedado e levado ao congelador para posterior dosagem do ácido láctico. Em seguida, foi adicionado ao mesmo frasco com os quatro germes, o meio de incubação para a glicólise, repetindo-se o procedimento citado acima.

Posteriormente, os quatro germes de cada frasco foram secos numa gaze e colocados numa pequena forma de papel alumínio numerada sendo levados à estufa à temperatura de 50°C por 24h para posterior determinação do peso seco dos mesmos, realizada em balança de precisão.

### **Experimento *in vivo***

No sétimo dia de vida, às 8:00 e às 18:00h, e no oitavo, às 8:00h, os ratos receberam por via intraperitoneal, o volume de 0,1 ml dos seguintes tratamentos.

#### **GRUPO 1 - controle**

•1c - cloreto de sódio 0,9% (*in vivo*)

## **GRUPO 2 - NaF**

- **2c** - fluoreto à 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

## **GRUPO 3 - MFP Na**

- **3c** - fluoreto à 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

## **GRUPO 4 - $\text{AlF}_4^-$**

- **4c** - fluoreto à 5mg/Kg de peso (*in vivo*)

Os animais foram então sacrificados 1h após a última injeção e seus germes foram tratados de acordo com os procedimentos descritos para a glicogenólise e glicólise sendo que nos meios de incubação, as soluções de flúor foram substituídas por água destilada.

### **Meio de incubação para glicogenólise**

#### **GRUPO 1 - controle:**

- **1a, b, c** - 0,2ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4

#### **GRUPO 2 - NaF 10 e 20ppm *in vitro* e *in vivo***

- **2a** - 0,1ml de água destilada  
0,1ml de solução de fluoreto à 100ppm  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4
- **2b** - 0,1ml de água destilada  
0,1ml de solução de fluoreto à 200ppm  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4

- **2c** - 0,2ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4

Para os demais (grupos 3 e 4), somente o composto de flúor utilizado foi alterado de acordo com o grupo.

### **GRUPO EDTA**

- **GRUPO 1 - controle**  
0,2ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4
- **GRUPO 2 - água + EDTA**  
0,18ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,02ml de solução de EDTA 1mM
- **GRUPO 3 - NaF + EDTA**  
0,08ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,02ml de solução de EDTA 1mM  
0,1ml de solução de NaF à 10ppm
- **GRUPO 4 -  $\text{AlF}_4^-$  + EDTA**  
0,08ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,02ml de solução de EDTA 1mM  
0,1ml de solução de  $\text{AlF}_4^-$  à 10ppm

## Meio de incubação para glicólise

### GRUPO 1 - controle

- **1a, b e c** - 0,1ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,1ml de solução de glicose à 2%

### GRUPO 2 - NaF

- **2a** - 0,1ml de solução de fluoreto à 100ppm  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,1ml de solução de glicose à 2%
- **2b** - 0,1ml de solução de fluoreto à 200ppm  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,1ml de solução de glicose à 2%
- **2c** - 0,1ml de água destilada  
0,8ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,1ml de solução de glicose à 2%

Da mesma forma, para os demais grupos alterou-se a solução de flúor empregada.

### GRUPO EDTA

- **GRUPO 1 - controle**  
0,2ml de água destilada  
0,7ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
0,1ml de solução de glicose à 2%

- **GRUPO 2 - água + EDTA**  
 0,18ml de água destilada  
 0,7ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
 0,02ml de solução de EDTA 1mM  
 0,1ml de solução de glicose à 2%
  
- **GRUPO 3 - NaF + EDTA**  
 0,08ml de água destilada  
 0,7ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
 0,02ml de solução de EDTA 1mM  
 0,1ml de solução de NaF à 10ppm  
 0,1ml de solução de glicose à 2%
  
- **GRUPO 4 -  $\text{AlF}_4^-$  + EDTA**  
 0,08ml de água destilada  
 0,7ml de solução Krebs-Ringer fosfato pH 7,4  
 0,02ml de solução de EDTA 1mM  
 0,1ml de solução de  $\text{AlF}_4^-$  à 10ppm  
 0,1ml de solução de glicose à 2%

A solução de EDTA foi preparada a 50mM, concentração final nos meios de incubação de 1mM.

A solução de fluoraluminato foi preparada misturando-se  $\text{AlCl}_3$  e NaF na concentração final de 1mM e 100mM respectivamente.

## ***Dosagem do ácido láctico***

A dosagem do ácido láctico dos meios de incubação foi realizada conforme método enzimático previamente descrito (**BERGMEYER, 1965**), avaliando-se a absorvância do NADH em luz ultravioleta, em 340nm.

Como padrão, foi utilizado uma solução de ácido láctico à 100µg / ml.

O conteúdo de ácido láctico dos meios de incubação, foi determinado por comparação da absorvância da solução padrão.

Os resultados foram expressos em µg de ácido láctico/mg de peso seco.

## ***Tratamento Estatístico***

Os resultados foram submetidos à esquemas de análise de variância de ensaios inteiramente ao acaso e foi aplicado para a comparação das médias, o teste de Tukey à nível de 5%.

## ***RESULTADOS***

*O*s dados obtidos no espectrofotômetro, referentes à absorvância de luz ultravioleta das amostras e os valores do peso seco dos germes, foram então utilizados para o cálculo dos valores que compõem as próximas tabelas.

**TABELA 1 - Valores da atividade glicogenolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos controle, expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

ratos	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	água destilada	água destilada	NaCl 0,9%
1	3,81	3,70	3,86
2	4,68	3,68	5,21
3	4,16	4,33	4,54
4	4,10	5,09	4,46
5	3,85	3,49	4,00
6	3,47	4,82	3,15
7	4,95	3,80	3,52
8	4,11	4,48	4,99
9	4,50	3,98	4,06
10	4,45	3,33	3,76
<b>média(dpm)</b>	<b>4,20 (<math>\pm 0,14</math>)</b>	<b>4,07 (<math>\pm 0,18</math>)</b>	<b>4,15 (<math>\pm 0,20</math>)</b>

**TABELA 2 - Valores da atividade glicolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos controles, expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

ratos	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	água destilada	água destilada	NaCl 0,9%
1	3,42	4,21	3,64
2	4,06	2,37	3,61
3	3,39	3,01	4,13
4	3,72	3,50	4,16
5	3,75	2,88	3,23
6	4,58	3,29	3,74
7	3,23	3,80	3,70
8	3,42	4,57	3,06
9	4,13	4,73	4,24
10	3,39	3,32	3,24
<b>média(dpm)</b>	<b>3,71 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>3,57 (0,23)</b>	<b>3,67 (<math>\pm 0,13</math>)</b>

**TABELA 3 - Valores da atividade glicogenolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com fluoreto de sódio (NaF), expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b><i>in vitro</i> 10ppm</b>	<b><i>in vitro</i> 20ppm</b>	<b><i>in vivo</i> 5mg/Kg de peso</b>
1	3,60	4,05	3,05
2	4,16	3,20	3,15
3	3,42	3,28	2,82
4	3,80	3,25	2,58
5	3,36	3,07	2,97
6	4,20	3,42	3,54
7	4,54	4,09	3,48
8	3,92	3,63	3,95
9	3,69	4,11	2,98
10	4,16	3,92	3,04
<b>média(dpm)</b>	<b>3,88 (<math>\pm 0,12</math>)</b>	<b>3,60 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>3,12 (<math>\pm 0,12</math>)</b>

