ARMANDO MÂNCIO DE CAMARGO

# ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DO FÍGADO E RIM DE RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM ÁGUA CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLUORETO DE SÓDIO.

Tese de Doutoramento
Departamento de Anatomia
Instituto de Biologia
UNICAMP

Campinas - S. P. - Brasil
1972

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

aos meus pais, pelo que sou

aos meus irmãos, pelo apoio

À minha esposa, pela sua
dedicada compreensão

AGRADECIMENTOS

Nenhum trabalho é fruto de uma única pessoa,mas sim, de todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a sua realização. E nesta oportunidade, externamos aqui nossos agradecimentos.

Ao Magnífico Reitor, Prof. Dr. Zeferino Vaz , pela confiança e apoio que sempre recebemos.

Ao Prof. Dr. José Merzel, Titular da Cadeira de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, mestre e amigo, desde os primeiros passos de nossa formação científica e cultural no campo da histologia, e pela sugestão, orientação da execução e apresentação desta tese.

Ao Prof. Dr. João Baptista Parolari, Titular da Cadeira de Anatomia Descritiva e Topográfica do Instituto de Biologia da UNICAMP, mestre exemplar e amigo de todas as horas, a quem tudo devemos em nossa formação no campo da Anatomia. Com igual sabedoria, contornou as dificuldades e desfêz as nossas dúvidas, com a mesma boa vontade, demonstrando seu alto espírito de compreensão, ajudando de modo decisivo a chegar a termo um trabalho que conhecera em andamento.

Ao Prof. Dr. Alfredo Reis Viegas, Professor de Odontologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela sugestão do assunto do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Prof. Titular da Cadeira de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, por nos ter permitido livre acesso ao Laboratório de Histologia.

À Profª Drª Vilma Cloris de Carvalho, Profª Assistente do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas sugestões e apoio, desde o nosso ingresso neste Departamento.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ortale, Prof. Assistente do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP pela incansável colaboração na tradução das referências bibliográficas.

Ao Prof. Dr. Bruno König Jr., Prof. Assistente do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio que proporcionou na redação desta tese.

Ao Sr. Paulo do Amaral, Sr. Messias Salvador de Lima e Sra. Leonor Colamarino, pelos serviços técnicos de grande valia, que possibilitaram a elaboração deste trabalho.

Ao Sr. Pedro Gimenez Gomez, pelo empenho que sempre demonstrou na elaboração da documentação fotográfica.

À Sra. Carmen Lúcia Conforti Bastos, pela incansável colaboração e afinco no serviço de datilografia.

Aos demais docentes e funcionários dos Departamentos de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, que de uma maneira ou de outra, colaboraram na execução do trabalho.

Ao Prof. Modesto Vasques Aires, prof. efetivo de Português do I. E. "Com. Emílio Romi" de Santa Bárbara d'Oeste, pela correção da redação deste trabalho.

# S U M Á R I O


PAG.

Introdução e Literatura ..... 1

Material e Métodos ..... 7

Resultados ..... 12

Discussão ..... 30

Conclusões ..... 37

Referências Bibliográficas ..... 39

# INTRODUÇÃO

Os primeiros registros sobre a ação tóxica do Flúor, segundo D'ANGELO e ESPÓSITO (1965), datam de 1841, (Brandt & Tappeiner) e desde então, vários outros foram feitos, antes que o Flúor fosse usado em larga escala na água de abastecimento.

O problema porém, dos efeitos tóxicos do Flúor passou a ser encarado com mais propriedade, quando se preconizou a fluoretação da água de abastecimento (proposta por COX em 1939 e posta em prática entre 1943 e 1947 de acordo com o programa de AST, 1943), com a finalidade de se diminuir a incidência da cárie dental.

Em 1962 SMITH fez uma extensa revisão da literatura, concernente ao metabolismo e aos possíveis efeitos tóxicos do Flúor em relação ao crescimento, reprodução, coração e circulação, sistema hematopoiético, tiróide, esmalte e rim. Não fazendo, porém, referência alguma ao fígado.

A respeito do rim, SMITH (1962) apresenta certo número de estudos e tece alguns comentários a respeito, concluindo: que esse órgão responde a quantidades excessivas de Flúor, apresentando alterações histopatológicas e funcionais as quais são tanto mais intensas quanto maior for a dose do halógeno. Observa que TAYLOR

(1961) mostrou não haver alteração histopatológica em rim de ratos tratados com água fluoretada a 50 ppm, durante seis meses, enquanto que ratos que receberam água com 100 ppm durante seis meses, apresentaram túbulos renais dilatados. Estudos feitos em Newburgh-Kingston por SCHLESINGER e outros (1956), mostraram não haver diferenças na função renal devido à ação da água fluoretada. SMITH e colaboradores (1955), não encontraram diferenças na excreção urinária de Flúor, em pacientes com função renal normal e mesmo com doença renal avançada. RAMSEYER e colaboradores (1957), atribuíram as alterações renais encontradas em ratos, ao uso da água potável, contendo 1, 5, 10 ppm de Flúor. Por outro lado, BOSWORTH & MC CAY (1962), usando doses de 1 a 10 ppm , num grande lote de ratos, em tratamento que durou até 520 dias, concluíram que várias das alterações descritas em rins por diversos autores, não podiam ser atribuídas à ação do Flúor, mas sim à idade dos animais, e mais ainda, que a frequência dessas alterações é altamente predominante em ratos machos, quando comparados às fêmeas.

Revendo a literatura, encontraram-se vários trabalhos mais recentes, onde persiste a controvérsia sobre os efeitos tóxicos do Flúor, mesmo quando usado em doses terapêuticas.

Destes trabalhos deve-se destacar inicialmente os que usaram Flúor administrado por via diferente daquela preconizada pela Odontologia Preventiva, ou seja, através da água potável.

OGILVIE (1953), trabalhando com ratos e administrando Flúor através de injeção intraperitoneal em doses diárias correspondente a 4 a 5 ppm de Flúor, verificou várias lesões renais, ao passo que o fígado permaneceu histologicamente inalterado.

D'ANGELO e ESPÓSITO (1965), usando dose bem maior de 25 mg/Kg de NaF administrada através de sonda gástrica, observaram entre os ratos sobreviventes da experiência, graves lesões hepáticas e renais.

TEMPESTINI e PAPPALARDO (1965), também com administração através de sonda, porém com doses mais próximas daquelas preconizadas pela terapêutica (0,02 a 2 mmg/Kg), não encontrou diferenças histológicas em vários órgãos, entre eles, rim e fígado de ratos tratados em relação a controles.

Usando hamsters e administrando o Flúor através de sonda gástrica na dose diária de 0,5048 mg, BERSOTTI e FRUGIS (1963) encontraram várias alterações degenerativas no fígado e rim após 15 dias de tratamento. O mesmo BERSOTTI (1964), empregando agora a dose de 0,2 mg diária, após 60 dias, verificou somente uma grande diminui

ção no teor de glicogênio no fígado dos hamsters tratados.

PITTORINO (1966), administrou, a cobaias, por via oral através de entubação, durante seis meses, doses que variaram de 0,02 a 2 mg/Kg e só com a maior dose, é que verificou alguns sinais de leves degenerações no rim.

Dos pesquisadores que administraram Flúor através da água de beber em ratos, somente MELLO, BARBERIO e CAMPOS (1963) encontraram alterações degenerativas em fígado e rim de ratos, até mesmo com a dosagem de 1 ppm de Flúor, preconizada para a prevenção da cárie. Devido aos resultados deste trabalho e de suas implicações, é que nos foi sugerida a presente pesquisa pelo Prof. Dr. Alfredo Reis Viegas, especialista em Odontologia Sanitária e Preventiva.

HODGE et al. (1964), em ratos tratados até dois anos com doses que variaram de 1 a 100 ppm de Flúor, só descreveram alterações renais naqueles que receberam a dose de 100 ppm.

Por sua vez, NAYLOR & WILSON (1967), com doses que variaram de 10 a 500 ppm, somente em ratos que receberam 250 ppm é que encontraram diminuição da respiração tecidual nos rins, não observando contudo, nenhuma alteração histológica neste órgão.

