

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Vanessa Eid da Silva Cardoso

**RI TMO BI OLÓGI CO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR NO
PLASMA EM HUMANOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de Mestre
em Biologia Funcional e Molecular, na área
de Bioquímica.**

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Co-orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIUNICAMP
	C179r
V	EX
TOMBO BC	67195
PROC.	16.123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	02/03/06

BIB ID: 375726

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C179r **Cardoso, Vanessa Eid da Silva**
Ritmo biológico para as concentrações de flúor no plasma em humanos / Vanessa Eid da Silva Cardoso. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Co-orientador: Hiroshi Aoyama
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

I. Flúor. 2. Plasma. 3. Ritmos biológicos. I. Buzalaf, Marília Afonso Rabelo.
II. Aoyama, Hiroshi. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

BIBLIOTECA CENTRAL DESENVOLVIMENTO COLEÇÃO UNICAMP

Data da defesa: 19/10/2004

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Profa. Dra. Maria Fernanda Borro Bijella

VANESSA EID DA SILVA CARDOSO

14 de fevereiro de 1976

Nascimento

Bariri – SP

Filiação

Gildasio Batista da Silva

Yvonne Eid da Silva

1995 – 1998

Curso de Graduação em
Odontologia Universidade Estadual
Paulista, Araçatuba.

2003 – 2004

Curso de Pós-Graduação em
Biologia Funcional e Molecular ao nível de
Mestrado, Área de Bioquímica – Universidade
Estadual de Campinas.

2003 – 2004

Bolsista FAPESP.

Associações

SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisas
Odontológicas.

Onde há verdades padronizadas, não há ciência

Nelson Werneck Sodré

DEDICO ESTE TRABALHO

À Deus,

Pelo amor incondicional...

“e conhecer o amor de Cristo, que excede todo entendimento

... Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos, ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós,

a ele seja a glória... para todo o sempre”. (Efésios 3:19-21)

Ao Clóvis,

Pela doce certeza do amar.

Aos meus pais, Gildasio e Yvonne, e à Juliana, minha irmã,

Pelo amor e entrega.

Aos meus amigos e familiares,

De ontem, hoje, sempre..., e aos que vão chegar

A vocês, que pela certeza do meu amar, os nomes não preciso citar

Mesmo porque, por todos os momentos que compartilhamos, nos fizemos mais que
companheiros, irmãos, cúmplices,...em Cristo nos fizemos Um

E assim, como saberia eu que nome usar?

De A a Z, entre infinitas opções, somos um, bem o sabem

Seus nomes, não preciso citar ...

“Pois a vontade de Deus revelada em Jesus é que sejamos um”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pelo meu aceite em seu laboratório, proporcionando-me inúmeras oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

À Marília, por sua ética, competência, maestria, sensibilidade, ..., exemplos estes que fazem dela assim, tão única, e muito mais que uma simples professora e orientadora.

Aos meus voluntários,

Ana Cristina, Aldivino, Clóvis, Edivaldo, Esther, Graciela, Juliana, Vanusa, Vilson,

Por tudo o que fizeram, com amor, carinho, companheirismo, compreensão, ...

A vocês, meu eterno reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Gary Milton Whitford,

Pela excelência científica compartilhada.

À Universidade Estadual de Campinas, que me recebeu na maravilhosa pessoa do Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, meu co-orientador, da Profa. Dra. Carmen Verríssima Ferreira, e de todos os amigos do Laboratório de Enzimologia.

Ao Prof. Hiroshi,

Meu eterno agradecimento,

Pela coragem e pronta disposição em ter me aceitado, sem mesmo me conhecer

Pelo encorajamento nesta fascinante busca pelo universo da Bioquímica, respeitando-me em minha ignorância

Obrigada pelo modelo diário de amizade e competência.

À Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira, à Profa. Dra. Eneida de Paula e à Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva,

Por nos conduzirem à compreensão da Bioquímica que não está nos livros, mas no viver da Disciplina, com dedicação e amor.

Às secretárias do Instituto de Biologia,

Andreia e Marina,

Pela dedicação e amizade

Pelo sorriso na recepção, nos fazendo sentir em casa.

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, por me oferecer toda a estrutura para a realização deste trabalho.

À todos os amigos do laboratório, pelo carinho, companheirismo, compreensão, ...

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro,

Pelos exemplos de companheirismo, dedicação, competência, seriedade, profissionalismo, liderança, ...

Aos funcionários do laboratório,

Ovídio dos Santos e Thelma Lopes da Silva,

Pela convivência, respeito, atenção, dedicação, amizade, ...

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris,

Pela preciosa análise estatística.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP,

Pelo reconhecimento da importância deste projeto

Pelos incentivos concedidos nas modalidades Bolsa de Mestrado e Auxílio à Pesquisa (Proc. nº 02/10361-6 e 02/10489-2, respectivamente)

Pelo imprescindível apoio em todas as fases deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas.....	xiv
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvi
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxii
1 Introdução Geral.....	2
1.1 Química do Flúor.....	2
1. 2 Aspectos Clínicos do Flúor.....	3
1.3 Metabolismo do Flúor.....	7
1.3.1 Absorção.....	8
1.3.2 Distribuição.....	10
1.3.3 Excreção Renal.....	12
1.4 Ritmicidade Biológica.....	15
1.5 Ritmicidade Biológica para o Flúor.....	16
1.6 Hormônios da Atividade Óssea.....	20
1.7 Flúor no Plasma.....	23
2 Objetivos.....	29
3 Material e Métodos.....	31
3.1 Protocolo de Estudo.....	31
3.2 Coleta de Sangue.....	33
3.3 Coleta de Urina.....	33
3.4 Coleta da Dieta Duplicada.....	34

3.4.1	Elaboração da Dieta.....	34
3.4.2	Coleta da Dieta Duplicada.....	35
3.5	Procedimento Analítico.....	35
3.5.1	Plasma.....	35
3.5.2	Urina.....	37
3.5.3	Dieta.....	37
3.5.4	Hormônios da Atividade Óssea.....	39
3.5.5	Cálcio e Fósforo.....	39
3.5.6	T3 e T4 livre e TSH.....	40
3.5.7	Análise Estatística.....	40
4	Resultados.....	43
5	Discussão.....	64
6	Conclusões.....	83
	Referências Bibliográficas.....	85
Anexo 1		107
Anexo 2		109

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

[Ca²⁺] – concentração do íon cálcio

[F] – concentração do íon flúor

[PTH] – concentração de paratormônio

CDTA – ácido ciclo hexano diamino tetracético

CO₂ – dióxido de carbono

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HF – ácido fluorídrico

HMDS – hexametil-disiloxano

KCl – cloreto de potássio

NaOH – hidróxido de sódio

PTH – hormônio paratireoideano (paratormônio)

TISAB – tampão de ajuste de força iônica total

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema do protocolo experimental.....	32
Tabela 2 – Concentração média de flúor no plasma em função do dia e dos horários de coleta de sangue.....	45
Tabela 3 - Concentração plasmática de flúor em função do horário de coleta de sangue ao longo de cada dia para cada voluntário.....	50
Tabela 4 - Média da concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, da concentração sérica de PTH, da quantidade de flúor excretado na urina e do fluxo urinário de flúor.....	75
Tabela 5 - Correlação entre os parâmetros avaliados em todos os voluntários.....	76
Tabela 6 - Correlação múltipla entre as médias das concentrações de flúor no plasma (variável dependente) e outros parâmetros avaliados (variáveis independentes) para cada voluntário e para todos os voluntários.....	77
Tabela 7 - Concentrações médias de calcitonina, T3 e T4 livre, e TSH no soro.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral das vias de distribuição e eliminação do flúor no organismo superposto a uma curva de concentração de flúor no plasma em função do tempo.....	9
Figura 2 - Mecanismo de reabsorção tubular do flúor, na forma de HF.....	14
Figura 3 – Placa de Petri com vaselina.....	39
Figura 4 – Colocação das 3 gotas de NaOH.....	39
Figura 5 – Inserção do HMDS pelo orifício.....	39
Figura 6 – Padrões pré-difundidos e difundidos prontos para agitação.....	39
Figura 7 – Mesa agitadora (velocidade 3- 4).....	39
Figura 8 – Eletrodo Orion 9409 e mini-eletrodo de referência calomelano.....	39
Figura 9 Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental.....	46
Figura 10 Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro dia e do segundo ao quinto dia.....	48
Figura 11. Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue	51
Figura 12. Perfil das variações das concentrações médias de flúor no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. A) média dos 5 dias para cada voluntário; B a F) perfil diário para V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente.....	52

Figura 13. Concentração de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental.....	53
Figura 14. As concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dia.....	54
Figura 15. Concentração de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue.....	56
Figura 16. Perfil das variações das concentrações de PTH no soro ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente.....	57
Figura 17. Concentração de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental.....	58
Figura 18. Perfil das variações das concentrações de Ca^{2+} no plasma ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia.....	59
Figura 19. Concentração de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue..	61
Figura 20. Perfil das variações das concentrações de Ca^{2+} no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente.....	61
Figura 21. Concentração de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental.....	62
Figura 22. Perfil das variações das concentrações de fósforo no plasma ao longo do para o primeiro e do segundo ao quinto dia.....	63
Figura 23. Concentração de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue.....	65
Figura 24. Perfil das variações das concentrações de fósforo no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente.....	65
Figura 25. Excreção de flúor pela urina em função dos horários de coleta em cada dia experimental.....	66

Figura 26. Perfil das variações das concentrações de flúor excretadas pela urina ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia.....	67
Figura 27. Perfil das variações das concentrações médias de flúor excretadas pela urina ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5).....	69
Figura 28. Perfil das variações das concentrações de flúor excretadas pela urina ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente.....	69
Figura 29. Fluxo urinário em função dos horários de coleta em cada dia experimental.....	70
Figura 30. Perfil do fluxo urinário ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia. Os dados estão mostrados como fluxo urinário médio.....	71
Figura 31. Perfil das variações do fluxo urinário médio dos 5 voluntários ao longo do dia. Os dados estão mostrados como média do fluxo urinário.....	73
Figura 32. Perfil das variações do fluxo urinário ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente.....	73

RESUMO

Neste estudo com 5 voluntários (27-33 anos), a existência de uma ritmicidade biológica para as concentrações de flúor (F) no plasma foi avaliada. Os voluntários se abstiveram do uso de produtos dentais fluoretados por 30 dias antes do estudo e receberam uma dieta com baixa concentração de F ([F]) ($< 0,3$ mg/dia) para minimizar as alterações na [F] no plasma relacionadas à dieta durante os 5 dias deste estudo. As amostras de plasma foram coletadas a cada 3 h das 8 às 20 h. A urina foi coletada a cada 3 h das 8 às 20 h, e adicionalmente das 20 às 8 h. Um eletrodo específico foi usado para medir o F no plasma após difusão facilitada por hexametil-disiloxano. O F na urina foi analisado pelo método direto após adição de tampão de ajuste de força iônica total. Paratormônio (PTH) e calcitonina séricos foram analisados por quimioluminescência e imunorradioimetria, respectivamente. Ca^{2+} e P no plasma foram analisados por espectrometria de absorção atômica e colorimetricamente, respectivamente. Um ritmo biológico para a [F] no plasma foi encontrado ($p=0,0029$). O pico da [F], $0,55 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/L}$, ocorreu às 11 h, e a menor [F], $0,50 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/L}$ ocorreu entre as 17 e as 20 h. A [F] no plasma se correlacionou positivamente às taxas de excreção urinária de F ($p=0,0008$) e aos níveis de PTH no soro ($p=0,0252$), que também mostrou um ritmo biológico ($p=0,0004$). Os níveis de PTH no soro se correlacionaram positivamente às taxas de excreção urinária de F ($p=0,0087$). Os resultados mostram a existência de uma ritmicidade biológica na [F] do plasma em humanos, e sugere que o PTH e o sistema renal estão envolvidos em sua regulação.