**TABELA 4 - Valores da atividade glicolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com fluoreto de sódio (NaF), e expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b><i>in vitro</i> 10ppm</b>	<b><i>in vitro</i> 20ppm</b>	<b><i>in vivo</i> 5mg/Kg de peso</b>
1	3,52	2,85	3,03
2	3,68	3,09	3,42
3	3,03	2,71	3,00
4	3,15	2,09	3,06
5	3,00	2,00	2,48
6	3,80	3,17	3,15
7	3,22	3,37	2,61
8	3,78	3,26	2,71
9	2,81	3,03	2,59
10	3,35	3,72	2,63
<b>média(dpm)</b>	<b>3,33 (<math>\pm 0,11</math>)</b>	<b>2,93 (<math>\pm 0,17</math>)</b>	<b>2,87 (<math>\pm 0,09</math>)</b>

**TABELA 5 - Valores da atividade glicogenolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com monofluorfosfato de sódio (MFP Na), expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b><i>in vitro</i> 10ppm</b>	<b><i>in vitro</i> 20ppm</b>	<b><i>in vivo</i> 5mg/Kg de peso</b>
1	4,02	4,02	4,02
2	4,23	4,68	3,72
3	3,94	4,51	4,05
4	3,16	4,09	3,28
5	4,05	4,27	4,19
6	3,41	3,73	4,29
7	4,51	4,27	4,23
8	4,17	3,53	4,08
9	4,59	3,67	4,14
10	4,20	3,53	4,15
<b>média(dpm)</b>	<b>4,02 (<math>\pm 0,14</math>)</b>	<b>4,03 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>4,01 (<math>\pm 0,09</math>)</b>

**TABELA 6 - Valores da atividade glicolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com monofluorofosfato de sódio (MFP Na), expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b><i>in vitro</i> 10ppm</b>	<b><i>in vitro</i> 20ppm</b>	<b><i>in vivo</i> 5mg/Kg de peso</b>
1	3,86	2,67	3,04
2	3,71	2,63	2,19
3	2,93	3,80	2,82
4	2,75	3,15	2,10
5	3,02	3,42	4,02
6	3,64	4,05	4,17
7	3,51	4,30	4,06
8	2,93	3,42	3,42
9	3,69	3,56	3,57
10	3,60	3,87	3,87
<b>média(dpm)</b>	<b>3,36 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>3,52 (<math>\pm 0,17</math>)</b>	<b>3,32 (<math>\pm 0,24</math>)</b>

**TABELA 7 - Valores da atividade glicogenolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com fluorossilicato ( $AlF_4^-$ ), expressa em  $\mu g$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

ratos	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
	10ppm	20ppm	5mg/Kg de peso
1	2,58	2,40	3,11
2	3,01	2,07	2,64
3	3,24	4,06	3,69
4	2,55	3,20	2,58
5	3,12	2,40	3,54
6	3,87	3,78	3,60
7	3,51	4,25	2,96
8	3,12	3,33	2,81
9	3,47	3,20	2,46
10	3,69	3,91	2,03
<b>média(dpm)</b>	<b>3,21 (<math>\pm 0,14</math>)</b>	<b>3,26 (<math>\pm 0,24</math>)</b>	<b>2,94 (<math>\pm 0,17</math>)</b>

**TABELA 8 - Valores da atividade glicolítica *in vitro* e *in vivo* dos germes dentais de ratos tratados com fluoraluminato ( $AlF_4^-$ ), expressa em  $\mu g$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b><i>in vitro</i> 10ppm</b>	<b><i>in vitro</i> 20ppm</b>	<b><i>in vivo</i> 5mg/Kg de peso</b>
1	3,63	3,96	2,24
2	3,36	2,88	2,54
3	2,93	3,44	2,03
4	3,31	2,63	3,39
5	2,95	2,56	2,03
6	2,43	2,60	2,67
7	2,33	3,63	2,71
8	2,73	3,72	2,40
9	3,34	2,20	3,04
10	3,52	2,00	3,17
<b>média(dpm)</b>	<b>3,05 (<math>\pm 0,14</math>)</b>	<b>2,96 (<math>\pm 0,21</math>)</b>	<b>2,62 (<math>\pm 0,15</math>)</b>

**TABELA 9 - Valores das atividades glicogenolítica e glicolítica *in vitro* dos germes dentais de ratos tratados com água destilada (controle), expressas em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b>glicogenólise</b>	<b>glicólise</b>
1	3,20	3,31
2	4,07	3,97
3	4,60	3,79
4	4,16	3,60
5	4,70	3,69
6	4,69	3,51
7	4,11	3,80
8	4,62	3,38
9	4,51	4,18
10	4,29	4,97
<b>média (dpm)</b>	<b>4,29 (<math>\pm 0,14</math>)</b>	<b>3,82 (<math>\pm 0,15</math>)</b>

**TABELA 10 - Valores das atividades glicogenolítica e glicolítica *in vitro* dos germes dentais de ratos tratados com água destilada + EDTA à 1mM, expressas em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b>glicogenólise</b>	<b>glicólise</b>
1	4,27	3,67
2	4,42	3,96
3	4,70	3,68
4	3,06	4,07
5	3,78	3,67
6	4,81	4,15
7	3,73	4,60
8	4,02	3,86
9	5,21	4,23
10	4,76	3,69
<b>média (dpm)</b>	<b>4,27 (<math>\pm 0,20</math>)</b>	<b>4,05 (<math>\pm 0,10</math>)</b>

**TABELA 11 - Valores das atividades glicogenolítica e glicolítica *in vitro* dos germes dentais de ratos tratados com NaF 10ppm + EDTA à 1mM, expressas em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

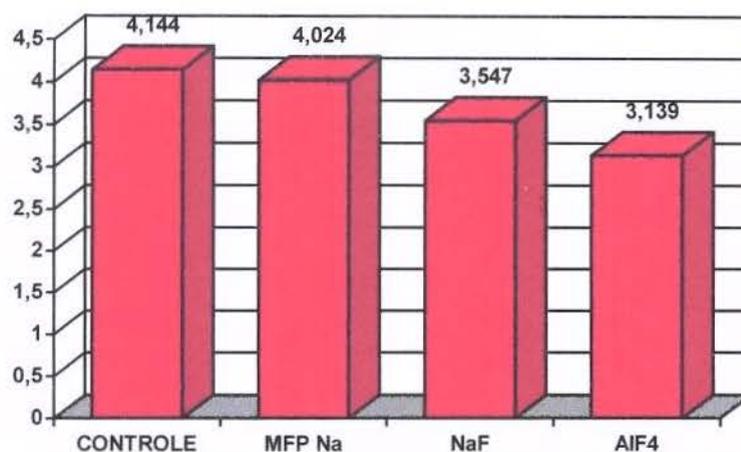
<b>ratos</b>	<b>glicogenólise</b>	<b>glicólise</b>
1	4,63	4,21
2	4,95	4,12
3	4,63	3,39
4	4,24	4,00
5	3,96	3,91
6	4,17	4,03
7	4,37	4,06
8	4,00	4,67
9	4,23	4,41
10	3,81	3,87
<b>média (dpm)</b>	<b>4,29 (<math>\pm 0,11</math>)</b>	<b>4,07 (<math>\pm 0,10</math>)</b>