MOUCDCY (1968), administrando a ratos, através de água potável, doses de Flúor de 1 a 10 ppm, parece ser o único que, além de métodos histológicos rotineiros, empregou métodos histoquímicos para o estudo do efeito tóxico do Flúor no fígado. Apesar de não ter verificado nenhuma alteração de morfologia dos hepatócitos, descreve uma diminuição do volume nuclear e um aumento do teor de glicogênio, em ratos que receberam 4 e 10 ppm, mas não naqueles que foram tratados com 1 e 7 ppm, ao lado de um aumento da quantidade de RNA a partir de 1 ppm. Somente em ratos tratados durante 203 dias com 10 ppm de Flúor foram descritas zonas de deposição gordurosa no fígado.

Em resumo, depreende-se da literatura citada, que apesar das contradições verificadas, o emprego de Flúor nas doses preconizadas é uma medida terapêutica segura, como conclui SMITH em 1962. Contudo este mesmo autor indica a necessidade de revisões periódicas do assunto, para reinvestigar interpretações por vezes apressadas sobre os efeitos indesejáveis do Flúor em doses mínimas, TEMPESTINI e PAPPALARDO (1965), por sua vez, discutem a necessidade de pesquisas sob as mais variadas condições climáticas, alimentares e populacionais.

No Brasil, pelo que nos consta, existem apenas dois trabalhos sobre o assunto: de MELLO, BARBÉRIO e CAMPOS (1963) e de MOUCDCY (1968) - já citados, com resultados contraditórios.

Por outro lado, apenas MOUCDCY (1968), BER - SOTTI (1964) e TEMPESTINI e PAPPALARDO (1965) empregaram técnicas histoquímicas (sendo que os dois últimos, somente para pesquisa de glicogênio), ao passo que os demais autores citados, usaram exclusivamente métodos histológicos rotineiros para descrever a presença ou ausência de alterações em fígados e rins.

Com esses fatos em mente, torna-se evidente a necessidade de reestudar os aspectos microscópicos do fígado e rim submetidos a tratamento prolongado com água fluoretada, empregando além de colorações rotineiras de cortes com Hematoxilina-Eosina, métodos histoquímicos para evidenciação de polissacarídeos, proteínas, gorduras e enzimas, bem como a impregnação argêntica para o estudo de mitocôndrias. É o que nos propomos nesta pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram feitas com ratos (Ratus norvergicus, var. albinus), machos da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da UNICAMP, com um mês de idade, pesando aproximadamente 45 gramas, foram divididos em seis lotes de oito animais cada um e mantidos em grupos de dois por gaiola, num total portanto de 48 animais em 24 gaiolas.

Nos vários lotes, além de alimentação sólida balanceada na forma de grânulos, os animais receberam o seguinte tratamento em relação à água de beber oferecida:

1º lote - (gaiolas 1, 2, 3, 4) 1 ppm (parte por milhão) de Flúor em água desmineralizada;

2º lote - (gaiolas 5, 6, 7, 8) 1 ppm de Flúor em água de torneira;

3º lote - (gaiolas 9, 10, 11, 12) 10 ppm de Flúor em água de torneira;

4º lote - (gaiolas 13, 14, 15, 16) 100 ppm de Flúor em água de torneira;

5º lote - (gaiolas 17, 18, 19, 20) controle com água desmineralizada;

6º lote - (gaiolas 21, 22, 23, 24) controle com água de torneira.

O Flúor foi usado na forma de Fluoreto de Sódio. Preparou-se uma solução-mãe com água de torneira ou água desmineralizada contendo 22,1 gramas de sal por litro , a partir da qual, foram feitas as soluções de uso, que continham respectivamente 221 mg, o que corresponde a 100 ppm; 22,1 mg, ou seja, 10 ppm e 2,21 mg, o que é igual a 1 ppm.

Para prevenir os possíveis efeitos da composição química da água local (Piracicaba, S.P.), uma vez que é conhecido o efeito competitivo de certos cátions, como o Ca e Mg em relação à retenção do Flúor no organismo (MUHLER, 1959, MELLO et al, 1963), foram usados dois lotes de animais (nº 1 e 5) em que a água de torneira foi substituída por água desmineralizada.

O peso dos ratos de cada gaiola foi controlado de 15 em 15 dias. O consumo de água por lote foi controlado durante toda a experiência.

Decorridos 90 dias de tratamento, foram sacrificados 24 ratos, um de cada gaiola. Os 24 ratos restantes continuaram com o mesmo tratamento por mais 90 dias, com exceção de um rato pertencente ao 5º lote (controle) que morreu de causa desconhecida no 85º dia da experiência.

Tanto os animais com 90 como os com 180 dias de tratamento, foram sacrificados por golpe occipital a uma mesma hora do dia (por volta das 10:00 horas). Imediata-

mente após a morte de todos os animais foram retirados os rins e o fígado, que após rápida lavagem em soro fisiológico, foram reduzidos a fatias de 2 a 3 mm de espessura, e distribuídos pelos seguintes fixadores:

Formol a 10% em soro fisiológico (24 horas a 4ºC);
Gendre (24 horas a 4ºC);
Formol Cálcio de Baker (24 a 48 horas);
Formol Cálcio + Sacarose a 7,5% (24 horas a 4ºC);
Acetona (24 horas a 4ºC).

Em cada fixador colocaram-se vários fragmentos e uma vez completada a fixação, uma parte destes foi incluída em parafina de modo rotineiro e cortados na espessura de 5 micra, ao passo que os restantes foram utilizados para obtenção de cortes por congelação, de 10 a 20 micra de espessura.

Os cortes foram submetidos aos seguintes métodos:

A - Para o estudo histológico:

a) Cortes em parafina de material fixado em Formol a 10% foram corados com Hematoxilina-Eosina.

b) Cortes por congelação de material fixado em Formol a 10%, foram usados para estudo de mitocôndrias,

através da técnica de POLAK (1953)♀ .

B - Para o estudo histoquímico:

Salvo especificações, as reações abaixo discriminadas, foram feitas de acordo com as indicações dos textos de LISON (1960) ou PEARSE (1960).

a) Reações para polissacarídeos:

Cortes em parafina de material fixado em Gendre, foram tratados pela reação do Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS), segundo McMANUS modificada por HOTCHKISS, para evidenciar grupos 1-2 glicol. Esta reação foi empregada também em cortes previamente tratados pela amilase salivar, para diagnóstico de glicogênio.

b) Reação para grupos reativos de proteínas:

Cortes em parafina de material fixado em Formol 10%, foram tratados pelas seguintes reações:

1) ninhydrina-Schiff (YASUMA & ITCHIKAWA), para evidenciação de radicais amino;
2) p-dimetilaminobenzaldeido-nitrito (ADAMS), para evidenciar radicais indolil (triptofano);
3) ferricianeto férrico (ADAMS), para evidenciar radicais sulfidrila;

---

♀ Técnica de POLAK - Apresentada pelo autor no curso ministrado na Escola Paulista de Medicina, S.P., 1953.

4) ácido tioglicólico-ferricianeto férrico (ADAMS), para evidenciar radicais sulfidrila e dissulfeto;
5) reação de MILLON (segundo BAKER), para evidenciar radicais fenólicos;
6) reação de SAKAGUCHI (modificada por BAKER), para o radical guanidil da arginina;
7) acidofilia total, Fast Green-pH 1,19 (SCHRADER e LEUCHTENBERGER), para os radicais amino + guanidil + imidazol.

c) Para o estudo de lipídeos:

Cortes por congelação de material fixado em Formol Cálcio de BAKER, foram usados para evidenciação de gorduras através da coloração pelo Sudan III e Sudan Negro B.

d) Para o estudo de enzimas:

1) Cortes por congelação de material fixado em Formol Cálcio + Sacarose, foram utilizados para evidenciação de fosfatase ácida através da técnica de GOMORI, modificada por HOLT et al. (1960).

2) Cortes em parafina de material fixado em Acetona, foram usados para detecção de fosfatase alcalina, através do método de GOMORI (McMANUS & MOWRY, 1960).