ABSTRACT

In this study with 5 subjects (27-33 years old) the existence of a biological rhythmicity for the plasma fluoride concentration ([F]) was evaluated. The subjects refrained from using F dental products for 30 days prior to the study and received a low-F diet (<0.3 mg/day) to minimize diet-related changes in plasma [F] during the 5 days of the study. Plasma samples were collected every 3 h from 8 am to 8 pm. Urine was collected every 3 h and additionally from 8 pm to 8 am. A specific electrode was used to measure plasma F after HMDS-facilitated diffusion. Urine F was analyzed by the 'direct' method after adding total ionic strength adjustment buffer-(TISAB). Serum PTH and calcitonin were analyzed by chemiluminescence and immunoradiometry, respectively. Plasma Ca^{2+} and P were analyzed by AAS and colorimetry, respectively. A biological rhythmicity for plasma [F] was found ($p=0.0029$). The peak [F], $0.55 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$, occurred at 11 am and the lowest [F], $0.50 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$ occurred between 5 pm and 8 pm. Plasma [F] was positively correlated with urinary F excretion rates ($p=0.0008$) and with serum PTH levels ($p=0.0252$) which also showed a biological rhythm ($p=0.0004$). Serum PTH levels were positively correlated with urinary F excretion rates ($p=0.0087$). The results show the existence of a biological rhythmicity for plasma [F] in humans and suggest that PTH and renal system are involved in its regulation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Química do flúor

O flúor foi descoberto por Scheele, no ano de 1771, através da observação da formação do ácido fluorídrico (HF) pela reação espato-flúor – fluoreto de cálcio, calcita – e ácido sulfúrico. A natureza deste ácido foi desconhecida durante muitos anos, devido à sua reação com o vidro dos equipamentos químicos de laboratório, formando o ácido fluossilícico. O flúor foi finalmente isolado em 1886, por Moissan, através da eletrólise do HF em uma lâmina de platina (EMMERICH; FREIRE, 2003).

O flúor, um elemento gasoso e não metálico, juntamente com cloro, bromo, iodo e astato, pertence à família ou grupo dos halogênios. Seu símbolo é F, número atômico 9 e peso atômico 18,998 (EMMERICH; FREIRE, 2003). O flúor é a forma iônica da fluorina. É um componente natural da biosfera, sendo o 13º elemento mais encontrado na crosta terrestre. Pode também entrar na atmosfera pela ação vulcânica e retorna à superfície da terra pela deposição das cinzas, pela chuva, nevada ou neblina (EMMERICH; FREIRE, 2003; SMITH; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Devido ao pequeno raio do átomo do flúor, sua carga de superfície efetiva é maior que a de qualquer outro elemento. Como consequência, o flúor é o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica (SMITH; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

Entre os halogênios, o flúor é diferente em vários aspectos. Por sua extrema reatividade, o flúor raramente ocorre na natureza em sua forma livre ou elementar. Ele reage prontamente com seu ambiente, e é mais freqüentemente encontrado como flúor inorgânico

(SMITH; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). De fato, em temperaturas apropriadas, o flúor ataca diretamente todos os elementos, exceto o oxigênio e o nitrogênio. O potencial padrão do íon fluorina-flúor é de +2,8 v, indicando que a fluorina elementar não pode ser produzida por oxidação química dos íons flúor ou por eletrólise de soluções contendo outro elemento negativo além do flúor. Ao contrário dos outros halogênios, a fluorina é exclusivamente monovalente. Os estados comuns para o átomo de fluorina em combinação são a forma iônica F^- e a forma eletrovalente ou covalente. Os fluoretos metálicos são usualmente iônicos na natureza, com pontos de fusão e ebulição geralmente maiores aos dos outros halogênios correspondentes. Grande parte dos fluoretos iônicos são prontamente solúveis em água, embora os fluoretos de lítio, alumínio, estrôncio, bário, magnésio, cálcio (Ca^{2+}) e manganês sejam pouco solúveis. Compostos covalentes extremamente estáveis são formados com não-metais, como tetrafluoreto de sílica e hexafluoreto sulfúrico. Os fluoretos covalentes geralmente apresentam pontos de fusão e ebulição menores que seus correspondentes cloretos e brometos (SMITH; EKSTRAND, 1996).

O flúor é um potente inibidor de várias enzimas (BAYKOV; ALEXANDROV; SMIRNOVA, 1992; EASTOE; FEJERSKOV, 1984 apud AOBA; FEJERSKOV, 2002; MILAN; WADDINGTON; EMBERY, 2000; THIBODEAU; BOWEN; MARQUIS, 1985; WHITFORD, 1996, 1997). A velocidade de sua eliminação do organismo pelos rins é muitas vezes maior que a dos outros halogênios (WHITFORD, 1996).

1.2 Aspectos clínicos do flúor

O papel do flúor no combate à cárie dentária é conhecido desde a década de 1870 (HUNSTADBRATEN, 1982). Ele tem sido utilizado na água de beber, suplementos e produtos

de higiene oral (BRAMBILLA, 2001; FOMOM; EKSTRAND; ZIEGLER, 2000; ISMAIL, 1994; JOHNSTON, 1994; ROLLA; OGAARD; CRUZ, 1991; TABARI et al., 2000; TOUMBA, 2001; ZIMMER, 2001).

O declínio da cárie dentária em diferentes partes do mundo é explicado, em grande parte, pela utilização do flúor (Correia Sampaio et al., 1999; Fomon; Ekstrand; Ziegler, 2000; Glass, 1982; Hunstadbraten, 1982; Levy et al., 2001; Pereira et al., 2000; Renson, 1986; Robinson et al., 2004; Sjögren; Birkhed, 1993; ten CATE, 2004). Essa descoberta foi feita comparando-se a incidência de cárie em indivíduos expostos a altas concentrações de flúor na água de abastecimento, com a de indivíduos expostos a baixos níveis (BLACK, MACKAY, 1916; Dean, 1934; DEAN et al., 1942).

A ação terapêutica do flúor se deve ao fato de o flúor inibir a desmineralização do esmalte dentário quando presente em solução (Arends; Christoffersen, 1990; Featherstone, 1999; Featherstone et al., 1990; Nelson et al., 1983; Ogaard et al., 1988; Ogaard et al., 1991; ten CATE; Featherstone, 1991), acelerar a remineralização (Arends; Christoffersen, 1990; Lamb et al., 1993) e inibir as bactérias da placa dentária (Hamilton, 1990; Hamilton; Bowden, 1996; van Louveren, 1990; Whitford et al., 1977), embora esta última ação não tenha sido comprovada clinicamente.

Um longo tempo decorreu para se mostrar que a fluoretação da água (EMMERICH; FREIRE, 2003; McCLURE, 1970; VIEGAS et al., 1987; WHO, 1994) e que os produtos fluoretados tópicos (BRAMBILLA, 2001; ERICSSON, 1977; ISMAIL, 1994; JOHNSTON, 1994; ROLLA; OGAARD; CRUZ, 1991; TOUMBA, 2001; ZIMMER, 2001) eram medidas tão importantes para o controle da cárie dentária ao nível comunitário (KARGUL; CAGLAR; TANBOGA, 2003). Em todo o mundo, 39 milhões de pessoas consomem água naturalmente fluoretada, e mais de 317 milhões consomem água com flúor adicionado (LENNON, 2000). Os

Relatórios Semanais de Morbidade e Mortalidade americanos, do Centro de Controle das Doenças, descrevem a fluoretação da água entre as dez maiores medidas de Saúde Pública no mundo (CDC, 2001). Dentifrícios fluoretados e as mudanças nas formulações dos dentifrícios foram estabelecidas nos anos 80, e o acesso a eles pode ser uma medida barata de importância substancial (KARGUL; CAGLAR; TANBOGA, 2003).

Embora a fluoretação da água e o uso de dentifrício fluoretado sejam as maneiras mais eficientes e de custo-benefício na prevenção de cárie dentária, a exposição a eles tem sido inconsistentemente associada a efeitos adversos ou tóxicos, como reações alérgicas, fratura óssea e problemas com o desenvolvimento ósseo, câncer, defeitos congênitos, desordens genéticas como síndrome de Down, déficit do quociente de inteligência, demência senil e fluorose dentária (BUCHER et al., 1991; KAMINSKY et al., 1990). Contudo, os resultados destes estudos não oferecem evidências convincentes de que a ingestão crônica de quantidades relativamente pequenas de flúor influencia qualquer um destes efeitos adversos, exceto a fluorose dentária (McDONAGH et al., 2000).

Os efeitos *in situ* do flúor ingerido na mineralização do esmalte têm sido descritos como responsáveis pela formação de distúrbios na formação dos dentes, conhecidos como esmalte mosqueado ou fluorose dentária (DEAN, 1934, 1942; DEAN; ELVOVO, 1935; CUTRESS; SUCKLING, 1990; PINDBORG, 1982). A fluorose dentária é o resultado de um aumento gradual na hipomineralização da subsuperfície do dente, coberta por uma superfície externa de esmalte bem mineralizada. Embora o arranjo estrutural dos cristais pareça normal, o flúor afeta o esmalte em formação, especialmente na fase de maturação, causando porosidade, ou seja, ampliando lacunas entre os filetes de esmalte e alargando os espaços intercristalinos em parte dos filetes (FEJERSKOV; JOHNSON; SILVERSTONE, 1974; FEJERSKOV et al., 1994; FEJERSKOV et al., 1975; FEJERSKOV; THYLSTRUP; LARSEN, 1977;

THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1978). Com o aumento da severidade, a subsuperfície do esmalte ao longo de todo o dente torna-se grandemente porosa, as lesões se estendem através do esmalte interno, e o conteúdo de flúor aumenta (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1990; RICHARDS; KRAGSTRUP; NELSEN-KUDSK, 1985; SPEIRS, 1986; ROBINSON, 2004).

Contudo, os efeitos benéficos do flúor não devem ser limitados ao meio bucal. O flúor apresenta uma habilidade única em estimular a formação de osso *de novo*, sendo um agente anabólico efetivo no tratamento da osteoporose (Riggs; Melton, 1988; Riggs et al., 1990), uma desordem óssea sistêmica que leva a um decréscimo da mineralização óssea e a uma propensão à fratura (DeSantis; Buchman, 2002).