**TABELA 12 - Valores das atividades glicogenolítica e glicolítica *in vitro* dos germes dentais de ratos tratados com  $\text{AlF}_4^-$  10ppm + EDTA à 1mM, expressas em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco do germe dental e suas respectivas média e desvio padrão médio.**

<b>ratos</b>	<b>glicogenólise</b>	<b>glicólise</b>
1	3,62	3,38
2	4,05	3,70
3	3,99	3,32
4	3,95	3,34
5	3,73	3,26
6	4,44	3,44
7	3,88	3,36
8	4,15	3,65
9	3,43	3,70
10	4,23	3,75
<b>média (dpm)</b>	<b>3,95 (<math>\pm 0,09</math>)</b>	<b>3,49 (<math>\pm 0,06</math>)</b>

As médias dos dados apresentados nas tabelas 1 à 12, foram submetidos à análise de variância ao acaso e à aplicação do teste de Tukey (5%) para a comparação dos diferentes tratamentos e formas, e estão expressos nos gráficos à seguir:

## ATIVIDADE GLICOGENOLÍTICA



**gráfico 1** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos aos diferentes tratamentos (controle, MFP Na, NaF e  $\text{AlF}_4^-$ ).

Cada barra do gráfico representa a média dos valores médios das tabelas 1, 5, 3 e 7 respectivamente de acordo com o tratamento recebido.

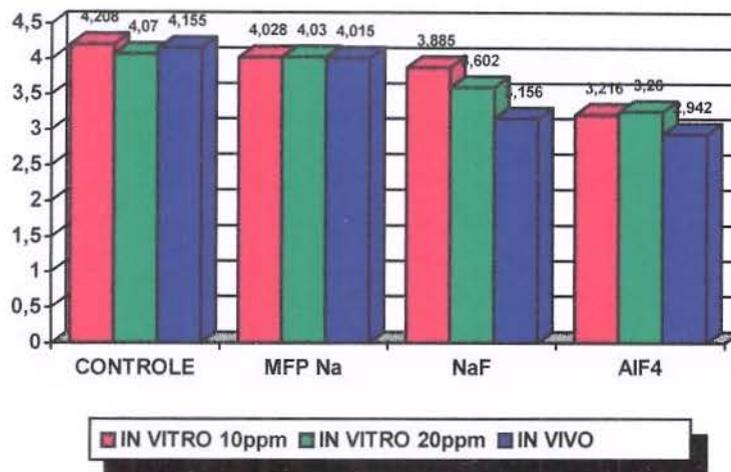
De acordo com os resultados do teste de Tukey para as médias dos tratamentos, podemos afirmar que:

⇒ O MFP Na não diferiu do controle;

⇒ O NaF e  $\text{AlF}_4^-$  diferiram do controle;

⇒ O NaF e  $\text{AlF}_4^-$  diferiram entre si, sendo que a maior taxa de inibição da glicogenólise foi observada no grupo  $\text{AlF}_4^-$ .

## ATIVIDADE GLICOGENOLÍTICA



**gráfico 2** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em µg de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas as quais os tratamentos (controle, MFP Na, NaF e AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>) foram aplicados (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*).

Cada barra do gráfico representa os valores das médias contidas nas tabelas 1, 5, 3 e 7 respectivamente de acordo com o tratamento recebido.

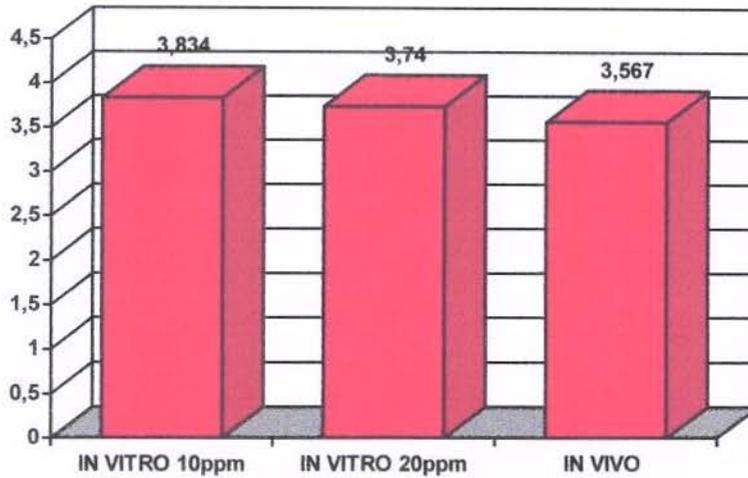
O teste de Tukey para as médias dos tratamentos dentro das diferentes formas, revela que:

⇒ 10ppm *in vitro* - O MFP Na e o NaF não diferiram do controle; o AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> diferiu do controle e dos demais;

⇒ 20ppm *in vitro* - O MFP Na e NaF não diferiram do controle; o AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> diferiu do controle mas não do NaF, embora apresentando uma maior taxa de inibição.

⇒ 5mg/kg de peso corpóreo *in vivo* - O MFP Na não diferiu do controle; o NaF e o AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> diferiram do controle mas não diferiram entre si, embora novamente tenha se observado uma maior taxa de inibição para o AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>.

## FORMAS - GERAL



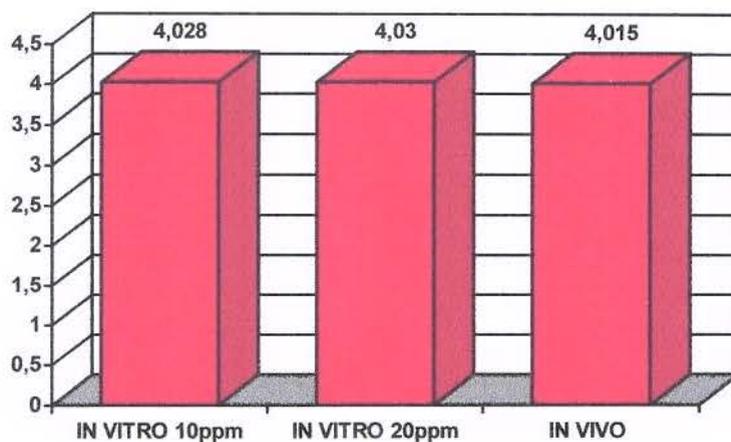
**gráfico 3** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), desconsiderando-se o tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores médios das colunas 1, 2 e 3 das tabelas 1, 5, 3 e 7 respectivamente de acordo com a forma de tratamento recebido.

As comparações pelo teste de Tukey para as médias das diferentes formas, revelam que:

- ⇒ Não houve diferença estatisticamente significativa entre 10 e 20 ppm *in vitro*.
- ⇒ Houve diferença da forma *in vivo* para a forma 10ppm *in vitro*, mas não para 20ppm *in vitro*, embora a maior taxa de inibição tenha sido observada na forma *in vivo*.