RESULTADOS

A - Observações Gerais:

Os ratos que receberam Fluoreto de Sódio durante 90 ou 180 dias, tiveram comportamento e aspecto externo idênticos aos ratos que serviram de controle; nenhuma anormalidade foi observada na aparência geral.

Tanto os ratos tratados com Flúor quanto os de controle ganharam peso numa mesma proporção durante o tratamento, como mostra a Tabela I.

Tanto os ratos tratados como os controles consumiram durante a experiência cerca de 28 litros de água por lote, com uma média de 7 litros por gaiola, com exceção da gaiola nº 18 do 5º lote que consumiu cerca de 6 litros, devido à perda de um rato no 85º dia da experiência.

Quando da abertura do abdome, macroscopicamente, o fígado e o rim de todos os ratos tratados com NaF, apresentaram-se de aspecto normal semelhante aos controles.

B - Observações Histológicas:

Primeiramente examinaram-se os cortes de fígado e rim de todos os ratos, sem a identificação do animal. Num segundo exame comparam-se os cortes dos animais tratados com os dos controles.

O fígado (figs. 1, 2 e 3) dos ratos tratados com 1 (com água de torneira ou desmineralizada), 10, e 100 ppm de Flúor, apresentou um aspecto geral,quanto ao arranjo do estroma e das células, semelhante ao do fígado dos ratos controles. O mesmo pode-se dizer quanto ao tamanho e a morfologia dos hepatócitos. Examinando-se com mais acuidade os hepatócitos da periferia, da região média e central do lóbulo hepático dos fígados de animais tratados, não se constatou qualquer alteração que se pudesse acusar como patológica.

Da mesma maneira nos rins (Figs. 4, 5 e 6) dos ratos tratados, no conjunto ou mais particularmente na córtex, quando comparados aos controles, não se observou qualquer alteração que pudesse ser atribuída ao Flúor administrado,

As mitocôndrias dos fígados ou dos rins (Figs. 7 a 12), de ratos tratados apresentaram-se quanto à sua distribuição, semelhantes às dos mesmos órgãos de animais controles. Embora não se tenha feito a contagem destas organelas por células, não parece ter havido alteração do seu número, quando se compararam os órgãos de animais tratados em relação aos controles.

C - Resultados dos métodos histoquímicos:

Assim como foi feito em relação às observações histológicas, os cortes submetidos às reações histoquí-

micas, foram analisados primeiramente sem a identificação do animal, para em seguida, serem comparados os cortes de animais tratados com os de controles.

O resumo dos resultados destes métodos, bem como uma avaliação subjetiva da intensidade das reações , através de unidades "cruz", acha-se condensado nas Tabelas 2 e 3.

a) Reação para polissacarídeos:

No fígado, procurou-se, através da reação do PAS, conjugada com o teste da amilase salivar, estudar o glicogênio. Contudo, tanto no que diz respeito à quantidade aparente ou à distribuição desta inclusão citoplasmática, não se pode constatar nenhuma diferença entre os animais tratados e os controles, como mostram as Figs. 13 a 15.

Nos rins a reação do PAS serviu para evidenciar que não houve nenhuma alteração das membranas basais que pudesse ser atribuída ao tratamento pela água fluoretada.

b) Reações para grupos reativos de proteínas:

Os resultados obtidos com as várias reações usadas, tanto no fígado como no rim dos ratos de todos os lotes tratados com NaF, mostraram não haver variações qualitativas ou quantitativas, em nenhum dos grupos quando comparados com os controles.

c) Métodos para lipídeos:

Nos animais tratados com NaF durante 90 dias, bem como nos controles, não foi possível constatar nenhum depósito de gordura no fígado como no rim, através as colorações pelos Sudans.

Todos os ratos, porém, que receberam tratamento com Fluoreto de Sódio nas concentrações de 1 ppm de Flúor em água desmineralizada, 1, 10, 100 ppm em água de torneira durante 180 dias, apresentaram deposição de gordura na forma de gotículas nos hepatócitos, próximos aos espaços-porta ou às veias-centro-lobulares (Fig.16). A quantidade destas gotículas, variou de um animal para outro, como se pode observar nos resultados resumidos na Tabela 2. Por outro lado, um rato de cada um dos lotes controle, apresentou também deposição de gordura no fígado, semelhante àquela descrita nos animais tratados.

Em relação aos rins de animais com 180 dias de experiência observou-se que:

1) três dos quatro ratos de 1º lote que beberam 1 ppm de Flúor em água desmineralizada, apresentaram uma quantidade muito pequena de gordura na forma de gotículas, nas células do epitélio dos túbulos contorcidos proximais e distais;
2) no 2º lote, apenas dois dos quatro ratos que beberam 1 ppm de Flúor em água de torneira, apresentaram deposição de gordura semelhante à do 1º lote;

3) no 3º lote, nenhum dos quatro ratos que recebeu 10 ppm de Flúor em água de torneira apresentou deposição de gordura;
4) no 4º lote, que recebeu 100 ppm de Flúor em água de torneira, apenas dois dos quatro ratos apresentaram a deposição de gordura acima descrita;
5) no 5º lote, nenhum dos ratos que recebeu apenas água desmineralizada apresentou deposição de gordura no rim;
6) no 6º lote, controle que recebeu água de torneira, um dos quatro ratos apresentou gotículas de gordura semelhantes às descritas.

d) Reações para evidenciação de enzimas:

A reação da fosfatase ácida que permite a identificação dos lisosomas, mostrou que estas organelas não sofreram alteração perceptível no que diz respeito à sua distribuição ou quantidade aparente, tanto no fígado como no rim dos animais tratados em relação aos controles, como se pode notar nas Figs. 17 a 22.

Em relação à fosfatase alcalina, a reação mostrou-se negativa no fígado de todos os animais (Figs. 23 a 25). No rim este enzima se apresentou de aspecto normal na bordadura em escova dos túbulos contorcidos proximais, dos ratos tratados com Flúor em relação aos controles (Figs. 26 a 28).

TABELA I

Pesos médios e fatores de aumento de peso dos ratos controles e tratados com NaF durante 90 e 180 dias.

| Tratamento | Peso Médio (8 ratos) | | Fator de aumento de peso | Peso Médio (4 ratos) | | Fator de aumento de peso |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Inicial | Após 90 dias | | Após 90 dias | Após 180 dias | |
| 1 ppm de F. em AD | 48,50 | 185,00 | 3,81 | 180,50 | 225,25 | 1,24 |
| 1 ppm de F. em AT | 47,12 | 191,25 | 4,05 | 197,00 | 230,25 | 1,16 |
| 10 ppm de F. em AT | 46,75 | 180,25 | 3,85 | 181,00 | 215,15 | 1,18 |
| 100 ppm de F. em AT | 49,00 | 180,62 | 3,68 | 180,50 | 212,00 | 1,17 |
| Controle com AD | 47,37 | 187,71[1] | 3,96 | 183,33[2] | 218,00[2] | 1,18 |
| Controle com AT | 45,75 | 176,75 | 3,86 | 169,75 | 204,50 | 1,20 |

Legenda: AD = Água desmineralizada; AT = Água de torneira; F = Flúor
1 = média de 7 ratos; 2 = média de 3 ratos

TABELA - 2

RESULTADOS DOS MÉTODOS HISTOQUÍMICOS EM CORTES DE FÍGADO DE RATOS CONTRÔLES E TRATADOS COM NaF DURANTE 90 E 180 DIAS

| MÉTODOS | TRATAMENTO | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 ppm de F em AD | | 1 ppm de F em AT | | 10 ppm de F em AT | | 100 ppm de F em AT | | Contrôle com AD | | Contrôle com AT | |
| | 90 d. | 180 d. | 90 d. | 180 d. | 90 d. | 180 d. | 90 d. | 180 d. | 90 d. | 180 d. | 90 d. | 180 d. |
| PAS | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ | ++ +++ |
| Amilase+PAS | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ninhydrina-Schiff | ++ +++ | ++ | ++ +++ | ++ | ++ +++ | ++ | ++ +++ | ++ | ++ +++ | ++ | ++ +++ | ++ |
| DMAB-nitrito | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ferricianeto-férrico | ∓ + | + | ∓ + | + | ∓ + | + | ∓ + | + | ∓ + | + | ∓ + | + |
| Ác.Tiogricólico + ferric.férrico | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Millon | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sakaguchi | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Acidofilia Total | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sudan | - | ++ +++ | - | ++ +++ | - | ++ +++ | - | ++ +++ | - | - 1 | - | - 1 |
| Fosfatase ácida | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fosfatase alcalina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

LEGENDA:- AD = Água desmineralizada; AT = água de torneira; F = Fluor; d = dias

\+ = reação fraca

++ = reação moderada

+++ = reação forte

∓ = ora positivo (reação fraca), ora negativo

\- = negativo

1 = um rato de cada lote contrôle, apresenta resultado semelhante aos ratos tratados.