O fluoreto de sódio estimula a formação óssea nos níveis celular (KASSEN; MOSEKILDE; ERIKSEN, 1993, 1994) e tecidual (ERIKSEN; MOSEKILDE; MELSEN, 1985) na maioria das espécies, levando a um balanço positivo por ciclo de remodelação (ERIKSEN; MOSEKILDE, MELSEN, 1985), a um aumento no volume do osso trabecular (BRIANCON; MEUNIER, 1981; ERIKSEN; MOSEKILDE; MELSEN, 1985; GERSTER et al., 1983), e a um balanço global positivo do Ca^{2+} (CHARLES; MOSEKILDE; TAAGEHOJ JENSEN, 1985).

Em concentrações terapeuticamente relevantes, como em níveis micromolares, o flúor estimula a proliferação e a atividade celular *in vitro* e *in vivo* (FARLEY; WERGEDAL; BAYLINK, 1983; KLEEREKOPER; MENDLOVIC, 1993). Doses de flúor de 23 a 36 mg (50 a 80 mg de fluoreto de sódio) são administradas diariamente para o tratamento da osteoporose (BAYLINK et al., 1983; FARLEY et al., 1987; KLEEREKOPER; MEENDLOVIC, 1993; RIGGS et al., 1990; RIGGS et al., 1994), tanto sozinhas como combinadas com estrogênio, calcitonina e Ca^{2+} (RAISZ; KREAM, 1983), com Ca^{2+} e vitamina D (CHARLES; MOSEKILDE; TAAGEHOJ JENSEN, 1985; ERIKSEN; MOSEKILDE; MELSEN, 1985; KASSEM; MOSEKILDE; ERIKSEN,

1993, 1994), com pamidronito (MORABITO et al., 2003), com alendronato ou tibolona (CRANDALL, 2002) com citrato de Ca^{2+} e colecalciferol (RUBIN et al., 2001) entre outros. Pak et al. (1986) e Resch et al. (1994), observaram em pacientes com osteoporose que a concentração sérica de flúor se situava numa faixa terapêutica quando a eles era administrado preparações de flúor de liberação lenta. Considera-se que a concentração terapêutica ótima de flúor no plasma, medida 24 horas após a ingestão da última dose de fluoreto de sódio, é de 5 a 10 μM (HASLING et al., 1987; TAVES, 1970).

Entretanto, a falta de eficácia anti-fratura consistente tem tornado a terapêutica do flúor controversa no tratamento da osteoporose (CAVERZASIO; PALMER; BONJOUR, 1998; LAU; BAYLINK, 1998). Uma redução da dose diária de flúor utilizada no tratamento da osteoporose poderia possibilitar uma redução das taxas de fratura vertebral (GUTTERIDGE et al., 2002; RIGGS et al., 1994).

1.3 Metabolismo no flúor

A concentração de flúor no plasma é normalmente muito baixa, e aumenta apenas discretamente com a ingestão de altos níveis de flúor (WHITFORD, 1996). Acredita-se que não exista uma regulação homeostática do metabolismo do flúor e os níveis plasmáticos refletem o balanço entre a quantidade e a frequência de sua ingestão e o “clearance” (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

O entendimento dos efeitos biológicos do flúor no organismo humano requer o conhecimento do seu metabolismo. Para isto, é necessário ter em mente que o flúor se combina reversivelmente com íons hidrogênio para formar o HF, um ácido fraco com pK_a de 3,45. De fato, muito do comportamento fisiológico do flúor pode ser explicado com base na

difusibilidade do HF. Há muitas evidências mostrando que vários aspectos do metabolismo do flúor são pH-dependentes, e que a migração transmembrana do íon ocorre na forma de HF, em resposta a diferenças na acidez entre compartimentos adjacentes de fluidos corporais (EKSTRAND, 1996; MESSER; OPHAUG, 1991, 1993; NOPAKUN; MESSER; VOLLER, 1989; WHITFORD, 1996; WHITFORD; PASHLEY, 1984). Estudos com membranas lipídicas de bicamada mostraram que o coeficiente de partição do HF é mais que um milhão de vezes mais alto que o do flúor iônico (GUTKNECHT; WALTER, 1981).

A absorção do flúor, sua distribuição aos tecidos moles e incorporação aos tecidos mineralizados, bem como sua excreção renal são, em princípio, simultâneos (Figura 1). Em adição, as diferentes taxas para cada um desses processos irá influenciar a concentração de flúor no plasma após sua ingestão (EKSTRAND, 1996).

1.3.1 Absorção

Uma vez ingerido, o flúor é rapidamente absorvido no trato gastro-intestinal, sendo essa absorção passiva e independente de mecanismos especiais de transporte (Ekstrand, 1996; Whitford, 1990, 1996). O tempo médio para absorção é de cerca de 30 minutos (Whitford, 1996). Após a absorção, os níveis plasmáticos de flúor aumentam rapidamente, atingindo um pico entre 20 e 60 minutos (Ekstrand, 1996; Whitford, 1990, 1996). Este período é independente da quantidade de flúor ingerida. A concentração de flúor neste pico depende da quantidade ingerida, proporção de absorção, volume de distribuição e das proporções de “clearance” ou eliminação do flúor do plasma pelos rins e pelo esqueleto. Após este pico, as concentrações de flúor no plasma declinam rapidamente, devido à contínua incorporação do flúor ao osso e à excreção urinária (Figura 1) (Ekstrand, 1996; Whitford, 1990, 1996).

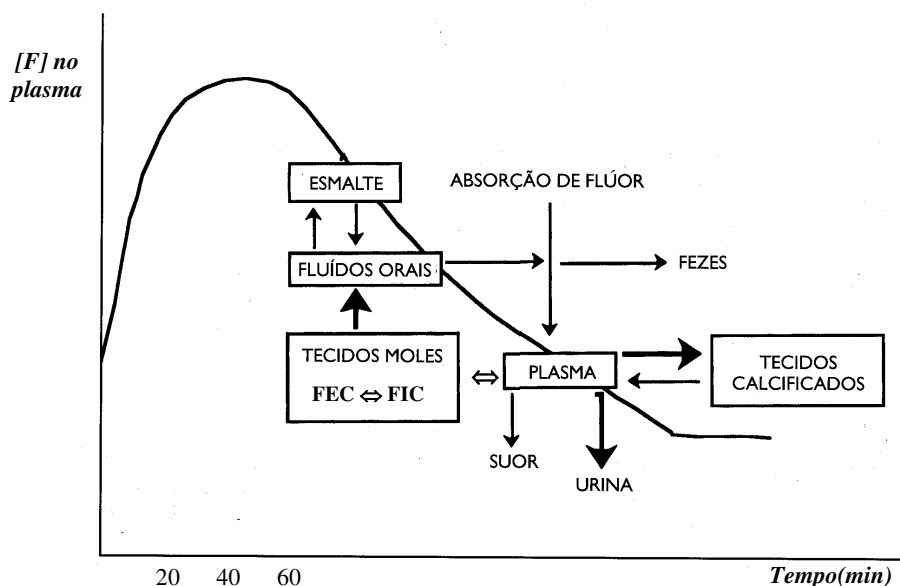


Figura 1. Esquema geral das vias de distribuição e eliminação do flúor no organismo superposto a uma curva de concentração de flúor no plasma em função do tempo (BUZALAF, 2002, adaptado de WHITFORD, 1996).

Enquanto os fluoretos solúveis em soluções aquosas são completamente absorvidos (EKSTRAND, 1996), fatores como a acidez gástrica (MESSER; OPHAUG, 1991, 1993; NOPAKUN; MESSER; VOLLER, 1989; WHITFORD; PASHLEY, 1984), a acidez do produto fluoretado (EKSTRAND et al., 1981), a presença de altas concentrações de certos cátions bi ou trivalentes, como Ca^{2+} , magnésio e alumínio, que formam compostos insolúveis com o flúor (CREMER; BUTTNER, 1970; EKSTRAND; EHRNEBO; BORÉUS, 1978; GLEMSE, 1986; PATZ; HENSCHLER; FICKENSCHER, 1977 apud FEJERSKOV; EKSTRAND; SPAK; EKSTRAND; ZYLBERSTEIN, 1982; TRAUTNER; EINWAG, 1989; TRAUTNER; SIEBERT, 1986), a ingestão de altos níveis de gordura, aumentando a permanência do bolo alimentar no estômago (BUTTNER; MUHLER, 1958; MILLER; PHILLIPS, 1955), bem como a ingestão de flúor com

outros alimentos (EKSTRAND; EHRNEBO, 1979; TRAUTNER; EINWAG, 1989), ou o tempo da ingestão de flúor em relação à última refeição (EKSTRAND; SPAK; VOGEL, 1990), podem alterar a biodisponibilidade e a solubilidade do flúor ingerido. Na ausência desses interferentes, cerca de 80-90% da quantidade de flúor ingerida é absorvida a partir do trato gastro-intestinal (WHITFORD, 1996).

A absorção se dá por difusão passiva (WHITFORD et al., 1976; Whitford; Pashley, 1984). Quando o flúor iônico entra no ambiente ácido do lúmen estomacal, ele é amplamente convertido em HF ($H^+ + F \rightleftharpoons HF$), uma molécula sem carga que rapidamente atravessa as membranas biológicas, incluindo a mucosa gástrica (Ekstrand, 1996). Aproximadamente 25% da absorção do flúor ocorre no estômago, e 75% no intestino delgado (Nopakun; Messer; Voller, 1989). A absorção pelo estômago está diretamente relacionada ao pH, e quanto maior a acidez, mais rápida será a absorção e maior será o pico plasmático (Whitford; Pashley, 1984). No intestino, a absorção de flúor é independente do pH (Whitford, 1990).

1.3.2 Distribuição

O compartimento central do metabolismo do flúor é o plasma, pelo qual o flúor deve passar para sua subsequente distribuição e eliminação (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

O flúor distribui-se rapidamente pelo organismo. Após a ingestão, os níveis plasmáticos geralmente começam a aumentar depois de 10 minutos, atingindo o pico após 20 a 60 minutos e então voltam aos níveis de pré-ingestão depois de 3 a 11 horas, dependendo da dose (HODGE; SMITH, 1965 apud WHITFORD, 1996; WHITFORD, 1996).

As concentrações de flúor intracelulares são de 10 a 50% mais baixas que aquelas presentes no plasma, mas mudam simultaneamente e na mesma proporção daquelas do plasma (WHITFORD; PASHLEY; REYNOLDS, 1979). Uma vez que o gradiente de pH entre os meios intra e extracelular pode ser aumentado ou diminuído pela alteração do pH extracelular, é possível promover a entrada ou a saída de flúor nas células. Essa é a base para a sugestão de que a alcalinização dos fluidos corporais seja um bom coadjuvante no tratamento da toxicidade aguda pelo flúor (WHITFORD; PASHLEY, REYNOLDS, 1979).

Aproximadamente 99% do flúor retido no organismo está associado aos tecidos mineralizados, principalmente ao osso, mas também ao esmalte e à dentina. A concentração de flúor de todo o esmalte reflete o nível de exposição durante a formação dos dentes, enquanto que as concentrações presentes na dentina e no osso são geralmente proporcionais à ingestão ao longo do tempo (WHITFORD, 1994a).