## FORMAS - MFP Na



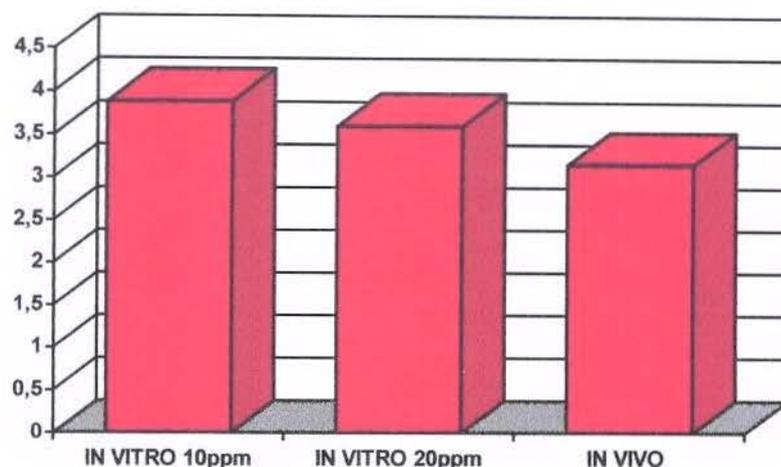
**gráfico 4** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o MFP Na como tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 5.

A aplicação do teste de Tukey para as médias das formas dentro do tratamento MFP Na, revela que:

⇒ Não houve diferença entre as três formas.

## FORMAS - NaF



**gráfico 5** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos a diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o NaF como tratamento aplicado.

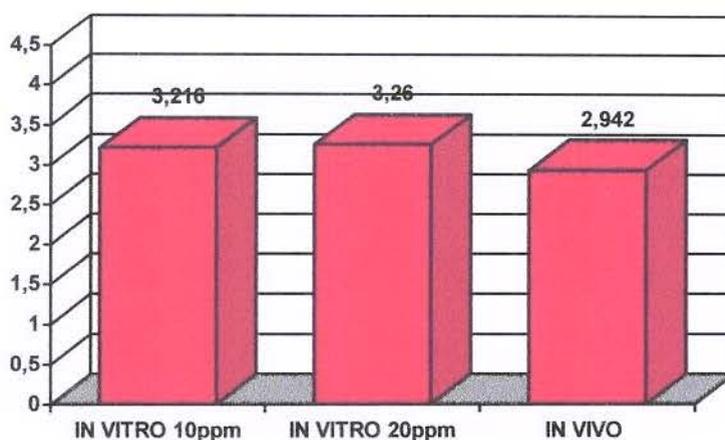
Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 3.

A realização do teste de Tukey para as médias das formas dentro do tratamento NaF, demonstra que:

⇒ Não houve diferença entre 10 e 20 ppm *in vitro*;

⇒ A forma *in vivo* diferiu da 10ppm *in vitro* mas não da 20ppm *in vitro*, embora tenha apresentado a maior taxa de inibição.

## FORMAS - AIF4



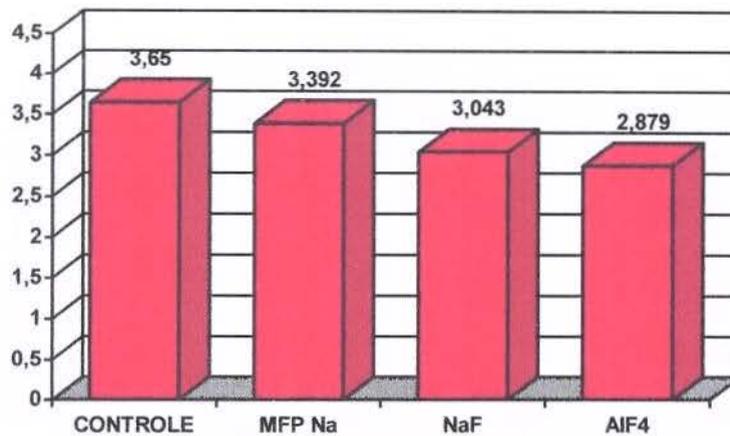
**gráfico 6** - Valores médios da atividade glicogenolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o  $\text{AlF}_4^-$  como tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 7.

Baseando-se na aplicação do teste de Tukey para as médias das formas dentro do tratamento  $\text{AlF}_4^-$ , observamos que:

⇒ Não houve diferença entre as três formas, embora a maior taxa de inibição tenha sido verificada na forma *in vivo*.

## ATIVIDADE GLICOLÍTICA



**gráfico 7** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos aos diferentes tratamentos (controle, MFP Na, NaF e  $\text{AlF}_4^-$ ).

Cada barra do gráfico representa a média dos valores médios das tabelas 2, 6, 4 e 8 respectivamente de acordo com o tratamento recebido.

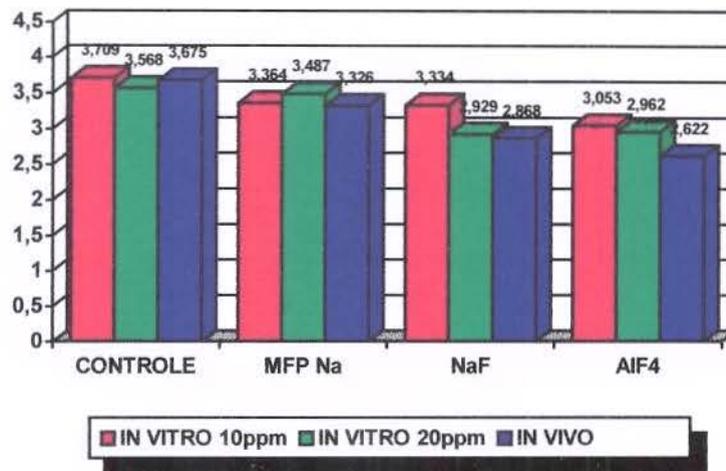
Os resultados do teste de Tukey para as médias dos tratamentos, mostram que:

⇒ O MFP Na não diferiu do controle;

⇒ O NaF diferiu do controle, mas não do MFP Na;

⇒ O  $\text{AlF}_4^-$  diferiu do controle e MFP Na mas não do NaF, sendo que a maior taxa de inibição da glicólise foi observada no grupo  $\text{AlF}_4^-$ .

## ATIVIDADE GLICOLÍTICA



**gráfico 8** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em µg de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas as quais os tratamentos (controle, MFP Na, NaF e  $\text{AlF}_4^-$ ) foram aplicados (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*).

Cada barra do gráfico representa os valores das médias contidas nas tabelas 2, 6, 4 e 8 respectivamente de acordo com o tratamento recebido.

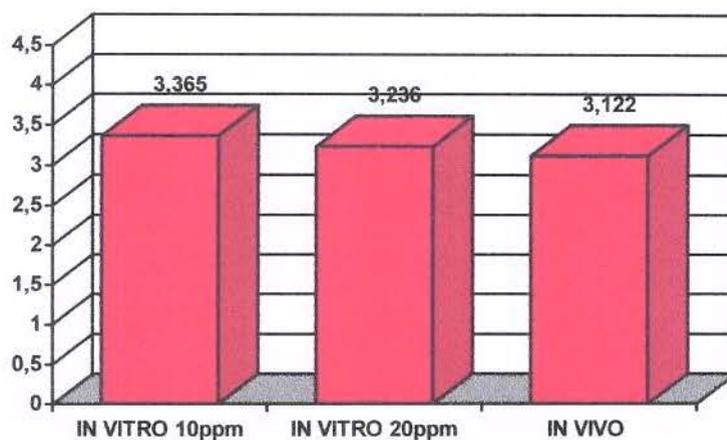
O teste de Tukey para as médias dos tratamentos dentro das diferentes formas, revela que:

⇒ 10ppm *in vitro* - O MFP Na e o NaF não diferiram do controle; o  $\text{AlF}_4^-$  diferiu do controle mas não do MFP Na e do NaF, embora apresentasse a maior taxa de inibição;

⇒ 20ppm *in vitro* - O MFP Na e  $\text{AlF}_4^-$  não diferiram do controle; o NaF diferiu somente do controle.