TABELA - 3

RESULTADOS DOS MÉTODOS HISTOQUÍMICOS EM CORTES DE RINS DE RATOS CONTRÔLES E TRATADOS COM NaF DURANTE 90 E 180 DIAS

| MÉTODOS | TRATAMENTO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 ppm de Fluor em AD | | | | | | 1 ppm de Fluor em AT | | | | | | 10 ppm de Fluor em AT | | | | | | 100 ppm de Fluor em AT | | | | | |
| | 90 Dias | | | 180 Dias | | | 90 Dias | | | 180 Dias | | | 90 Dias | | | 180 Dias | | | 90 Dias | | | 180 Dias | | |
| | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE |
| PAS | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Amilase + PAS | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Ninhydrina-Schiff | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ |
| DMAB-nitrito | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | ++ | + |
| Ferricianeto-Férrico | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ |
| Ác. tioglicólico + ferric. férrico | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ |
| Millon | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sakaguchi | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Acidofilia Total | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sudan | - | - | - | - | +[3] | - | - | - | - | - | +[2] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +[2] | - |
| Fosfatase ácida | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | |
| Fosfatase alcalina | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ |

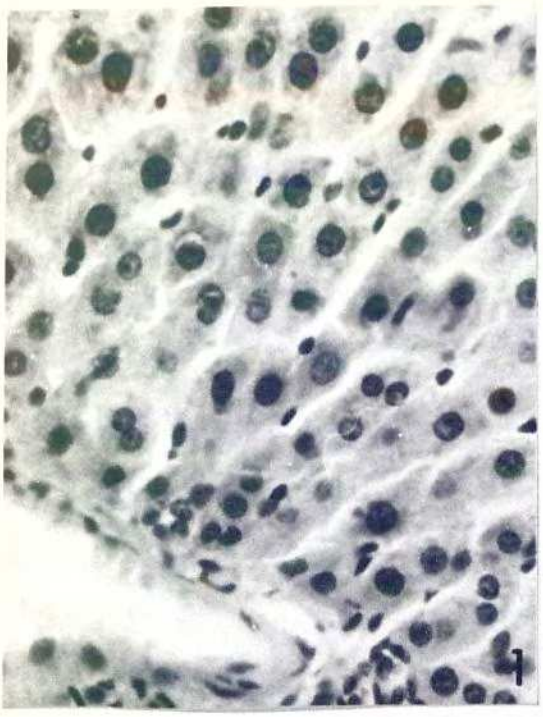
LEGENDA: - AD = Água desmineralizada; AT = água de torneira; GL = glomérulo; TPD = túbulos contorcidos proximais e distais;
BE = bordadura em escova; 3, 2, 1 = número de ratos nos respectivos lotes, que apresentaram deposição de gorduras;
Unidades - a +++ - vide Tabela 2.

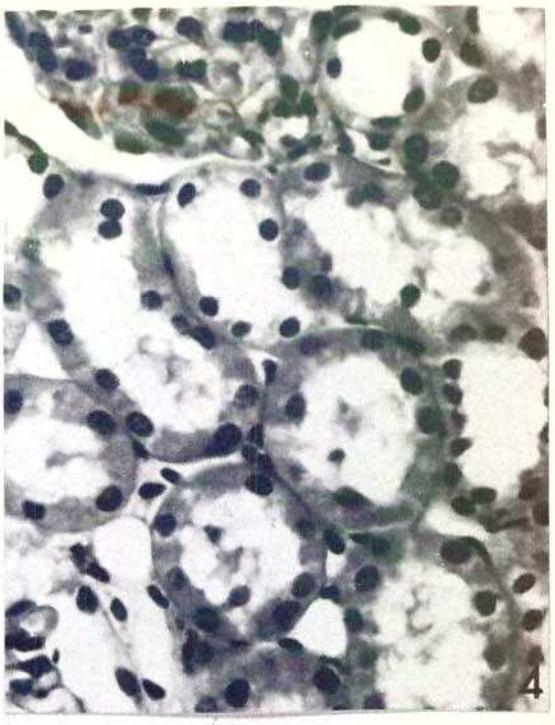
| MÉTODOS | TRATAMENTO | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Contrôle com AD | | | | | | Contrôle com AT | | | | | |
| | 90 Dias | | | 180 Dias | | | 90 Dias | | | 180 Dias | | |
| | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE | GL | TPD | BE |
| PAS | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Amilase + PAS | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Ninhydrina-Schiff | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++<br>+++ | ++ | ++ | ++ |
| DMAB-nitrito | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | ++ | + |
| Ferricianeto-Férrico | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ | + | +<br>++ | +<br>++ | + | + | +++ |
| Ác. tioglicólico + ferric. férrico | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ |
| Millon | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sakaguchi | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Acidofilia Total | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sudan | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +[1] | - |
| Fosfatase ácida | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ | |
| Fosfatase alcalina | | | +++ | | | +++ | | | +++ | | | +++ |

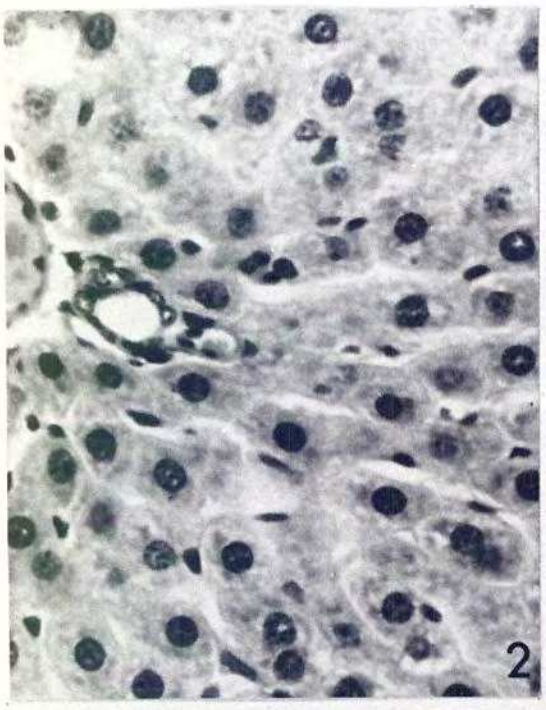
- PRANCHA I -

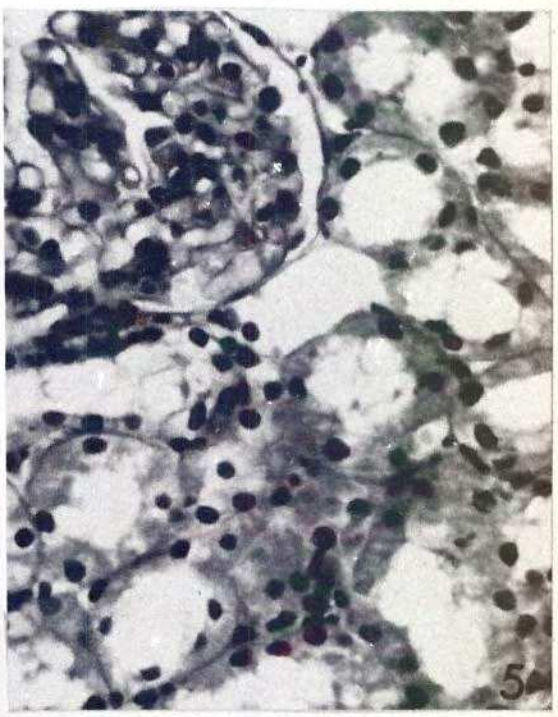
Figs. 1, 2, 3, Fígado de ratos, após 180 dias de tratamento com NaF. HE, ± 500X.
1- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 2- idem, 100 ppm de Flúor; 3- controle.
Cada figura mostra um espaço-porta e região peri-portal de um lóbulo hepático.
Nota-se que há semelhança no aspecto dos cortes, quer no conjunto, quer no dos hepatócitos em particular, indicando ausência de alterações que possam ser atribuídas ao tratamento.