As razões para a aparente seletividade do flúor aos tecidos ósseo e dentário, e esmalte em particular, têm sido relacionadas às interações entre os íons flúor e o mineral ósseo, a hidroxiapatita. O flúor é o mais eletronegativo dos elementos e o de menor raio iônico. Sua resultante densidade de carga lhe confere uma grande capacidade de formar ligações iônicas fortes e pontes de hidrogênio. Isso confere ao íon flúor um potencial para interagir tanto com a fase mineral quanto com as macromoléculas orgânicas (ROBINSON et al., 2004).

O flúor não se liga irreversivelmente ao osso, sendo liberado durante a remodelação óssea ou após mudanças consideráveis na exposição diária ao flúor (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1990, 1996). O “clearance” do flúor do plasma pelo esqueleto ocorre rapidamente. Em adição, vários autores vêm relatando, de longa data, que a incorporação de flúor pelo osso é inversamente relacionada à idade (EKSTRAND; WHITFORD, 1984;

LAWRENZ; MITCHELL; RUTH, 1940; MILLER; PHILLIPS, 1955; SUTTIE; PHILLIPS, 1959; ZIPKIN; MCCLURE, 1952; WEIDMANN; WEATHERELL, 1959; WHITFORD; PASHLEY, 1983).

Aproximadamente 50% do flúor absorvido diariamente por jovens ou adultos saudáveis de meia-idade associa-se aos tecidos calcificados em 24 horas, enquanto que quase todo o restante é excretado pela urina. Essa distribuição 50:50 se desloca a favor de maior retenção em bebês e crianças pequenas (Whitford, 1996), e provavelmente se desloca em favor de uma maior excreção em indivíduos mais velhos, embora se saiba pouco sobre este assunto. O aumento da retenção de flúor pelo esqueleto em desenvolvimento parece ser devido quase que inteiramente ao rico suprimento sangüíneo e maior área de superfície dos cristalitos ósseos, que são menores, mais desorganizados e mais numerosos, quando comparados com o osso maduro (Whitford, 1994a).

1.3.3 Excreção renal

Os rins representam a maior rota de remoção do flúor no corpo. A taxa de excreção do flúor é uma variável importante por diversos fatores, incluindo o fato de ser freqüentemente usado como um índice da ingestão de flúor (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Em condições normais, aproximadamente metade do flúor ingerido diariamente pelos adultos é excretada pela urina (EKSTRAND, 1990). Conseqüentemente, o plasma e a excreção urinária refletem um balanço fisiológico que é determinado pela ingestão prévia de flúor, o grau de acumulação do íon no osso, a taxa de mobilização do osso e a eficiência dos rins em excretar o flúor (EKSTRAND et al., 1977).

Depois de aproximadamente 50% de uma dose de flúor ingerida ter sido absorvida, as concentrações plasmáticas caem de forma rápida, o que é devido à excreção renal e à

incorporação aos tecidos mineralizados. A quantidade de flúor excretada está diretamente relacionada à quantidade ingerida, e essa eliminação é feita principalmente pelos rins (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1990, 1996).

Pelo flúor iônico não se ligar às proteínas plasmáticas (EKSTRAND; ERICSSON; ROSELL, 1977; TAVES, 1968), sua concentração no filtrado glomerular é inquestionavelmente a mesma do plasma. Após entrar nos túbulos renais, uma quantidade variável do íon é reabsorvida (de 10 a 90%) e retorna à circulação sistêmica, sendo o remanescente excretado pela urina (EKSTRAND, 1996). Isso indica que a taxa de filtração glomerular é a primeira determinante na quantidade de flúor excretada pela urina e que sua redução, como ocorre na disfunção renal crônica, refletirá em um aumento da concentração de flúor no plasma (EKSTRAND, 1996; SCHIFFEL; BINSWANGER, 1980; WATERHOUSE; TAVES; MUNZER, 1980).

Assim como acontece para a absorção gástrica e para a migração transmembrana do flúor, o mecanismo de reabsorção tubular parece se dar por difusão do HF. Quando a urina está relativamente alcalina, quase todo o flúor está presente na forma iônica e, devido ao seu tamanho e carga, permanece no interior do túbulo renal para ser excretado. Por exemplo, se o pH é 7,4 as proporções de F:HF seriam 10000:1. Quando a urina está relativamente ácida, existe proporcionalmente mais flúor na forma não dissociada, o que vai aumentar o gradiente de concentração trans-tubular de HF e, conseqüentemente, o grau de sua difusão do túbulo renal para o fluido intersticial. Por exemplo, se o pH é 4,4, então as concentrações de F:HF seriam 10:1, portanto 1000 vezes maiores que a proporção do exemplo anterior. Comparada à condição alcalina, isso aumentaria a proporção de difusão de HF do túbulo para o fluido intersticial, deixando menos flúor para ser excretado. No fluido intersticial, onde o pH é mantido próximo da neutralidade, independentemente do pH do fluido tubular, o HF se dissociaria e o íon flúor se difundiria para os capilares, retornando à circulação sistêmica

(Figura 2). Dessa forma, os fatores que alteram o pH urinário, como a composição da dieta, certas doenças respiratórias ou metabólicas, certas drogas e a altitude de residência, poderiam afetar sobremaneira o metabolismo do flúor (WHITFORD, 1990).

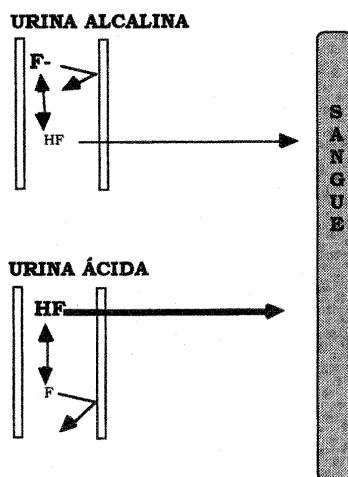


Figura 2. Mecanismo de reabsorção tubular do flúor, na forma de HF (BUZALAF, 2002, adaptado de WHITFTORD, 1996).

O “clearance” renal do flúor é bastante alto quando comparado ao dos outros halogênios. Os “clearances” do cloro, bromo e iodo em adultos jovens ou de meia-idade saudáveis são da ordem de 2 mL/minuto (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996), enquanto que o do flúor é de cerca de 35 mL/minuto (WHITFORD, 1996), variando de 30 a 50 mL/minuto (EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO, 1982; HANHIJÄRIVI, 1974; SCHIFFEL; BINSWANGER, 1980; WATERHOUSE; TAVES; MUNZER, 1980). Considerando-se que o grau de reabsorção depende do pH do fluido tubular e do fluxo urinário, o “clearance” pode ser aumentado ou diminuído por mudanças na taxa de fluxo da urina (JÄRNBERG; EKSTRAND;

EHRNEBO, 1983), bem como por mudança no pH (EKSTRAND et al., 1980; EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO, 1982).

O conceito de que o flúor presente nas fezes corresponda ao não absorvido é questionável, pois estudos em ratos demonstraram que a excreção fecal de flúor pode ser aumentada tanto pelo aumento das concentrações de flúor plasmáticas como pelo aumento da concentração de cálcio na dieta (WHITFORD, 1994b; WHITFORD; AUGIERI, 1993).

1.4 Ritmicidade biológica

A organização temporal de um ser vivo se expressa de duas formas, uma enquanto reação a ritmos (estímulos) ambientais, e outra como ritmos endógenos, controlados pelo relógio biológico. Essa segunda forma é a menos evidente mas nem por isso a menos importante. A compreensão da importância da ritmicidade passa por dois momentos. O primeiro deles é a demonstração da generalidade desse fenômeno em praticamente todos os seres vivos estudados em diversos níveis de análise, desde metabolismo celular até comportamento de populações. O segundo momento consiste na investigação dos mecanismos orgânicos responsáveis pelos processos de temporização, os chamados relógios biológicos (MENNA BARRETO, 1999).

Praticamente todos os seres vivos mostram algum tipo de oscilação em seu comportamento e em suas funções orgânicas (MENNA BARRETO, 2004). Ao contrário do que se acreditava, essas oscilações não são meros reflexos das flutuações ambientais, ou seja, de fenômenos ambientais periódicos e recorrentes, como a noite e o dia, as estações do ano, os ciclos lunares, ou as marés (MELLO; MORENO, 2004; MENNA BARRETO, 2004; DeLUCIA, 2004). Representam, sim, a atuação de mecanismos bem conhecidos como relógios

biológicos. Os relógios biológicos são mecanismos capazes de gerar ciclos independentemente da presença de estímulos ambientais, e seu produto final, diretamente observável, são os ritmos biológicos ou circadianos (MENNA BARRETO, 2004).

Pode-se definir ritmo como sendo um processo que varia periodicamente no tempo, a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 1999). Cada ritmo tem uma velocidade própria (DeLUCIA, 2004). Os ritmos biológicos manifestam-se em períodos que vão de milisegundos até anos (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 1999). Em condições normais os diversos ritmos do nosso organismo, como ciclo vigília-sono, ritmo de temperatura, entre outros, estão sincronizados entre si, assim como o claro-escuro ambiental (MELLO; MORENO, 2004). No ambiente, o dia e a noite (ciclo claro-escuro) é que ajustam os nossos ritmos para funcionarem com período de exatas 24 horas. Além da informação de dia e noite, os relógios são suscetíveis a fatores como compromissos sociais, hábitos de vida diária, uso de medicamentos, prática de atividades físicas, entre outros, que influenciam nossos ritmos, atuando como sincronizadores e/ou mascaradores desses ritmos (MENNA BARRETO, 2004).

1.5 Ritmicidade biológica para o flúor

As variações das concentrações de flúor do plasma em humanos foram estudadas sob uma série de condições. Nas décadas de 60 e 70, as concentrações de flúor no plasma podiam ser comparadas à ingestão de flúor pela água de beber. Estudos iniciais sugeriram a concepção de que havia um mecanismo fisiológico para regular homeostaticamente as concentrações de flúor no plasma (SINGER; ARMSTRONG, 1960, 1964). Contudo, a validade

desta relação foi questionada por possíveis problemas analíticos (TAVES; GUY, 1976 apud FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996).

Tem sido estabelecido que os níveis plasmáticos de flúor em humanos variam durante o dia (COWELL; TAYLOR, 1981; EKSTRAND, 1978), variações estas certamente relacionadas aos padrões de exposição ao flúor (COWELL; TAYLOR, 1981; EKSTRAND et al., 1977). Diversos estudos descrevem que com o aumento da concentração de flúor na água de beber, a concentração de flúor plasmática aumenta (COWELL; TAYLOR, 1981; EKSTRAND, 1978; GUY; TAVES, 1973), podendo apresentar uma ampla flutuação em suas concentrações durante o dia (COWELL; TAYLOR, 1981; EKSTRAND, 1978).

Guy e Taves (1973), reportaram que as concentrações de flúor no plasma aumentavam com a concentração de flúor na água de beber. Em regiões onde os níveis de flúor na água eram de 0,1 e 5,6 ppm, as concentrações plasmáticas de flúor encontradas foram de 0,41 e 4,3 μM , respectivamente.