⇒ 5mg/kg de peso corpóreo *in vivo* - O MFP Na não diferiu do controle; o NaF diferiu do controle mas não do MFP Na; o  $\text{AlF}_4^-$  diferiu do controle e MFP Na mas não diferiu do NaF, observando-se a maior taxa de inibição para o  $\text{AlF}_4^-$ .

## FORMAS - GERAL



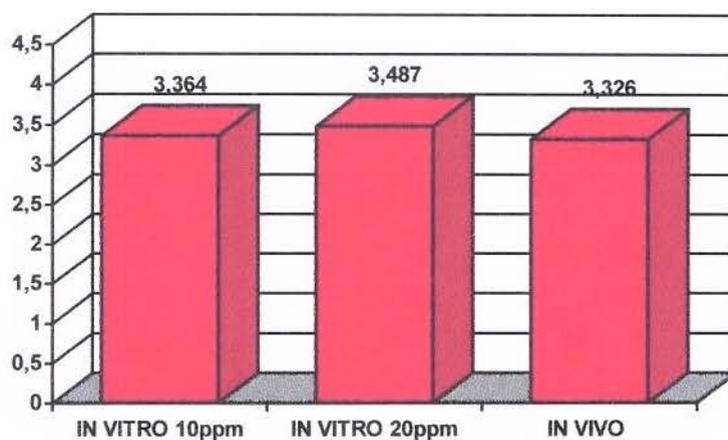
**gráfico 9** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em µg de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), desconsiderando-se o tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores médios das colunas 1, 2 e 3 das tabelas 2, 6, 4 e 8 respectivamente de acordo com a forma de tratamento recebido.

As comparações pelo teste de Tukey para as médias das diferentes formas, revelam que:

⇒ Não houve diferença estatisticamente significativa entre as três formas.

## FORMAS - MFP Na



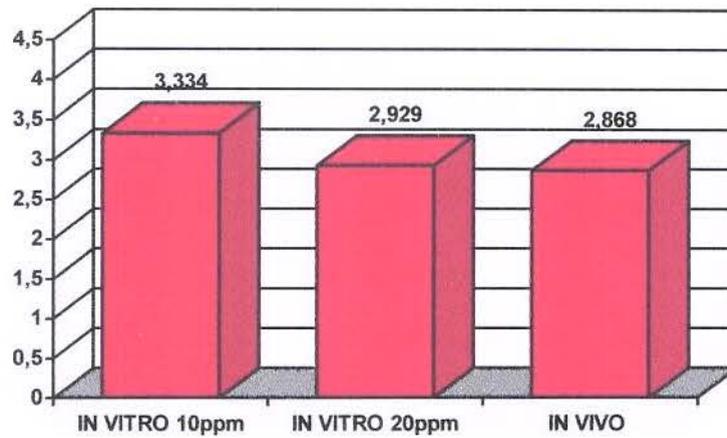
**gráfico 10** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos a diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o MFP Na como tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 6.

A realização do teste de Tukey para as médias das formas, no tratamento MFP Na, demonstra que:

⇒ Não houve diferença estatisticamente significativa entre as três formas.

## FORMAS - NaF



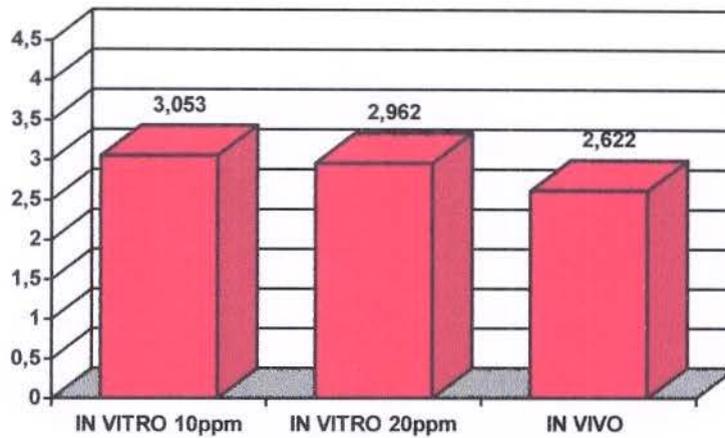
**gráfico 11** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos as diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o NaF como tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 4.

No teste de Tukey para as médias das formas, no tratamento NaF, verificamos que:

⇒ Não houve diferença estatisticamente significante entre as três formas.

## FORMAS - AIF4



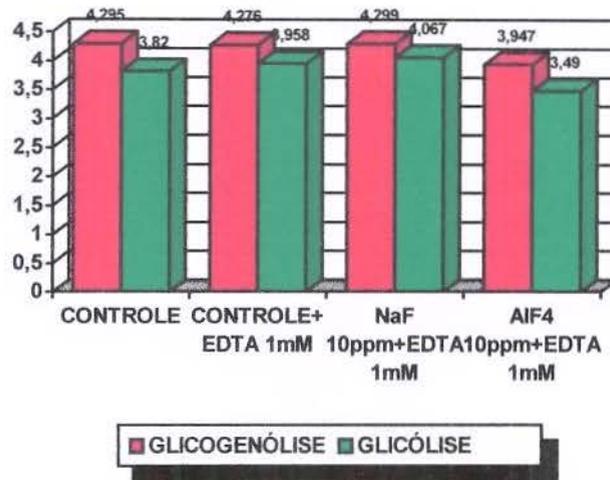
**gráfico 12** - Valores médios da atividade glicolítica expressos em µg de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos a diferentes formas (*in vitro* 10ppm, *in vitro* 20ppm e *in vivo*), considerando-se somente o  $\text{AlF}_4^-$  como tratamento aplicado.

Cada barra do gráfico representa a média dos valores de cada coluna da tabela 8.

Na aplicação do teste de Tukey para as médias das formas, no tratamento  $\text{AlF}_4^-$ , observamos que:

⇒ Não houve diferença estatisticamente significativa entre as três formas.

## ADIÇÃO DE EDTA



**gráfico 13** - Valores médios das atividade glicogenolítica e glicolítica expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido láctico/mg de peso seco dos germes dentais submetidos aos diferentes tratamentos aplicados.

Cada barra do gráfico representa os valores médios de cada coluna das tabela 9, 10, 11 e 12.

A aplicação do teste de Tukey no grupo o qual foi adicionado EDTA aos tratamentos, demonstra que:

⇒ glicogenólise - Não houve diferença estatisticamente significante entre os diferentes tratamentos.

⇒ glicólise - Somente o tratamento  $\text{AlF}_4^-$  + EDTA diferiu dos demais.