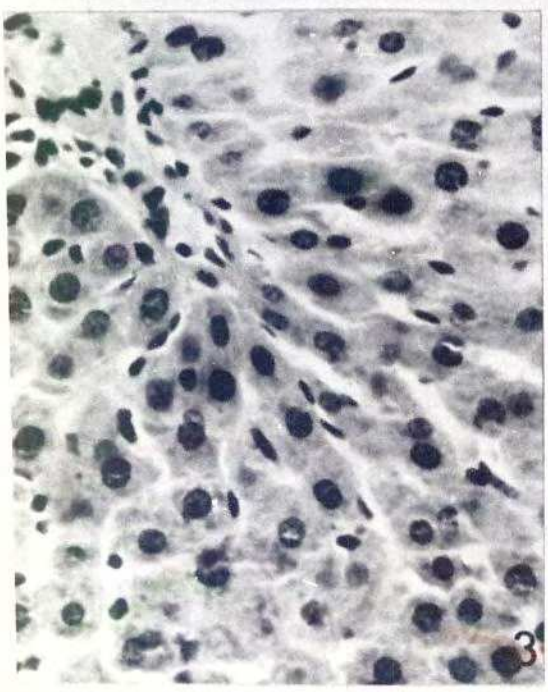
Figs. 4, 5, 6, Região cortical de rim de ratos, após 180 dias de tratamento com NaF. HE, ± 500X.
4- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 5- idem, 100 ppm de Fluor; 6- controle.
Da mesma maneira que no fígado, quando se comparam as várias estruturas presentes, glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais, do animal controle em relação às dos animais tratados, não se consegue evidenciar nenhuma alteração que possa ser atribuída ao Flúor.

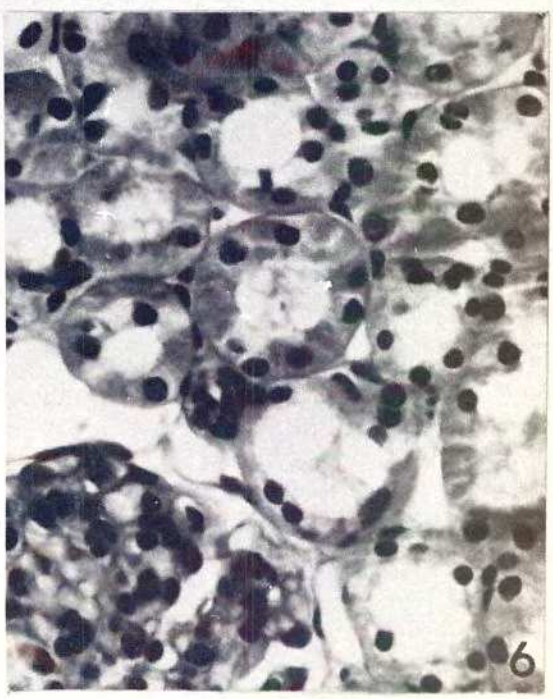

1


4


2


5


3

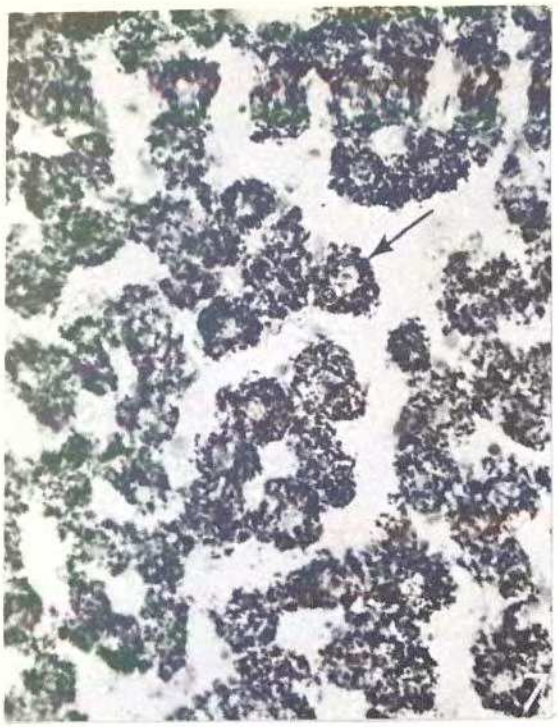

6

- PRANCHA 2 -

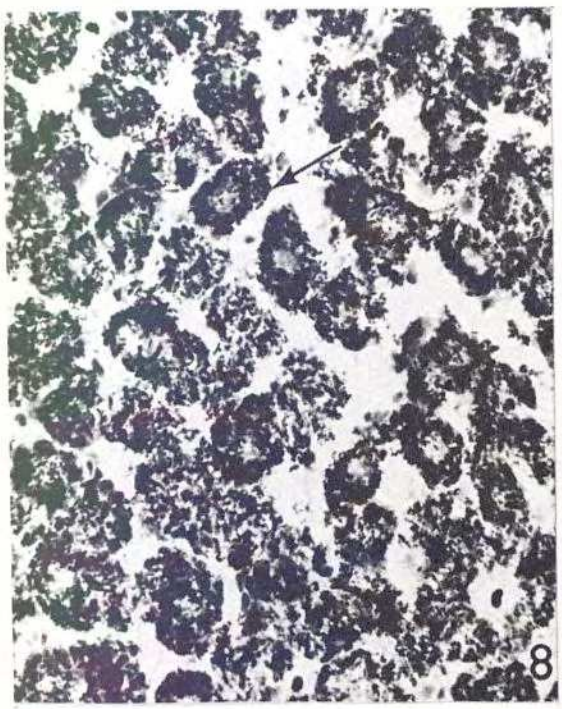
Figs. 7, 8, 9, Cortes de fígado de ratos após 180 dias de tratamento com NaF. Técnica de POLAK para Mitocôndrias, ± 500X.
7- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 8- idem, 100 ppm de Flúor; 9- controle.
As mitocôndrias aparecem na forma de grânulos negros no citoplasma de hepatócitos (setas) e nota-se que há semelhança quanto ao aspecto, distribuição e quantidade destas organelas nos vários cortes.

Figs. 10, 11, 12, Zona cortical de rim de ratos, após 180 dias de tratamento com NaF. Técnica de POLAK para Mitocôndrias, ± 500 X.
10- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 11- idem, 100 ppm de Flúor; 12- controle.
Notam-se, nas células dos túbulos, as mitocôndrias, em forma de grânulos ou bastonetes (setas), impregnados em negro pela prata. Verifica-se também que o aspecto geral dos três cortes é semelhante.