Analisando as concentrações de flúor no plasma de indivíduos com idades entre 10 e 38 anos, que residiam em 3 comunidades com diferentes níveis de flúor na água de beber (0,25, 1,23 e 9,9 ppm), Ekstrand (1978) observou que as concentrações de flúor no plasma não variavam em função dos diferentes tempos de coleta de sangue (às 8, 12, 16 e 20 horas, para as regiões com 1,23 e 9,9 ppm de fluoreto, e às 8, 12, 14, 18 e 21 horas para a área com 0,25 ppm de fluoreto), exceto para a área com 9,6 ppm de fluoreto na água, onde os voluntários mostraram uma ampla variação nos níveis plasmáticos de flúor durante o dia, variação esta que tendia a aumentar até as 20 horas, quando a última coleta de sangue era realizada. Neste estudo, as concentrações médias de flúor no plasma encontradas para os indivíduos das comunidades com 0,25, 1,23 e 9,9 ppm de fluoreto, às 8 horas, foram 0,5, 1 e 1,7 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (EKSTRAND, 1978). Assim como em outros estudos, a

variabilidade do perfil e da magnitude dos níveis de flúor no plasma durante o dia foi relacionada à idade dos indivíduos (EKSTRAND, 1978; HANHIJÄRVI, 1974; PARKINS et al., 1974).

Em estudo subsequente, realizado com indivíduos que residiam em uma região não fluoretada (0,05 a 0,2 ppm), a concentração de flúor média no plasma encontrada às 8 horas foi de 1 $\mu\text{mol/L}$, aumentando durante o dia, com um pico (1,5 $\mu\text{mol/L}$) ocorrendo às 22 horas (COWELL; TAYLOR, 1981).

Um estudo realizado por Cardoso; Whitford; Buzalaf (2003, 2004), avaliou a relação entre as concentrações de flúor no plasma e a ingestão de flúor pela dieta e pelo dentífrico, por 48 horas. Os voluntários residiam em 3 regiões, com diferentes níveis de flúor na água de beber: Bauru (0,6 ppm, bebendo água sem flúor e cozinhando com água fluoretada), Domélia (0,7 ppm, bebendo e cozinhando com água fluoretada) ou Floresta (<0,3 ppm, bebendo e cozinhando com água contendo pouco flúor). Todos os voluntários usavam dentífrico fluoretado. Os resultados do estudo claramente indicaram a associação entre a concentração de flúor no plasma e a ingestão total de flúor quando a ingestão de flúor pela dieta está associada com o uso regular de dentífrico fluoretado. Entretanto, o mais surpreendente e controverso achado foi a ausência de um efeito induzido pelo flúor ingerido nas concentrações de flúor no plasma. Não houve uma variabilidade considerável no perfil e nas mudanças da concentração do flúor ao longo do dia, independentemente da concentração de flúor na água de beber (0,3, 0,6 ou 0,7 ppm) e dos diferentes níveis de ingestão de flúor pelo dentífrico (de 0 a 6,42 mg/dia). As concentrações médias de flúor no plasma para as regiões com 0,3, 0,6 ou 0,7 ppm de fluoreto na água de beber foram $0,45 \pm 0,06$, $0,43 \pm 0,06$ e $0,55 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Neste estudo, as amostras de

sangue foram coletadas a cada 4 horas, das 8 às 20 horas (CARDOSO; WHITFORD; BUZALAF, 2003, 2004).

Quando a ingestão de flúor ocorre de acordo com o padrão diário normal de ingestão de alimentos, líquidos, escovação etc., seria esperado que os níveis plasmáticos mostrassem vários picos pequenos, geralmente tendendo a subir durante as horas em que o indivíduo se mantém acordado e a descer durante o sono, refletindo o fato de que quando a entrada de flúor no plasma excede o grau de sua remoção, as concentrações de flúor plasmáticas devem aumentar. É provável que exista algum componente fisiológico envolvido, mas sua natureza e impacto na ritmicidade biológica ainda não foram investigados (WHITFORD, 1996).

A possibilidade da existência de uma ritmicidade biológica nos níveis plasmáticos de flúor, independentemente de sua ingestão, foi levantada em relatos da literatura considerando os ritmos circadianos do Ca^{2+} e do fosfato (WHITFORD et al., 1996). As variações ao longo do dia nas concentrações destes íons são parcialmente atribuídas ao balanço entre a aposição e a reabsorção óssea, influenciadas pelos hormônios que agem no osso. Quase todo o flúor retido no nosso organismo está associado ao esqueleto. Hipotetizou-se, portanto, que os níveis plasmáticos de flúor exibiriam um ritmo biológico similar e coordenado com o do Ca^{2+} e do fosfato (Perault-Staub; Staub; Milhaud, 1974; Talmadge; Roycroft; Milhaud, 1975; Whitford, 1996).

Uma evidente ritmicidade biológica para o flúor foi observada em cães, com o pico médio da concentração de flúor no plasma, 17,1 μM , ocorrendo em torno das 9 horas, e a depressão, 14,6 μM , 12 horas depois, às 21 horas. Neste experimento, os cães eram infundidos constantemente com 0,9 mg F/kg/dia para aumentar os níveis plasmáticos e garantir que os valores caíssem dentro da faixa de sensibilidade do aparelho, sendo alimentados uma vez por dia entre 15 e 15:30 horas, com uma dieta contendo de 8-9 ppm

de flúor. Amostras de sangue foram coletadas a cada 3 horas, e adicionalmente às 16 horas (30 minutos após a alimentação), por 5 dias. Um achado não esperado foi a queda na concentração de flúor plasmática que ocorreu após a alimentação. A possibilidade de que o flúor ligado à alimentação (aproximadamente 3 mg) estivesse presente na forma de fluorapatita ligada à refeição de osso, e portanto, não tivesse sido absorvido, explicaria por que os níveis plasmáticos de flúor não aumentaram, mas, obviamente, não explicaria por que eles declinaram (WHITFORD, 1996).

Num estudo com o mesmo protocolo utilizando outro grupo de animais, a ritmicidade do Ca^{2+} , fosfato e flúor foram determinados por 3 dias consecutivos. As concentrações de flúor, em relação ao horário de pico e depressão, foram similares às do estudo prévio, mas, por razões não claras, a amplitude foi maior ($10,3 \times 2,5 \mu\text{M}$). Confirmando estudos em ratos (PERAULT-STAUD; STAUD; MILHAUD, 1974; TALMADGE; ROYCROFT; MILHAUD, 1975), a ritmicidade para o Ca^{2+} e o fosfato foram coincidentes, entretanto em sentidos opostos em relação à ritmicidade do flúor (WHITFORD, 1996).

1.6 Hormônios da atividade óssea

As transições entre os estados fisiológicos são preparadas progressivamente por complexos sistemas de controle, podendo implicar na liberação de hormônios. O sistema de temporização que coordena estas transições tem sido representado na literatura por um ou mais osciladores endógenos, podendo estar ou não acoplados a oscilações de fatores ambientais ou *zeitgebers* (LOPES, 2004). A diferenciação de funções nos sistemas biológicos pode ser vista como arranjo temporal que permite simultaneidade de ação. A simultaneidade

por sua vez exige um certo grau de integração entre diferentes setores do organismo de modo a ajustá-los ao longo do tempo. Sistemas orgânicos de controle, como os sistemas endócrino e nervoso, exemplificam esse papel de integração num caso extremo onde a diferenciação funcional consiste justamente no gerenciamento de todos os setores do organismo. Essa simultaneidade e seu controle centralizado se completam com mecanismos e processos de sincronização entre essas mesmas funções. Esse acoplamento temporal torna-se mais complexo na medida em que a diferenciação funcional se acentua. Podemos supor com razoável segurança que os complexos mecanismos de controle temporal se tornam mais necessários em organismos com maior grau de diferenciação (MENNA BARRETO, 1999).

As quantidades normais de Ca^{2+} e fosfato no organismo são mantidas por um complexo sistema de regulação. O paratormônio (PTH) ou hormônio paratireóideo é um importante regulador deste metabolismo, sendo secretado pelas glândulas paratireóides. Seu efeito mais proeminente consiste em elevar os níveis plasmáticos de Ca^{2+} por estimulação da reabsorção óssea, reabsorção tubular renal de Ca^{2+} e síntese de 1,25 diidroxivitamina D [$1,25(\text{OH})_2\text{-D}$]. Ao mesmo tempo, o PTH reduz a concentração plasmática de fosfato pela inibição da reabsorção tubular renal de fosfato. A secreção de PTH e a concentração plasmática de Ca^{2+} estão inversamente relacionadas (*feedback* negativo), seguindo um padrão sigmóide (BERNI et al.; HOFER; BROWN, 2003). Interessantemente, a administração intermitente de PTH tem um efeito anabólico, podendo ser empregado no tratamento da osteoporose. Por outro lado, aumentos permanentes na secreção de PTH resultam em uma liberação líquida de Ca^{2+} do esqueleto (HOFER; BROWN, 2003).

Um outro hormônio que influencia o metabolismo do Ca^{2+} é a calcitonina, secretada pela células parafoliculares ou células C, da tireóide. Seu efeito principal é a queda rápida da

concentração plasmática de Ca^{2+} , causada pela inibição da reabsorção óssea. A calcitonina é claramente um antagonista fisiológico do PTH com relação ao Ca^{2+} . Entretanto, com relação ao fosfato, exerce o mesmo efeito global do PTH, reduzindo o nível plasmático de fosfato. A resposta da calcitonina tem sido geralmente relacionada com sua necessidade de prevenir a hipercalcemia, e sua concentração circulante é de 10 a 20 pg/mL (BERNI et al.; GESEK; FRIEDMAN, 1993).

A melatonina é um neuro-hormônio produzido pela glândula pineal e, acredita-se, apresenta como principal função regular o sono. Esse hormônio é produzido na fase escura do ciclo claro-escuro, a partir do momento em que fechamos os olhos. Na presença de luz, entretanto, é enviada uma mensagem neuro-endócrina bloqueando a sua formação. Portanto, a secreção dessa substância é quase exclusivamente determinada por estruturas fotossensíveis, principalmente à noite (KURBEL et al., 2003). Interessantemente, a melatonina poder ter um papel importante na promoção do desenvolvimento da massa óssea (ROTH et al., 1999; OSTROWSKA et al., 2001a; OSTROWSKA et al., 2001b; OSTROWSKA et al., 2003; OSTROWSKA et al., 2002). A exposição de pré-osteoblastos e osteoblastos de camundongos altamente diferenciados (células que produzem e mineralizam os componentes da matriz óssea) à melatonina possibilitou demonstrar que níveis normais deste hormônio aceleram a transformação dos pré-osteoblastos em osteoblastos diferenciados, induzindo a produção de grandes quantidades de proteínas da matriz óssea responsável pela formação dos ossos (ROTH et al., 1999).

O envolvimento hormonal tem sido relacionado na ritmicidade do Ca^{2+} e do fosfato em ratos. Em humanos, Waterhouse; Taves; Munzer (1980) administraram paratormônio e tirocalcitonina com o propósito de determinar os efeitos hormonais nas concentrações séricas e excreção urinária de flúor. Os achados deles trouxeram as primeiras evidências diretas de

que alterações na aposição e reabsorção óssea mediadas por hormônios são refletidas nos níveis séricos e urinários de flúor. Entretanto, o sentido oposto entre a ritmicidade do Ca^{2+} e do fosfato em relação ao ritmo do flúor foi inesperada e difícil de explicar. Se as alterações nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} e fósforo fossem devidas principalmente aos períodos de aposição e reabsorção óssea, o que seria esperado, os níveis plasmáticos de flúor deveriam ter sofrido alterações na mesma direção e ao mesmo tempo. Portanto, os dados sugerem que um outro sistema fisiológico que não o osso seria responsável por determinar as características da ritmicidade biológica do flúor plasmático. O sistema renal é o candidato mais provável. Dados relativos às flutuações diárias na proporção de filtração glomerular e pH urinário poderiam revelar o mecanismo por trás destes achados (WHITFORD, 1996).