## ***DISCUSSÃO***

A discussão dos resultados obtidos nesse trabalho envolve diferentes aspectos do metabolismo do germe dental, como a presença de glicogênio, ação dos diferentes compostos de flúor e considerações sobre o possível mecanismo de inibição da atividade glicolítica.

A concentração de glicogênio na polpa varia de acordo com o estágio do desenvolvimento dental, aumentando com a sua maturação e com a vascularização da polpa, sendo que a sua presença está relacionada a condições de anaerobiose. O glicogênio histoquimicamente demonstrado na polpa de dentes completamente formados, é compatível com a predominância de um meio anaeróbico (RUSSELL, 1967).

De uma maneira geral, o tecido calcificado tem uma predominância da via glicolítica sobre o metabolismo aeróbico devido a baixa concentração de oxigênio molecular e ao pequeno número de mitocôndrias

presentes. Entretanto, no germe dental, os dois metabolismos estão presentes.

De acordo com os resultados, podemos afirmar que o flúor inibiu a atividade glicogenolítica e glicolítica do germe dental de ratos e essa inibição foi melhor caracterizada quando o  $\text{AlF}_4^-$  foi o tratamento aplicado.

Para discutirmos essa inibição, devemos ressaltar que o flúor é um elemento biologicamente ativo, que age acelerando ou inibindo certas reações bioquímicas e interagindo com processos que envolvem a transdução celular na membrana plasmática, sendo sua ação dependente da concentração. Um dos processos biológicos pelo qual o flúor exerce sua ação, e que tem recebido grande interesse, é na ativação da adenilciclase através da sua interação com a proteína G. Sabemos que o AMPc é um importante regulador metabólico atuando na produção de energia (glicogenólise), ação hormonal, síntese proteica e outros eventos intracelulares. Assim sendo, a interferência do flúor nesse processo torna-se de extrema importância.

A eficácia superior do  $\text{AlF}_4^-$  observada nos resultados, e a ausência de inibição quando acrescentou-se o EDTA, leva-nos a sugerir que essa atividade inibitória esteja relacionada com a existência de uma proteína G. Entretanto, para se comprovar essa hipótese, poderíamos num próximo experimento, substituir o  $\text{AlF}_4^-$  por análogos

do GTP para verificar se haveria a mesma inibição observada para o  $\text{AlF}_4^-$ . Dessa forma estaríamos de acordo com o critério de envolvimento de uma proteína G proposto por **GILMAN (1987)**.

A necessidade do alumínio para a ativação da adenilciclase via proteína G pelo flúor, foi demonstrada por **STERWEIS & GILMAN (1982)**.

**BIGAY et al (1985)** propuseram que o composto envolvido nessa ativação, fosse o fluoraluminato ( $\text{AlF}_4^-$ ), o qual imitaria a ação do GTP na ligação deste nucleotídeo com a subunidade  $\alpha$  dessa proteína ou seja, o fluoraluminato funcionaria como um substituto do grupo  $\gamma$  fosfato na molécula do GTP ( $\text{GDP} + \text{AlF}_4^- = \text{ação do GTP?}$ ).

No entanto, a hipótese que a ativação das proteínas G pelo  $\text{AlF}_4^-$ , se deva ao fato deste composto servir como um análogo tetraedro do fosfato, foi contestada por **MARTIN (1988)**. Ele aponta que o  $\text{AlF}_4^-$  em solução aquosa é hexaedro pois está ligado à duas moléculas de água  $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{AlF}_4^-]$ .

Nossos resultados sugerem que no caso do germe dental, a proteína regulatória predominante, deva ser do tipo  $G_i$ , ou proteína regulatória inibidora da adenilciclase.

O fluoraluminato também inibe a adenilciclase de células S49 cyc, um tipo de célula que não contém  $G_s$  mas contém  $G_i$  (HILDEBRANDT et al, 1983).

**BLACKMORE & EXTON, 1986** demonstraram que em hepatócitos isolados de ratos, o fluoraluminato inibiu o acúmulo de AMPcíclico estimulado por agonistas sendo essa inibição mediada pela proteína  $G_i$ .

O efeito inibitório do NaF sobre o metabolismo glicolítico também foi verificado por **DUCROCO et al, 1987**, os quais demonstraram que, quando as células eram oxigenadas, os açúcares fosforilados e as concentrações de ATP atingiam altos níveis, e a intensidade do pico que representava os açúcares, variava inversamente em relação ao pico do ATP quando as células eram tratadas com NaF, representando um efeito inibitório desse composto sobre a glicólise.

Nesse trabalho, a inibição observada no grupo NaF, pode ser devido à contaminação dos meios de incubação que continham NaF pelo alumínio presente na água (0,10ppm - CENA/USP) e nos tubos de vidro utilizados.

Este dado foi comprovado quando acrescentamos EDTA aos meios de incubação onde houve uma ausência total da inibição do metabolismo glicolítico.

Estes resultados estão de acordo com **LANGE et al (1986)**, onde a presença de EDTA aboliu o efeito do NaF em inibir a hidrólise da glicose-6-fosfato, pois evitou a formação do composto ativo fluorossilicato por quelação do íon metálico alumínio. O fluoreto de sódio ultrapuro também se mostrou inativo, sendo o seu efeito restaurado quando foi acrescentado  $AlCl_3$  às amostras ou quando as análises foram realizadas em tubos de ensaio de vidro, devido à habilidade que soluções de fluoreto de sódio possuem de extrair o alumínio do vidro em pH neutro. O  $AlCl_3$  foi totalmente inativo na ausência de NaF.

Considerando o germe dental, ressaltamos que a formação do esmalte sob o controle celular do órgão do esmalte, envolve a síntese e secreção de matriz proteica, fornecimento de  $Ca^{2+}$  para a mineralização da matriz e remoção de água e proteínas do esmalte na maturação concomitante com um aumento da sua fase mineral.

Na fluorose verificamos os efeitos do flúor sobre os ameloblastos e na matriz do esmalte em desenvolvimento. Estes, incluem uma modulação mais rápida do ameloblasto no estágio de maturação e uma atividade proteolítica reduzida no esmalte em maturação precoce. O esmalte no estágio secretório parece ser mais susceptível à doses agudas de flúor, entretanto, o estágio de maturação precoce seria o mais susceptível aos efeitos da ingestão crônica de flúor. Os mecanismos propostos para a

sua ação são: efeito sistêmico na homeostase do cálcio, secreção proteica e biossíntese da matriz alterada, efeitos diretos nas proteínas extracelulares e proteinases e efeitos específicos no metabolismo e função celular. Nesse último, ressaltamos a interação do flúor com a proteína G a qual está envolvida no controle de diversas funções celulares essenciais. Entretanto esses efeitos sobre esta proteína, são observados em concentrações milimolares, tornando-se difícil de avaliar quais seriam os efeitos em concentrações micromolares ( $10\mu\text{mol/l}$ ) observadas em plasma humano de indivíduos que ingeriram água fluoretada com até 10ppm de flúor (**BESTEN & THARIANI, 1992**). Entretanto, para o presente experimento, devemos lembrar que quanto à fluorose, o rato é menos sensível que o homem em relação ao flúor. Assim temos que concentrar cerca de 10 vezes mais a água para observarmos os efeitos produzidos no homem.