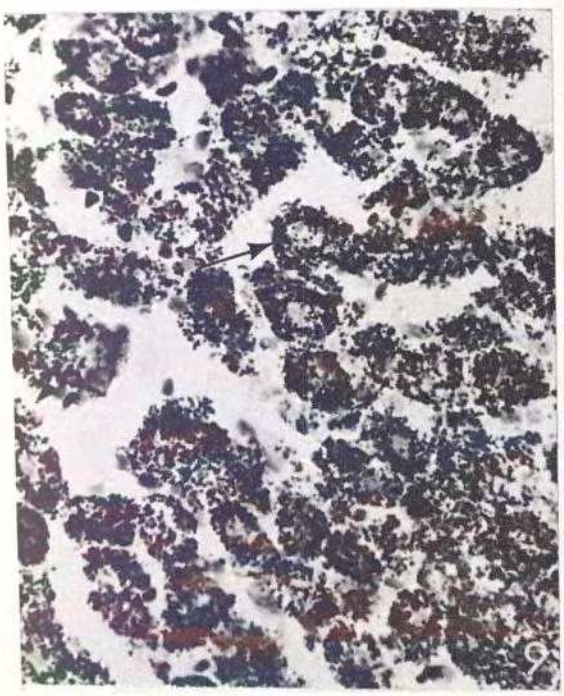
UNICAMP



10


8

11

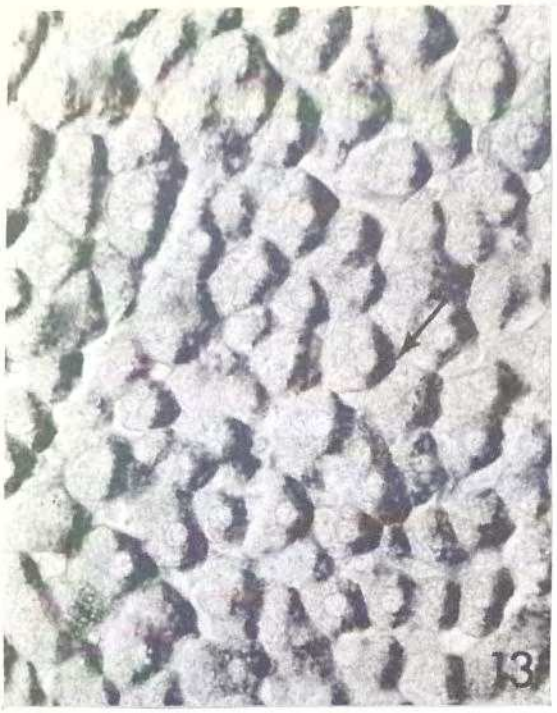

9

12

- PRANCHA 3 -

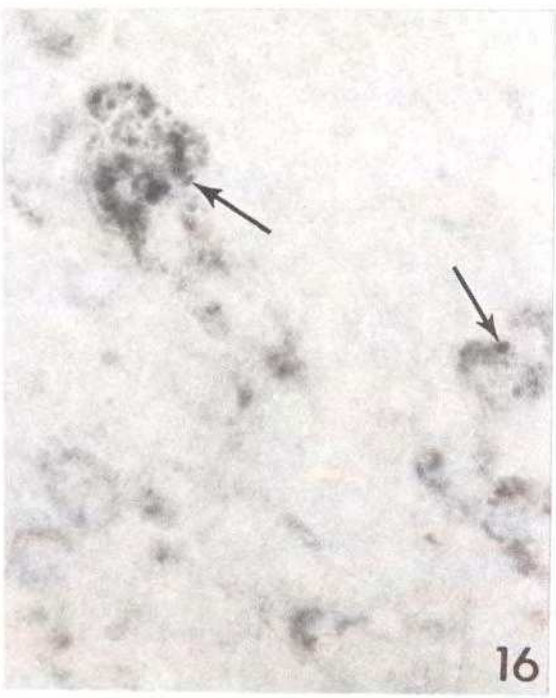
Figs. 13, 14, 15, Fígado de ratos, após 180 dias de tratamento com NaF. PAS, ± 500X.
13- animal que recebeu 1 ppm de Flúor ; 14- idem, 100 ppm de Flúor; 15- controle.
O glicogênio, PAS positivo, com aspecto granular (setas), aparece polarizado nos hepatócitos. Comparando-se as três figuras, não se observa nada que possa ser atribuído à ação do Flúor.

Fig. 16, Corte de fígado de rato após 180 dias de tratamento com a dose de 1 ppm de Flúor. Sudan III, ± 500X.
Notam-se vários hepatócitos com quantidade variável de gotículas de gordura (setas).


13

14

15


16

- PRANCHA 4 -

Figs. 17, 18, 19, Fígado e 20, 21, 22, rim de ratos, após 180 dias de tratamento com NaF. Reação para Fosfatase Ácida, GOMORI, mod. por HOLT et al. ± 500X.

17 e 20 - animal que recebeu 1 ppm de Flúor;

18 e 21 - idem, 100 ppm de Flúor;

19 e 22 - controle.

A reação permite evidenciar os lisosomas que aparecem na forma de grânulos pretos (setas), nas células hepáticas e nas dos túbulos renais. Nota-se a semelhança no aspecto dos cortes, mostrando que o Flúor parece não causar alterações nestas organelas.

17

20

18

21

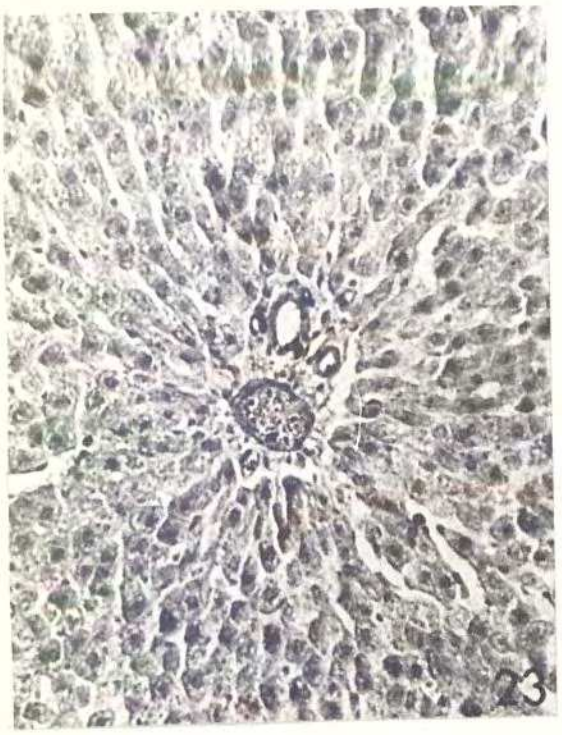
19

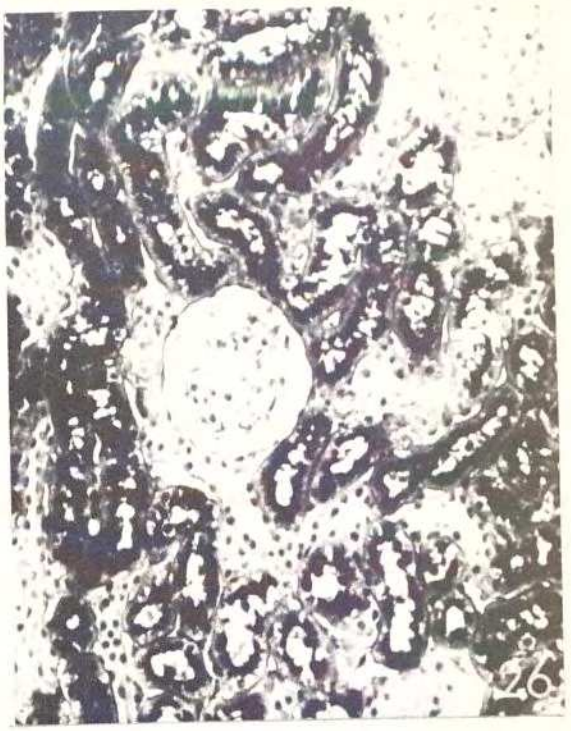
22

- PRANCHA 5 -

Figs. 23, 24, 25, Fígado de ratos após 180 dias de tratamento com NaF. Reação para Fosfatase Alcalina, GOMORI, ± 150X.
23- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 24- idem, 100 ppm de Flúor; 25- controle.
A reação é negativa nos cortes dos três animais. Pode-se notar também que o aspecto estrutural, a semelhança das figs. 1, 2 e 3, é comparável nos 3 cortes.

Figs. 26, 27, 28, Região cortical de rim, após 180 dias de tratamento com NaF. Reação para Fosfatase Alcalina, GOMORI, ± 150X.
26- animal que recebeu 1 ppm de Flúor; 27- idem, 100 ppm de Flúor; 28- controle.
Observa-se um precipitado negro homogêneo nas regiões da bordadura em escova dos túbulos contorcidos proximais, indicando a presença da fosfatase alcalina. As demais estruturas mostram reação negativa. Verifica-se, por comparação dos três cortes, que parece não ter havido influência do tratamento na atividade deste enzima.