1.7 Flúor no plasma

No plasma, o flúor é encontrado nas formas iônica (também chamado flúor livre ou inorgânico) e não iônica (ou flúor ligado). O flúor iônico, que pode ser detectado pelo eletrodo íon específico, é o que apresenta interesse para a Odontologia, Medicina e Saúde Pública. O significado biológico do flúor não iônico ainda não foi determinado (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Juntas, as frações iônica e não iônica representam o flúor total do plasma (GUY, 1976 apud FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996). Uma terceira forma do flúor, chamada de ionizável, tem sido reportada (YAMAMOTO et al., 1989).

As concentrações de flúor plasmáticas são usadas para se estimar a exposição passada ou recente ao flúor. Elas representam as concentrações disponíveis para deposição esquelética, distribuição para os vários tecidos moles e fluidos corporais especializados e para filtração nos túbulos renais (WHITFORD, 1996).

Um problema encontrado quando se pretende estudar a influência da ritmicidade biológica no metabolismo do flúor em humanos é a variação que ocorre normalmente nos níveis plasmáticos, devido aos padrões de exposição ao flúor ao longo do dia (WHITFORD, 1996).

Contudo, a estabilização desta variação dos níveis plasmáticos não é tão simples quanto se sugere. Largent (1952), desenvolveu um estudo onde aumentou sua ingestão de flúor e analisou sua ingestão e excreção por um longo período, quando então passou a ingerir uma baixa concentração de flúor. Baseado em sua excreção urinária, o autor estimou que levaria aproximadamente 5 anos para que o flúor adicional ingerido, e que foi armazenado em seus ossos, fosse mobilizado e excretado (Largent, 1960). A explicação mais provável para isto é que a incorporação de flúor pelo osso não é unidirecional. Existem evidências para o chamado “pool” de flúor no osso passível de troca (Costeas; Woodward; Laughlin, 1971; Ericsson; Hellstrom; Hofvander, 1972; Hall et al., 1977; Likins; McClure; Steere, 1956; Neuman; Neuman, 1958 apud Whitford, 1996; Zipkin et al., 1956). Este “pool” consiste provavelmente de camadas de hidratação ricas em flúor na superfície dos cristalitos ósseos, que são contínuas, ou pelo menos disponíveis, aos fluidos extracelulares. Assim, quando os níveis plasmáticos de flúor não estão mudando, o flúor pode ser trocado isoionicamente entre o fluido intersticial e a camada de hidratação, sem movimento líquido em nenhuma das direções. Quando os níveis plasmáticos estão mudando, pode haver uma migração líquida para uma direção ou para outra. As características quantitativas deste processo dependeriam das concentrações de flúor instantâneas no fluido extracelular e nas camadas de hidratação, bem como da afinidade instantânea deste último compartimento pelo íon (Whitford, 1996).

Neste sentido, outros fatores modificadores das características gerais do metabolismo do flúor, e que deveriam ser considerados são os distúrbios ácido-básicos crônicos e agudos, o hematócrito e o exercício físico (Whitford, 1996).

Por causa dos efeitos do pH urinário na eficiência com a qual os rins removem o flúor do organismo, os distúrbios ácido-básicos crônicos têm importantes efeitos no balanço e concentrações tissulares do flúor. Os fatores que alteram cronicamente o equilíbrio ácido-básico são a composição da dieta (uma dieta rica em vegetais tende a aumentar o pH urinário, enquanto que uma dieta rica em carne tende a diminuí-lo) (EKSTRAND et al., 1982), certas drogas, uma variedade de desordens metabólicas e respiratórias, o nível de atividade física e a altitude de residência (WHITFORD, 1996).

A excreção renal do flúor é afetada por desordens ácido-básicas agudas, como as respiratórias, da mesma maneira que acontece durante as desordens ácido-básicas metabólicas. Vários estudos têm indicado que o flúor pode passar do fluido extra para o intra-celular e vice-versa, pela diminuição ou aumento do pH extra-celular, respectivamente. A base fisiológica para isto pode ser explicada pela direção e magnitude dos gradientes de pH trans-celulares e pela hipótese de que o HF e não o flúor iônico, está em equilíbrio de difusão através das membranas celulares. Então, quando o gradiente de pH é aumentado pela elevação do pH extra-celular, ocorre um aumento na concentração de flúor extra-celular às expensas da concentração de flúor intra-celular. Quando o gradiente é reduzido pela diminuição do pH extra-celular, ocorre a passagem do flúor do fluido extra-celular para o interior das células (WHITFORD, 1996).

Considerando-se que o flúor se distribui assimetricamente entre o plasma e as células (CARLSON; ARMSTRONG; SINGER, 1960), o hematócrito (porcentagem de volume de uma

amostra de sangue ocupado pelas células) é uma importante variável que pode influenciar as concentrações plasmáticas de flúor, independentemente das concentrações de flúor no sangue total. Quando o pH é próximo de 7,4 e o hematócrito está próximo ao normal (BIRDSOONG-WHITFORD; DICKINSON; WHITFORD, 1986), a concentração de flúor no plasma é aproximadamente o dobro daquela das células. Este fato tem várias implicações importantes, pois o hematócrito nas mulheres é ligeiramente mais baixo que nos homens. Portanto, em estudos dos níveis plasmáticos de flúor em função da concentração de flúor na água, ingestão de flúor, doença renal, idade, etc., deve-se confirmar que a população a ser estudada é homogênea tanto com relação ao hematócrito quanto com relação balanço ácido-básico. No caso em que existam diferenças no hematócrito, a análise do sangue total deveria ser considerada (WHITFORD, 1996).

No exercício físico pesado e prolongado, há uma redução no gradiente de pH através das membranas celulares, especialmente aquelas do músculo esquelético (SAHLIN, 1978), promovendo a difusão do flúor, como HF, do fluido extra para o intracelular. Em adição, durante o exercício físico, o fluxo sanguíneo muscular pode aumentar até 20 vezes, levando a uma vaso-constricção renal, devido a uma atividade aumentada do sistema nervoso simpático, o que reduziria o fluxo sanguíneo renal e a proporção de filtração glomerular (RADIGAN; ROBINSON, 1949). Isto poderia aumentar o grau de incorporação de flúor pelo esqueleto. Comparados à condição de repouso, cada um destes fatores tenderia a reduzir a concentração plasmática de flúor e também a excreção renal. Por outro lado, a acidificação do fluido tubular devido a um aumento na produção de ácido láctico pelos músculos favoreceria a reabsorção renal de flúor (WHITFORD; PASHLEY, 1979; WHITFORD; PASHLEY; STRINGER, 1976), tendendo a reduzir a excreção urinária de flúor e aumentar os níveis plasmáticos. Então, dependendo do balanço entre estes fatores, o exercício físico poderia

estar associado tanto com um aumento quanto com uma diminuição dos níveis de flúor circulantes (WHITFORD, 1996).

O conhecimento da variabilidade das concentrações plasmáticas de flúor ao longo do dia é de extrema importância para os estudos que utilizam o plasma como biomarcador de exposição ao flúor. Desta maneira, sabendo-se quais os horários de maior e menor concentração de flúor no plasma, os experimentos deveriam padronizar os horários de coleta de plasma, para que os resultados obtidos em diferentes estudos possam ser comparados. No mais, a compreensão dos aspectos metabólicos e toxicológicos do flúor oferece perspectivas na saúde pública, já que fundamentalmente levaria aos dados necessários para o desenvolvimento e aplicação de medidas eficientes e de custo-benefício que poderiam maximizar os benefícios do flúor na prevenção e redução da cárie dentária. Apesar do declínio da incidência de cárie dentária nas populações infantis nos últimos anos, deve-se considerar que a cárie dentária ainda é uma causa predominante da perda de dentes na população mundial (Fejerskov; Baelum, 1998). Ao mesmo tempo, o conhecimento destes mecanismos para o flúor é também extremamente importante para a minimização dos riscos para o desenvolvimento da fluorose dentária. Outra possibilidade seria racionalizar o uso do flúor no tratamento da osteoporose.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho nos propusemos a determinar:

1. A existência de um ritmo biológico para as concentrações de flúor no plasma em humanos.
2. O sistema biológico responsável por esta regulação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo do Estudo

Participaram deste estudo, após devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (Protocolo de Pesquisa no. 476/02), 5 adultos jovens (3 mulheres e 2 homens) na faixa etária de 27 a 33 anos, residentes em Bauru, uma região fluoretada (0,6-0,8 ppm) abastecida pela estação de tratamento de água (ETA). Todos eles apresentavam um bom estado de saúde bucal e geral e não estavam ingerindo medicamentos.

Os voluntários faziam ingestão de comida preparada com a água de abastecimento, porém bebiam água mineral sem flúor. Um mês previamente ao estudo, os voluntários passaram a fazer uso de um dentífrício sem flúor, sendo ainda orientados a não realizarem enxágüe com colutório fluoretado, e nem ingerirem alimentos e bebidas que contivessem alta concentração de flúor. Conforme recomendado pelo Instituto de Patologia Clínica Hermes Pardini, quinze dias antes do experimento, as voluntárias foram orientadas a suspender o uso de anticoncepcional, ou outros hormônios, de modo a eliminar possíveis interferências no resultado das análises hormonais a serem solicitadas.

Durante o experimento, que durou 5 dias, para que tivéssemos um maior controle dos procedimentos realizados, optamos por manter todos os voluntários em uma chácara, que era abastecida com água de poço contendo 0,05 ppm de fluoreto. Neste período, os voluntários receberam *ad libitum* esta água de abastecimento não fluoretada, e seguiram um protocolo dietético onde realizaram apenas quatro refeições diárias (café, almoço, lanche, jantar), em porções padronizadas, fornecidas pelos pesquisadores, sendo que não

complementaram as refeições e nem ingeriram bebidas que contivessem alta concentração de flúor. A ingestão de flúor através da dieta foi determinada de forma a não exceder 0,1 mg por refeição.

Durante o período experimental, nenhum exercício físico foi realizado pelos voluntários.

Neste período de 5 dias, coletas sanguíneas foram realizadas nas veias médias do cotovelo dos voluntários, sendo feitas a cada 3 horas, começando às 8 e terminando às 20 horas, sendo uma das coletas 30 minutos após o almoço (14 horas). Também foi coletada urina a cada 3 horas, respeitando-se os mesmos intervalos das coletas de sangue, e, adicionalmente, das 20 às 8 horas, período este em que não foram realizadas coletas de sangue (Tabela 1). Após o experimento, os voluntários foram orientados a permanecerem 3 meses sem doar sangue.

Tabela 1. Esquema do protocolo experimental.