De um modo geral, a enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  funciona na reabsorção, troca e transporte ativo de íons gerando um movimento de água como consequência secundária.

**GARANT et al (1987)**, demonstraram a presença de atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  na membrana plasmática de células do órgão do esmalte. Ameloblastos secretores e células do estrato intermédio apresentaram baixa atividade da enzima, enquanto a membrana das células da camada papilar sobre os ameloblastos maturadores,

parece ser o principal local de atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , gerando um gradiente osmótico nos espaços extra celulares do órgão do esmalte.

Em outros estudos, estes mesmos autores demonstraram que os ameloblastos maturadores não possuem um sistema de transporte ativo de  $\text{Ca}^{2+}$  enquanto as células da camada papilar apresentam atividade enzimática da  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  e  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . Em vista desse fato, acredita-se que o crescimento dos cristais de esmalte, na região de maturação, ocorre gradualmente pela incorporação de minerais (Ca e P) disponíveis por difusão simples através espaços extracelulares da camada de ameloblastos maturadores. Eles sugerem ainda que gradientes osmóticos locais gerados pela  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  devam criar uma força direcionadora do movimento da água e matriz orgânica para fora do esmalte. Uma remoção inadequada desses dois componentes devido a uma diminuição da força osmótica (inibição da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) poderia, indiretamente, limitar o crescimento dos cristais de esmalte.

Devemos então considerar que **MURPHY & HOOVER (1992)** verificaram que o flúor, mesmo na ausência do alumínio, inibiu a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , o mesmo ocorrendo para a  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  em membrana do retículo sarcoplasmático de células musculares. Se o mesmo ocorrer nas células do germe

dental, os efeitos sobre a incorporação de minerais à matriz seriam altamente danosos.

É sugerido, que o complexo fluoraluminato age como análogo do fosfato inibindo um grande número de diferentes tipos de reação de fosfotransferência, incluindo a hidrólise do ATP por enzimas bombeadoras de íon com mecanismo P-type tais como a  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase e a  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPase ; F-type ATPases ; enzimas como a glicose-6-fosfatase envolvida na fosforilação de metabólitos; na hidrólise do GTP pela proteína G; hidrólise do ATP pela actina e GTP pela tubulina. No caso de hidrólise do ATP e GTP, esse complexo imitaria o fosfato terminal do nucleotídeo. O flúor sozinho também inibe reações de fosfotransferência catalizadas por hidrolases e fosfatases assim como também inibe a atividade de outras enzimas como a enolase (GILMAN, 1987).

Para o presente trabalho, poder-se-ia levantar a hipótese de que o metabolismo glicolítico fosse inibido pela ação do flúor sobre a enolase. Entretanto, não justificar-se-ia a ação inibidora do  $AlF_4^{-}$ , nem a ausência de inibição observada pela adição de EDTA.

Outro fato a ser discutido é a inibição acentuada observada quando o experimento foi conduzido *in vivo*. Isto se deve provavelmente a uma maior permeabilidade das células ao flúor em condições naturais.

Para finalizar, ressaltamos que a inibição do metabolismo responsável pela produção de energia nas células dos germes dentais, deve ser objeto de pesquisas para aqueles que procuram explicar o mecanismo envolvido na ocorrência da fluorose dental.

## ***CONCLUSÕES***

1. A inibição da atividade glicolítica do germe dental foi melhor observada com o  $\text{AlF}_4^-$  a 10 e 20ppm. in vitro

2. O MFP Na não exerceu efeito inibitório sobre o metabolismo glicolítico do germe dental in vitro e in vivo.

3. A inibição da atividade glicolítica do germe dental foi observada com o NaF e  $\text{AlF}_4^-$  na concentração de 5mg/kg de peso in vivo.

4. Tanto in vitro como in vivo, o composto que produziu a maior taxa de inibição do metabolismo glicolítico do germe dental foi o  $\text{AlF}_4^-$ .

5. A forma de aplicação do tratamento in vivo, foi mais efetiva na inibição da atividade glicolítica do germe dental.

6. A adição de EDTA in vitro, eliminou o efeito inibitório do NaF e do  $\text{AlF}_4^-$  sobre a atividade glicolítica.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

1. ALLMANN, D.W., MAPES, J.P., BENAC, M. Effect of nontoxic doses of F and Sn salts on rat liver metabolism *in vivo*. J. dent Res, New York, v.54, n.1, p.189, Jan./Feb. 1975.
2. ALLMANN, D.W., MILLER, A., KLEINER, H.S. Effect of fluoridated water on 3',5' cyclic AMP levels in various rat tissues. J. dent Res, New York, v.57, n.9,10, p.881, Sep./Oct. 1978.
3. ANDERSON, N.G., KILGOUR, E., STURGILL, T.W. Activation of mitogen-activated protein kinase in BC<sub>3</sub>H<sub>1</sub> myocytes by fluoroaluminate. J. Biol. Chem. Baltimore, v.266, n.16, p.10131-10135, June 1991.
4. BERGMEYER, H.V. Methods of Enzymatic Analysis, 2.ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1965, p.266-270.
5. BESTEN, P.K., THARIANI, H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. J. dent Res, New York, v.71, n.5, p. 1238-1243, May 1992.
6. BIGAY, J., DETERRE, P., PFISTER, C., CHAMBRE, M. Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the  $\gamma$  phosphate of GTP in its binding site. FEBS LETT., v.191, n.2, p. 181-185, Oct. 1985.
7. BLACKMORE, P.F., EXTON, J.H. Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum, fluoride, and glucagon. J. Biol. Chem., Baltimore, v.261, n.24, p.11056-11063, Aug. 1986.

8. **BRANDT, D.R., ROSS, E.M.** Effect of  $Al^{3+}$  plus  $F^{-}$  on the catecholamine-stimulated GTPase activity of purified and reconstituted  $G_s$ . Biochemistry, Columbus, v.25, n.22, p.7036-7041, Nov. 1986.
9. **DUCROCO, C., LENFANT, M., WERNER, G.H., GILLET, B., BELOEIL, J.C.** Fluoride effects on  $^{31}P$  NMR spectra of macrophages. Biochem. biophys. Res. Commun., New York, v.147, n.2, p.519-525, Sep. 1987.
10. **GARANT, P.R., SASAKI, T., COLFLESH, P.E.**  $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase in the enamel organ: Localization and possible roles in enamel formation. Adv Dent Res, Washington, v.1, n.2, p.267-275, Dec. 1987.
11. **GILMAN, A.G.** G PROTEINS: Transducers of receptor-generated signals. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, v.56, p.615-649, 1987.
12. **GUO, M.K., MESSER, H.H.** Properties of  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -activated adenosine triphosphatase from rat incisor pulp. Archs oral Biol., Oxford, v.21, n.11, p.637-640, 1976.
13. **HALL, A.** The cellular functions of small GTP-binding proteins. Science, Washington, v.249, n.4969, p.635-640, Aug. 1990.
14. **HALL, I.P., DONALDSON, J., HILL, S.J.** Modulation of fluoraluminate-induced inositol-phosphate formation by increases in tissue cyclic AMP content in bovine tracheal smooth muscle. Br. J. Pharmacol., Hampshire, v.100, p.646-650, 1990.