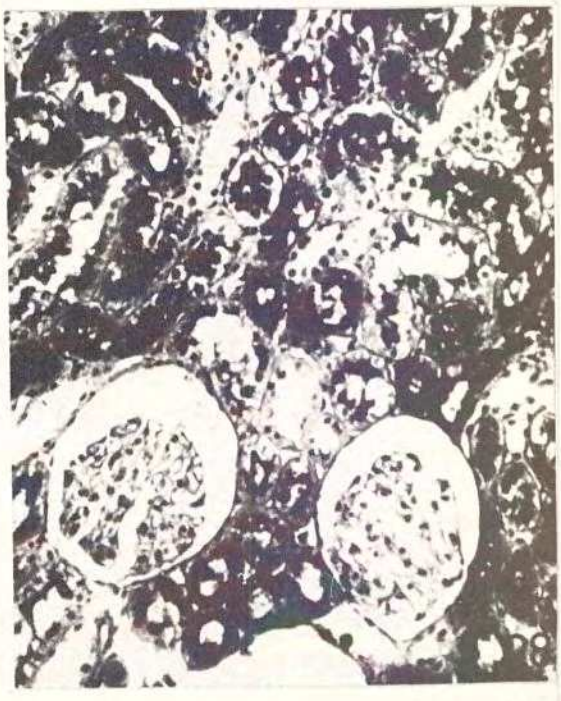

23


26

24

27

25


28

DISCUSSÃO

Para que o Flúor exerça algum efeito, é necessário que um sal solúvel desse halógeno seja absorvido pelo indivíduo. Experimentalmente e na água de abastecimento, tem-se usado quase que exclusivamente o fluoreto de sódio, por ser o sal mais solúvel. O sílico-fluoreto de sódio, o monofluorofosfato de sódio e o fluoreto de estanho, tem sido também empregados.

Um grande número de observações no homem indicou que 90% ou mais de Flúor solúvel ingerido é absorvido através do tubo gastro-intestinal (GOODMAN e GILMAN, 1971). Do Flúor absorvido, aproximadamente a metade aparece na urina, e a outra metada é armazenada nos ossos. A eliminação pela urina é rápida; 20 a 25% da dose administrada foi encontrada na urina de seres humanos de três a cinco horas após a ingestão de 5 mg ou menos de Flúor. Ambos os mecanismos removem o Flúor dos fluidos circulantes de maneira eficiente e rápida (SMITH,1968). Não há evidência de armazenamento de Flúor em tecidos moles, que normalmente contém traços do elemento, cuja concentração não aumenta mesmo após sua administração prolongada.

Desconhece-se o mecanismo pelo qual o Flúor é eliminado através dos rins; presumivelmente, é excreta

do pela urina menos fluoreto do que é filtrado pelos glomérulos, o que parece indicar que há reabsorção tubular. Não se sabe, porém, se há secreção tubular de fluoreto (GOODMAN e GILMAN, 1971).

Embora não haja referências específicas, é de se supor que praticamente todo o Flúor absorvido pela via digestiva passe pelo fígado, razão pela qual esse órgão e os rins têm sido mais visados em estudos dos efeitos tóxicos deste elemento.

Como já foi referido no capítulo de Introdução, é extensa a controvérsia entre os autores em relação aos efeitos do Flúor. Da literatura compulsada, um certo número de trabalhos refere-se apenas a observações perfunctórias, com dados insuficientes, para permitir uma melhor discussão dos resultados apresentados, tanto positivos, como negativos, em relação a alterações histológicas em fígados e rins de animais submetidos a tratamento com Flúor. Por outro lado, a grande maioria dos trabalhos, se prende apenas a observações histológicas comuns, ou seja, exames de cortes dos órgãos com colorações de rotina.

Os nossos resultados, quanto às observações gerais (quantidade de água ingerida, peso, aspecto externo e comportamento do animal, aspecto macroscópico dos órgãos) e histológicos dos fígados e rins, mostra-

ram não haver alterações que pudessem ser atribuídas ao tratamento pelo Flúor, o que está de acordo com os achados de BOSWORTH & MC CAY (1962), NAYLOR & WILSON (1967) e MOUCDCY (1968).

Estas mesmas observações, por outro lado, diferem daquelas de autores referidos por SMITH (1962), (Taylor e Ramseyer) ou MOUCDCY (1968), (Goldenberg e Wadhwani & Ramaswamy), bem como as de MELLO, BARBÉRIO & CAMPOS (1963), HODGE (1964), que administraram o Flúor em animais através da água de beber.

Embora de difícil explicação essas divergências, possivelmente podem ser atribuídas a diferenças de certas condições experimentais. Neste particular,são interessantes as observações de BOSWORTH & MC CAY (1962), que observaram várias alterações renais, que não puderam ser explicadas pela ingestão de NaF, e foram, segundo os autores, condicionadas pela idade e pelo sexo dos animais usados. Foi esta a razão pela qual no presente estudo usamos animais da mesma idade e do mesmo sexo , em condições laboratoriais e de tratamento controlado ao máximo.

Vários autores verificaram alterações no fígado e rim de rato, OGILVIE (1953), D'ANGELO e ESPÓSITO (1965), ou de outros animais, entre os quais BERSOTTI e FRUGIS (1963) e BERSOTTI (1964) em hamsters e PITTO-

RINO (1966) em cobaias, mas usaram métodos diferentes na administração do Flúor, por sonda gástrica, ou através de injeções subcutâneas, intraperitoneais ou endovenosas, com a qual o animal recebe de uma só vez uma dose maciça. Convém referir que, segundo LEONE (1956), a dose letal ($LD_{50}$) endovenosa em ratos é a metade daquela por via oral (23,0 $\pm$ 0,9 mg/Kg e 46,0 $\pm$ 1,6 mg/Kg, respectivamente). Contudo, TEMPESTINI e PAPPALARDO (1965), mesmo usando a sonda gástrica como via de administração,não encontraram alterações nos órgãos estudados e nenhuma manifestação geral de caráter tóxico. Isto indica, também, que condições experimentais diferentes devem ter influenciado.

Os resultados histoquímicos permitiram corroborar as observações histológicas. Com efeito, tanto com métodos para polissacarídeos, como para grupos reativos de proteínas, não se conseguiu observar qualquer alteração em fígado e rim, atribuível ao Flúor.

MOUCDCY (1968), mostrou não haver variações no teor de glicogênio nas células hepáticas dos animais que ingeriram água potável contendo 1 e 7 ppm de Flúor, ao passo que nos que receberam 4 e 10 ppm, houve um aumento significante de glicogênio. Embora o autor não tenha encontrado explicação, essa discrepância notada entre as dosagens, não corroborada pelos resultados do presente

estudo, talvez possa ser explicada por ter sacrificado os animais em horas diferentes do dia, pois é conhecido da existência de rítmo circadiano no metabolismo da célula.

Resultados contraditórios em relação a glicogênio, foram referidos nos trabalhos de BERSOTTI (1964) e TEMPESTINI e PAPPALARDO (1965), onde o primeiro, encontrou nas células hepáticas dos animais tratados, ausência ou escassa presença de glicogênio; e o segundo, a presença abundante deste polissacarídeo. É bem provável que a causa destas variações, seja a mesma já citada em relação à hora de sacrifício dos animais.

MOUCDOY (1968), observou também um aumento significativo do teor de RNA nos hepatócitos de ratos tratados com Flúor, a partir de 1 ppm, sugerindo um possível aumento da síntese protêica por parte dessas células. Como foi referido na análise dos grupos reativos de proteínas, não foi encontrado por nós aumento visível desses grupos nos animais tratados com Flúor.

Somente em relação às gorduras é que se pode observar uma diferença entre nossos animais tratados e os controles. Como já foi referido, até os 90 dias de tratamento, nenhuma alteração foi constatada em qualquer dos lotes. Aos 180 dias, porém, foi notada uma infiltração gordurosa mais frequente em fígado e rim de ratos tratados com Flúor, embora sem relação entre a dose e a quantidade de gordura depositada.