	8:20 h café da manhã		13-13:30 h almoço		17:20 h lanche da tarde		20:30 jantar
	↓		↓		↓		↓
Coleta de sangue	8 h	11 h	14 h	17 h	20 h		
Coleta de urina	8-11 h	11-14 h	14-17 h	17-20 h	20-8 h		

Para a estimativa da ingestão de flúor a partir da dieta foi utilizado o método da dieta duplicada. As amostras de plasma e dieta foram dosadas quanto ao teor de flúor, após

difusão facilitada por HMDS, utilizando-se o eletrodo íon específico (Orion – 9409) e um mini-eletrodo calomelano de referência. A análise de flúor na urina foi feita pelo método direto, após tamponamento com TISAB II. Também foi feita, no plasma, análise da concentração de Ca^{2+} e fósforo, utilizando espectrometria de absorção atômica e método colorimétrico, respectivamente. Análises dos hormônios paratormônio e calcitonina também foram realizadas no soro, por quimioluminescência e imunorradiometria, respectivamente. Para controle do experimento, análises adicionais para T3 e T4 livre, e TSH, no soro, foram solicitadas.

3.2 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas 5 vezes ao dia, em intervalos de 3 em 3 horas (das 8 às 20 horas), sendo uma das coletas realizada 30 minutos após o almoço (14 horas). Os voluntários receberam profilaxia na região a ser puncionada com lenços umedecidos em solução anti-séptica (álcool 70% v/v), sendo a região puncionada com agulha e o sangue coletado no volume de 15 a 16 mL, sendo 8 mL colocados em tubo plástico contendo heparina livre de flúor, e 8 mL em tubo plástico seco (sem anti-coagulante). Após a punção a área da coleta era protegida com um tampão adesivo.

3.3 Coleta da urina

As amostras de urina foram coletadas durante o período de 5 dias, de 3 em 3 horas, das 8 às 20 horas, e durante 12 horas, das 20 às 8 horas. Os voluntários foram instruídos a eliminar toda a urina deste intervalo de tempo (a cada 3 horas, e no período de 12 horas) em

frascos plásticos individuais de boca larga, devidamente rotulados e sem conservantes. Os frascos contendo a urina eram armazenados em geladeira, preservando a urina sem alterar a disponibilidade do flúor para análise. O volume de cada amostra era imediatamente determinado após o término de cada período da coleta, enquanto que uma alíquota de 50 mL era congelada (-20°C), até a análise de flúor.

3.4 Coleta da dieta duplicada

3.4.1 Elaboração da dieta

Para que uma dieta com baixa concentração de flúor pudesse ser adequadamente elaborada, previamente ao experimento foram selecionados alguns alimentos para serem analisados para flúor. Estes alimentos foram adquiridos em supermercados da cidade de Bauru, São Paulo, cidade esta onde foi realizado o experimento. Para os produtos industrializados, seu nome comercial e o nome do produtor foram anotados.

Os alimentos industrializados tiveram suas embalagens abertas no dia da análise. Carnes, verduras, legumes e frutas foram adquiridos no dia da análise, e limpos para tudo o que contivessem e que não seria ingerido pelos voluntários, como gordura, ossos, talos, cascas, sementes, etc. Para os alimentos que necessitavam de cozimento para o seu preparo, água mineral sem flúor foi utilizada. Após o preparo, uma porção dos alimentos era pesada, homogeneizada em liquidificador com volume conhecido de água deionizada, e analisada para flúor.

Após a realização das análises, apenas os alimentos que apresentaram uma concentração de flúor $\leq 0,1 \mu\text{g/g}$ ou $\mu\text{g/mL}$ (0,1 ppm) foram utilizados pela nutricionista na

elaboração da dieta. Após a elaboração da dieta, cada refeição foi preparada, usando água mineral sem flúor, quando necessário. Os pratos foram montados, pesados, homogeneizados com volume conhecido de água deionizada, e analisados para flúor. A ingestão de flúor através da dieta foi determinada de forma a não exceder 0,1 mg por refeição (Anexo 1).

3.4.2 Coleta da dieta duplicada

Durante o experimento, as refeições foram preparadas com a água da chácara, contendo 0,05 ppm de fluoreto. A fim de se estimar a ingestão de flúor a partir da dieta oferecida, utilizou-se o método da dieta duplicada. Este procedimento foi feito para todos os alimentos ingeridos durante o experimento. Uma porção de alimentos igual à ingerida pelos voluntários, em cada uma das refeições, foi reservada. Foram eliminados tudo o que os voluntários não ingeriam, como ossos, cascas, etc (Guha-Choudhury et al., 1996). As amostras foram homogeneizadas com volumes conhecidos de água deionizada, e armazenadas em recipientes plásticos devidamente rotulados a -20°C até a análise de flúor.

Quanto à coleta em relação às bebidas, como o único líquido a que os voluntários tinham acesso ao longo do dia era água sem flúor, não houve necessidade de reservá-los nos mesmos volumes ingeridos.

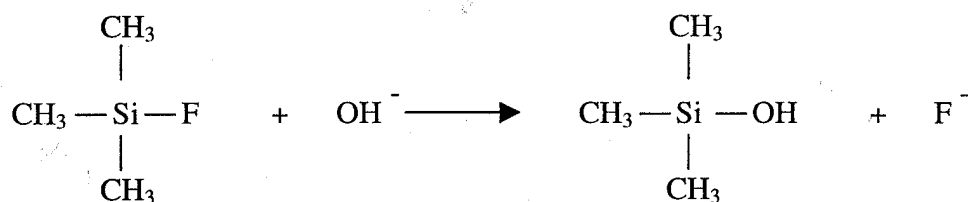
3.5 Procedimento Analítico

3.5.1 Plasma

As amostras de sangue coletado em heparina foram previamente centrifugadas por 5 min a 3000 rpm (Jouan A14) para a obtenção do plasma. A análise de flúor foi feita após

difusão facilitada por hexametil-disiloxano (HMDS), pelo método de Taves (1968), como modificado por Whitford (1996).

O princípio químico do método é baseado na dissociação de moléculas de HMDS na presença de um ácido forte numa placa de difusão. O íon flúor (das amostras ou soluções-padrão) liga-se ao radical silano, formando um composto volátil, chamado trimetilfluorsilano. Este composto se difunde para a solução alcalina (hidróxido de sódio - NaOH), localizado no interior da tampa fixada no fundo da placa de difusão. O íon flúor é trocado pelo íon hidroxila. Um novo composto é formado (trimetilsilanol), sendo o íon flúor liberado conforme mostrado abaixo:



Entretanto, por se tratar o plasma de um fluido biológico, contendo, portanto dióxido de carbono (CO₂), foi feita uma pré-difusão para se eliminar o CO₂. Para tanto, as amostras de plasma foram colocadas numa placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado em HMDS num volume que correspondia a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) tinha sido previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer flúor residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu normalmente como descrito por

Taves (1968) e modificado por Whitford (1996). Na tampa das placas, foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas. As placas foram então fechadas e vedadas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa com uma ponta de solda, foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL, em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente vedado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada usando uma pipeta. A gota, que continha todo o flúor do plasma foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo # 13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figuras 3 a 8).

Todas as análises, sem exceção, foram feitas no mínimo em duplicata e foi depois calculada a porcentagem de concordância entre as mesmas, a fim de se preservar a precisão da análise.

3.5.2 Urina

A concentração de flúor presente nas amostras de urina foi determinada pelo método direto em triplicata, usando-se o eletrodo Orion 9609 após serem tamponadas com um volume idêntico de TISAB II (tampão de ajuste da força iônica total), contendo CDTA (ácido

ciclo-hexano diamino tetracético) 0,4%, pH 5,0. As amostras de urina foram deixadas à temperatura ambiente para descongelar durante a noite anterior à dosagem.

Foi calculado, para cada voluntário, diariamente, o fluxo urinário (mL/min) de cada amostra de urina coletada.

3.5.3 Dieta

A análise de flúor foi feita em triplicata, como descrito para o plasma, com exceção da pré-difusão, após difusão facilitada por HMDS (Taves, 1968, Whitford, 1996).



Figura 3 – Placa de Petri com vaselina.



Figura 4 – Colocação das 3 gotas de NaOH.

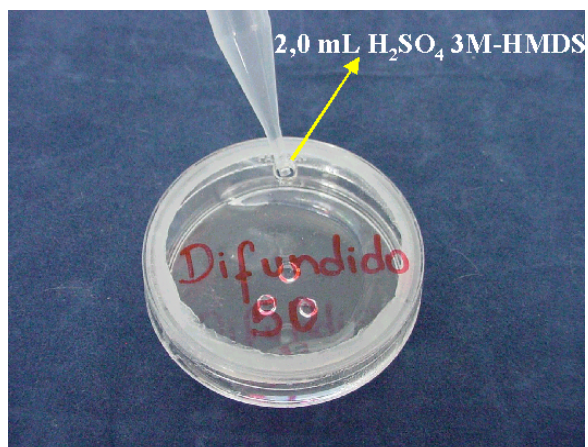


Figura 5 – Inserção do HMDS pelo orifício.



Figura 6 – Padrões pré-difundidos e difundidos prontos para agitação.



Figura 7 – Mesa agitadora (velocidade 3- 4).

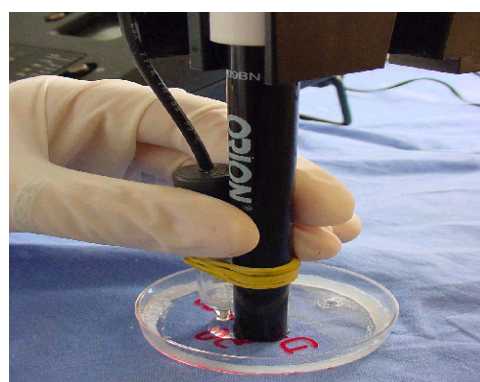


Figura 8 – Eletrodo Orion 9409 e mini-eletrodo de referência calomelano.

Figuras 3 a 8. Difusão facilitada por HMDS (método de Taves (1968) modificado por Whitford

(1996)). O HMDS capta o flúor presente na amostra, sendo então atraído pelo NaOH.

3.5.4 Hormônios da atividade óssea

As análises de calcitonina e paratormônio (PTH) foram feitas no Instituto de Patologia Clínica Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG, e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Botucatu, SP, respectivamente.

Para a calcitonina, as análises foram feitas por imunorradiometria. O Kit Calcitonina IRMA (DSL- Diagnostic System Laboratories, Inc. Webster, Texas, USA) foi utilizado. Princípio do teste: é um ensaio não competitivo no qual o analito a ser medido é detectado entre dois anticorpos ("sanduíche"). O primeiro anticorpo é imobilizado às paredes internas do tubo. O outro anticorpo é marcado radioativamente para detecção. Como se trata de método radiométrico, a contagem é realizada em contador gama. O volume mínimo para execução do teste é de 0,6 mL de soro.

Para PTH, as análises foram realizadas por quimioluminescência. Utilizou-se o Kit INTACT PTH (DPC), e o analisador IMMULITE 2000. Princípio do teste: é um teste imunológico competitivo que utiliza tecnologia quimioluminescente direta. Para a análise, 50 µL de plasma foram utilizados. A sensibilidade analítica é de 1 pg/mL.