15. **HILDEBRANDT, J.D., SEKURA, R.D., CODINA, J., IYENGAR, R., MANCLARK, C.R., BIRNBAUMER, L.** Stimulation and inhibition of adenyliclases mediated by distinct regulatory proteins. Nature, London, v.302, p. 706-709, 1983.
16. **HOSKINS, M.M.** The effect of acetyl thyroxin on the development of the teeth. J. dent Res, New York, v.8, n.1, p.85-89, Feb. 1928.
17. **HOWLETT, A.C., STERNWEIS, P.C., MACIK, B.A., ARSDALE, P.M.V., GILMAN, A.G.** Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. J. Biol. Chem., Baltimore, v.244, n.7, p.2287-2295, Apr. 1979.
18. **HUGHES, B.P., BARRITT, G.J.** The stimulation by sodium fluoride of plasma-membrane  $Ca^{2+}$  inflow in isolated hepatocytes. Biochem. J., Colchester, v.245, n.1, p.41-47, July 1987.
19. **INOUE, Y., FISHMAN, P.H., REBOIS, R.V.** Differential activation of the stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins by fluoraluminate in cells and in membranes. J. Biol. Chem., Baltimore, v.265, n.18, p.10645-10651, June 1990.
20. **KLEINER, H. S., ALLMANN, D.W.** The effects of fluoridated water on rat urine and tissue cAMP levels. Archs oral Biol., Oxford, v.27, n.2, p.107-112, Feb. 1982.

21. **LANGE, A.J., ARION, W.J., BURCHELL, A., BURCHELL, B.** Aluminum ions are required for stabilization and inhibition of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase by sodium fluoride. J. Biol. Chem., Baltimore, v.261, n.1, p.101-107, Jan. 1986.
22. **MARTIN, R.B.** Ternary hydroxide complexes in neutral solutions of  $Al^{3+}$  and  $F^-$ . Biochem. biophys. Res. Commun., New York, v.155, n.3, p.1194-1200, Sep. 1988.
23. **MISSIAEN, L., KANMURA, Y., WUYTACK, F., RAEYMAEKERS, L., DECLERCK, I., DROOGMANS, G., CASTEELS, R.**  $AlF_4^-$  inhibits the accumulation of Ca in endoplasmatic reticulum in intact myometrial strips, but not in rabbit ear artery. Pflügers Arch, Bonn, v.414, p.423-429, 1989.
24. **MÖRNSTAD, H., DIJKEN, V.** Caries preventive doses of fluoride and cyclic AMP levels in human plasma. Caries Res, Basel, v.16, n.4, p.277-281, July/Aug. 1982.
25. **MURPHY, A.J., COLL, R.J.** Fluoride binding to calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum converts its transport sites to a low affinity lumen-facing form. J. Biol. Chem., Baltimore, v.267, n.24, p.16990-16994, Aug. 1992.
26. **MURPHY, A.J., HOOVER, J.C.** Inhibition of the  $Na^+-K^+-ATPase$  by fluoride. J. Biol. Chem., Baltimore, v.267, n.24, p.16995-17000, Aug. 1992.

27. NORTHUP, J.K., STERNWEIS, P.C., SMIGEL, M.D., SCHLEIFER, L.S., ROSS, E.M., GILMAN, A.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.77, p. 6516-6520, 1980.
28. PFEUFFER, T. GTP-binding proteins in membranes and the control of the adenylate cyclase activity. J. Biol. Chem., Baltimore, v.252, n.20, p.7224-7234, Oct. 1977.
29. RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W. Formation of cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J. Biol. Chem., Baltimore, v.232, p.1065-1076, 1958.
30. RENDU, F., LEBRET, M., TENZA, D., LEVY-TOLEDANO, S. How does fluoraluminate activate human platelets? Biochem. J., Colchester, v.265, n.2, p.343-349, Jan. 1990.
31. ROSS, M.E., MAGUIRE, M.E., STURGILL, T.W., BILTONEN, R.L., GILMAN, A.G. Relationship between the  $\beta$ -adrenergic receptor and adenylate cyclase. J. Biol. Chem., Baltimore, v.252, n.16, p.5761-5775, Aug. 1977.
32. ROSS, E.M., GILMAN, A.G. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. J. Biol. Chem., Baltimore, v.252, n.20, p.6966-6969, Oct. 1977.
33. ROSS, E.M., HOWLETT, A.C., FERGUSON, K.M., GILMAN, A.G. Reconstitution of hormone-sensitive adenylate cyclase activity with resolved components of the enzyme. J. Biol. Chem., Baltimore, v.253, n.18, p.6401-6412, Sep. 1978.

34. **ROSS, E.M., GILMAN, A.G.** Biochemical Properties of Hormone-sensitive Adenylate Cyclase. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, v.49, p.533-564, 1980.
35. **ROY, A.B.** Aluminofluorides and beryllifluorides as inhibitors of sulphatases. Biochem. J., Colchester, v.279, n.2, p.361-365, Oct. 1991.
36. **RUSSELL, D.L.** The distribution of glycogen in bovine dental pulp. J. dent Res, New York, v.46, n.6, p.1182-1187, Dec. 1967.
37. **STADEL, J.M., CROOKE, S.T.** Differential effects of fluoride on adenylate cyclase activity and guanine nucleotide regulation of agonist high-affinity receptor binding. Biochem. J., Colchester, v.254, n.1, p.15-20, 1988.
38. **STERNWEIS, P.C., GILMAN, A.G.** Reconstitution of adenylate cyclase. J. Biol.Chem., Baltimore, v.254, n.9, p.3333-3340, May 1979.
39. **STERNWEIS, P.C., NORTHUP, J.K., SMIGEL, M.D, GILMAN, A.G.** The regulatory component of adenylate cyclase - Purification and properties. J. Biol. Chem. Baltimore, v.256, n.22, p.11517-11526, Nov. 1981.
40. **STERNWEIS, P.C., GILMAN, A.G.** Aluminum: a requirement for activation of regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.79, p. 4888-4891, Aug. 1982.

## ***GLOSSÁRIO***

1. ADENILCICLASE - enzima efetora que converte o ATP em AMPc.
2.  $AlCl_3$  - cloreto de alumínio.
3.  $AlF_4^-$  - fluoraluminato.
4. EDTA - ácido etilenodiaminotetracético.
5. GDP - nucleotídeo guanosina difosfato.
6. GTP - nucleotídeo guanosina trifosfato.
7. GLICOGENÓLISE - processo de hidrólise do glicogênio.
8. GLICÓLISE - processo de hidrólise da glicose.
9. PROTEÍNA G - proteína regulatória de ligação nucleotídeo guanina.
10. PROTEÍNA  $G_i$  - proteína G de ação inibidora da adenilciclase.
11. PROTEÍNA  $G_s$  - proteína G de ação estimuladora da adenilciclase.
12. PROTEÍNA RAS - proteína G codificada por proto-oncogenes.
13. PROTEÍNA  $G_p(N_p)$  - proteína G que ativa a fosfolipase C.
14. TRANSDUCINA - proteína G que ativa a fosfodiesterase  $GMPc$  de células prismáticas visuais.