Em ratos, somente MOUCDCY (1968) verificou deposição de gordura no fígado e apenas em animais tratados com água contendo 10 ppm de Flúor, durante 203 dias. Em outros animais, Freund e Wieden, Slaviero, Sanfilippo e Iwami, todos referidos por MOUCDCY (1968), encontraram deposição gordurosa, ao estudarem a ação do Flúor sobre o parênquima hepático.

Como foi observado por nós com menor frequência a infiltração gordurosa em fígados e rins de animais controles, e lembrando as observações de BOSWORTH & MC CAY (1962), quanto ao aumento de alterações renais relacionadas com a idade do animal, podemos admitir com certa reserva, que embora não seja causado especificamente pelo Flúor, o processo de deposição gordurosa tenha sido acelerado pela ação do mesmo.

Embora seja conhecido que o principal efeito tóxico do Flúor, quando administrado em grandes doses, seja o bloqueio de alguns sistemas enzimáticos, principalmente o da fosforilação de glícides (BERSOTTI - 1964) , não encontramos nenhum trabalho de histoquímica de enzimas relacionados à ação do Flúor. Os dois enzimas investigados no presente estudo, as fosfatases ácida e alcalina, mostraram-se normais nos órgãos estudados de animais tratados, quando comparados aos controles.

NAYLOR & WILSON (1967), mostraram ratos que beberam até 100 ppm de Flúor durante 12 a 50 semanas, não apresentaram nenhuma alteração na respiração tecidual de rins. Somente em ratos que receberam 250 ppm é que foi notada a partir da 22ª semana, uma diminuição da respiração tecidual, ao lado de nenhuma alteração morfológica dos rins. Isto está de acordo com as nossas observações feitas em relação às mitocôndrias, cujo aspecto numérico e distribucional foi semelhante nos ratos tratados e controles.

Em resumo, no presente estudo não foram constatados alterações histológicas ou histoquímicas que possam ser atribuídas aos efeitos do Flúor, no fígado e rim de ratos, com a única exceção talvez, da infiltração gordurosa nesses órgãos, observada com maior frequência nos ratos tratados com Flúor quando comparados com os animais controles. Embora não se possa atribuir definitivamente ao Flúor a causa da citada infiltração, não se pode excluir a hipótese de que a água fluoretada tenha acelerado o processo nos animais tratados.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados e do que foi exposto, julga-se possível concluir que:

1) Nos ratos tratados até 180 dias com água contendo 1, 10 e 100 ppm de Flúor, não foi constatada nenhuma anormalidade com relação ao ganho de peso, aspecto externo e comportamento dos animais, bem como quanto ao aspecto macroscópico do fígado e rim;

2) Ao exame microscópico do fígado e rim, não se conseguiu evidenciar:

a) alterações histológicas visíveis com HE, que pudessem ser atribuídas ao halógeno;

b) qualquer alteração quantitativa ou distribucional de mitocôndrias;

c) alterações referentes a polissacarídeos PAS positivos, em particular ao teor de glicogênio nas células hepáticas dos animais em estudo;

d) nenhuma variação em qualquer dos grupos reativos de proteínas estudados;

e) qualquer alteração quantitativa ou distribucional das fosfatases ácida e alcalina.

3) Os resultados obtidos em relação aos lipídeos mostraram:

a) não haver deposição de gordura no fígado e no rim dos ratos tratados durante 90 dias;

b) zonas de deposição de gordura no fígado e rim de ratos tratados durante 180 dias, com uma maior frequência nos animais que receberam Flúor em relação aos controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AST, D. B. - The caries fluorine hypothesis and a suggested study to test its application. Pub. Health Rep., 58: 857, 1943 (apud SMITH, 1962).

BERSOTTI, G. - Rilievo istochimico sulla funzionalitá epatica in animali intossicati cronicamente con fluoro. Ress. Int. Stomat. Prat., 15: 109-113, 1964.

BERSOTTI, G. e FRUGIS, S. - Contributo alla ricerca morfo-strutturale del rene e del fegato fluorotici nella sperimentazione animale. Ress. Int. Stomat. Prat., 14: 21-30, 1963.

BOSWORTH, E. B. and MC CAY, C. M. - Pathologic studies of rat kidneys: absence of effects ascribed to fluoride following long-term ingestion of drinking water containing fluoride. J. D. Res., 41: 949-960, 1962.

COX, G. J. and others - Experimental dental caries . IV. Fluorine and its relation to dental caries. J. D. Res., 18: 481, 1939 (apud SMITH, 1962).

D'ANGELO, M. e ESPÓSITO, U. - Osservazioni istologiche su neonati da ratte intossicate con dosi elevate di NaF. Ann. Stomat. (Roma), 14: 835-842, 1965.

GOODMAN, L. S. and GILMAN, A. - The Pharmacological Basis of Terapeutics. Edited by Goodman, L. S. and Gilman, A. The Macmillan Company, New York, Forth Edition, pag. 825-827,1971.

HODGE, H. C. et al. - Renal effects of fluoride. III. Two year study J. D. Res., 43: 864-865 , 1964.

LEONE, N. C., GEEVER, E. F. & MORAN, N. C. - Acute and subacute toxicity studies of sodium fluoride in animals. D. Abs., 1: 741-742, 1956.

LISON, L. - Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et Methods. Paris, Gauthiers Villars, 3eme Ed., 1960.

MELLO, C. F.; BARBÉRIO, J. C.; CAMPOS, M. A. P. - Influência do ionte cálcio sobre a ação ionte fluoreto no fígado e no rim do rato albino - uma análise histológica. Rev. A.P. C. D., 17 (1-2): 35-39, 1963.

MOUCDCY, A. - Estudo histoquímico (do glicogênio, RNA e lipídeos) e cariométrico de hepatócitos de Rattus Norvergicus var. Albinus (Rodentia, Mammalia), submetidos a tratamento com água potável contendo fluoreto de sódio em várias concentrações. Rev. Fac. Odont. S. Paulo, 6 (3): 197-215, 1968.

MUHLER, J. C. - Fluoride metabolism, in Joseph C.Muhler, editor, Textbook of Biochemistry for dental students. pag. 301, C. V. Mosby Company, St. Louis, 1959 (apud MELLO, 1963).

NAYLOR, M. N. and WILSON, R. F. - The effect of fluoridated drinking water on tissue respiration of rat kidney. J. Oral Ther. Pharm., 3 (4): 316-320, 1967.

OGILVIE, A. L. - Histologic findings in the kidney, liver, pancreas, adrenal, and thyroid glands of the rat following sodium fluoride administration. J. D. Res., 32: 386-397, 1953.

PEARSE, A. G. E. - Histochemistry: theoretical and applied. 2nd. ed., London, J. & A. Churchil Ltda., 1960.

PITTORINO, G. - Fluoro e profilassi della carie dentaria. Ricerche sperimentali dell'azione del fluoro sul rene. Riv. Ital. Stomat., 21: 1379-1388, 1966.

RAMSEYER, W. F. ; SMITH, C. A. H.; MC CAY, C. M.-Effect of sodium fluoride administration on body changes in old rats. J. Gerontol., 12: 14, 1957 (apud SMITH, 1962).

SCHLESINGER, E. R., and others - Newburgh-kingston caries fluorine study. XIII, Pediatric findings after ten years. J. A. D. A., 52: 296,1956 (apud SMITH, 1962).

SMITH, F. A., Ph. D., Rochester, N. Y. - Safety of water fluoridation. J. Amer. Dental Ass., 65 (1-6): 598-602, 1962.

SMITH, F. A.; GARDNER, D. E., and HODGE, H. C. - Investigations on the metabolism of fluoride. III. Effect of acute renal tubular injury on urinary excretion of fluoride by the rabbit. A. M. A. Arch. Indust. Health, 11: 2, 1955 (apud SMITH , 1962).

TAYLOR, J. M. and others - Toxic effects of fluoride on the rat kidney. II. Chronic effects. Toxicol. Appl, Pharmacol., 3: 290, 1961 (apud SMITH , 1962).

TEMPESTINI, O. e PAPPALARDO, G. - Aspetti istologici di organi parenchimatosi di ratti sottoposti all' azione cronica di differenti dosi di NaF. Minerva Stomat:, 14: 121-126, 1965.