Até o dia das análises, todas as amostras foram mantidas congeladas a -20°C.

3.5.5 Cálcio e fósforo

A análise da concentração de Ca^{2+} no plasma foi feita por espectrometria de absorção atômica. Os padrões e as soluções experimentais foram adicionados à matriz, K 5000 ppm, na forma de cloreto de potássio (KCl), e aspiradas pelo espectrômetro de absorção atômica (Varian Instruments, Modelo SpectrAA55, Sugar Land, Texas). A análise da concentração de

fósforo no plasma foi feita por espectrofotometria (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000), de acordo com o método de Chen, Toribara, Warner (1956). As análises de Ca^{2+} e fosfato foram feitas em triplicata.

3.5.6 T3 e T4 Livre e TSH

As análises de T3 e T4 Livre, e de TSH, foram feitas no Instituto de Patologia Clínica Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG.

Para T3 e T4 Livre, as análises foram realizadas por quimioluminescência. Utilizou-se o Kit ADVIA Centaur (Bayer Corporation). Princípio do teste: é um teste imunológico competitivo que utiliza tecnologia quimioluminescente direta. Para T3 e T4 Livre, o tipo e volume de amostra foram soro/50 μL e soro/25 μL , respectivamente. A sensibilidade analítica para T3 e T4 Livre é de 0,2 pg/mL e 0,1 ng/dL, respectivamente.

Para o TSH, a análise de quimioluminescência foi realizada. Utilizou-se o Kit ADVIA Centaur (Bayer Corporation). Princípio do teste: é um ensaio imunológico tipo sanduíche de dois sítios que usa quantidades constantes de dois anticorpos que utiliza tecnologia quimioluminescente direta. Para a análise, 200 μL de soro foram utilizados. A sensibilidade analítica é de 0,01 microunidades/mL.

Até o dia das análises, todas as amostras foram mantidas congeladas a -20°C .

3.5.7 Análise estatística

A variação da concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, da concentração sérica de PTH, da excreção urinária de flúor e do fluxo urinário, nos diferentes horários do dia foi avaliada por ANOVA a dois critérios de medidas repetidas (dia x horário de coleta) e teste de Tukey para comparações individuais. Adotou-se um nível de significância de 5%.

A variação da concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, da concentração sérica de PTH, da excreção urinária de flúor e do fluxo urinário, nos diferentes horários do dia foi ainda avaliada por ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey para comparações individuais. Adotou-se um nível de significância de 5%.

A correlação entre a concentração plasmática de flúor (variável dependente) e os demais parâmetros avaliados (concentração sérica de PTH, concentração plasmática de Ca^{2+} e fósforo, excreção urinária de flúor e fluxo urinário) foi avaliada por regressão linear múltipla, tomando-se estes parâmetros como variáveis independentes.

A correlação da concentração plasmática de flúor com os demais parâmetros avaliados (concentração sérica de PTH, concentração plasmática de Ca^{2+} e fósforo, excreção urinária de flúor e fluxo urinário), individualmente, da concentração sérica de PTH com a concentração de Ca^{2+} no plasma e com a excreção urinária de flúor, e da concentração de flúor na urina com o fluxo urinário, foi avaliada por regressão linear. Adotou-se um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

As concentrações de flúor no plasma em função do dia e dos horários de coleta de sangue estão descritas na Figura 9 e na Tabela 2. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=6,225$, $p=0,003$) e entre os horários ($F=6,013$, $p=0,004$), havendo interação entre os critérios ($F=3,160$, $p=0,0005$). O teste de Tukey mostrou uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma para as 8 e 11 horas do primeiro dia em relação aos demais dias e horários de coleta, exceto para as 14 horas do primeiro dia e para as 11 horas do segundo e do terceiro dia ($p<0,05$). O teste de Tukey mostrou uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma para as 14 horas do primeiro dia em relação às 17 horas do quarto dia e às 8 e 20 horas do quinto dia. O teste de Tukey ainda mostrou uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma para as 11 horas do segundo dia em relação às 17 horas do quarto dia e às 8 horas do quinto dia, e para as 11 horas do terceiro dia em relação às 17 horas do quarto dia ($p<0,05$).

Tabela 2. Concentração média de flúor no plasma ($\pm$ DP; unidade $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em função do dia e dos horários de coleta de sangue. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

	[F] no plasma				
	1º. dia	2º. dia	3º. dia	4º. dia	5º. dia
8 h	0,65 $\pm$ 0,11 ^b	0,51 $\pm$ 0,10 ^{a,d,e,f,g}	0,53 $\pm$ 0,07 ^{a,d,e,f,g}	0,48 $\pm$ 0,09 ^{a,d,e,f,g}	0,47 $\pm$ 0,08 ^{c,f,g}
11 h	0,64 $\pm$ 0,06 ^b	0,56 $\pm$ 0,12 ^{b,d,e}	0,56 $\pm$ 0,06 ^{b,d,e,f}	0,48 $\pm$ 0,07 ^{a,d,e,f,g}	0,50 $\pm$ 0,07 ^{a,d,e,f,g}
14 h	0,57 $\pm$ 0,10 ^{b,d}	0,52 $\pm$ 0,10 ^{a,d,e,f,g}	0,51 $\pm$ 0,06 ^{a,d,e,f,g}	0,51 $\pm$ 0,05 ^{a,d,e,f,g}	0,53 $\pm$ 0,04 ^{a,d,e,f,g}
17 h	0,52 $\pm$ 0,07 ^{a,d,e,f,g}	0,52 $\pm$ 0,06 ^{a,d,e,f,g}	0,51 $\pm$ 0,08 ^{a,d,e,f,g}	0,46 $\pm$ 0,05 ^{c,g}	0,49 $\pm$ 0,05 ^{a,d,e,f,g}
20 h	0,51 $\pm$ 0,05 ^{a,d,e,f,g}	0,49 $\pm$ 0,09 ^{a,d,e,f,g}	0,50 $\pm$ 0,07 ^{a,d,e,f,g}	0,49 $\pm$ 0,04 ^{a,d,e,f,g}	0,47 $\pm$ 0,05 ^{c,e,f,g}

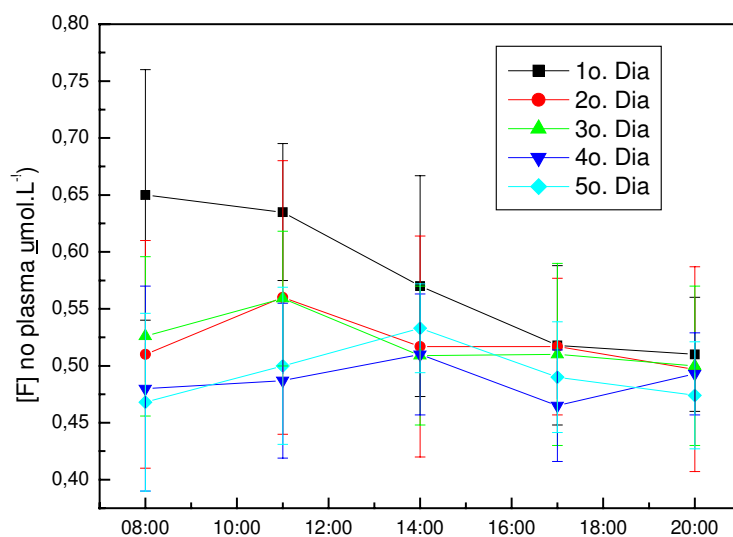


Figura 9. Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental ($n=5$; $F=3,160$, $p=0,0005$). Os dados estão mostrados como média da concentração de flúor no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dias estão descritas na Figura 10. Para o primeiro dia, houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue ($p=0,0015$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações múltiplas aponta diferença estatisticamente significativa para os valores das 8 horas quando comparado com 17 e 20 horas ($p<0,01$), e para os valores das 11 horas quando comparado com 17 e 20 horas ($p<0,05$). Do segundo ao quinto dia, houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue ($p=0,0096$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações múltiplas aponta diferença estatisticamente significativa apenas para os valores das 11 horas quando comparado com 20 horas ($p<0,05$). Uma ritmicidade nas concentrações de flúor no plasma é sugerida, com o pico ocorrendo entre as 8 e as 11 horas, e o declínio ocorrendo entre as 17 e 20 horas. Apesar das diferenças nas concentrações de flúor no plasma para o primeiro e do segundo ao quinto dia, uma semelhança entre os perfis pode ser observada. Para o primeiro dia, as concentrações médias de flúor no plasma ($\pm$ DP) para as 8, 11, 14, 17 e 20 horas foram, $0,65 \pm 0,11$, $0,63 \pm 0,06$, $0,57 \pm 0,10$, $0,52 \pm 0,07$ e $0,51 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Do segundo ao quinto dia, as concentrações médias de flúor no plasma ($\pm$ DP) para as 8, 11, 14, 17 e 20 horas foram, respectivamente, $0,49 \pm 0,08$, $0,53 \pm 0,08$, $0,52 \pm 0,06$, $0,49 \pm 0,06$ e $0,49 \pm 0,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

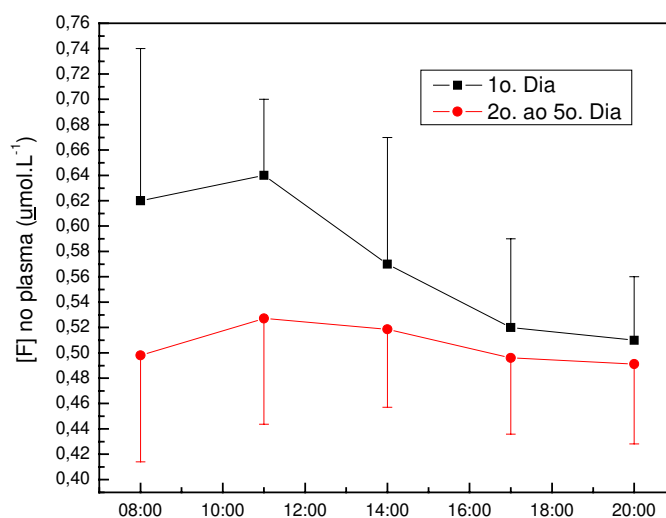


Figura 10. Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro dia (em preto) e do segundo ao quinto dia (em vermelho) ($n=5$). Os dados estão mostrados como média da concentração de flúor no plasma. As barras indicam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p=0,0015$ para o primeiro dia; do segundo ao quinto dia, $p=0,0096$).

As concentrações de flúor no plasma do primeiro ao quinto dia em função dos horários de coleta de sangue estão descritas nas Figuras 11 e 12. Houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue ($p=0,0029$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações múltiplas somente aponta diferença estatisticamente significativa para os valores das 11 horas quando comparado com 17 e 20 horas ($p<0,05$). Na Figura 11 temos as concentrações médias de flúor no plasma para os 5 voluntários. Uma ritmicidade nas concentrações de flúor no plasma foi evidenciada, com o pico $0,55 \pm 0,10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ocorrendo às 11 horas, e o declínio, $0,50 \pm 0,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ocorrendo entre as 17 e 20 horas. O perfil das variações das concentrações médias de flúor no plasma ao longo dos 5 dias para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente, é mostrado na Figura 12 A. Apesar das diferenças individuais nas concentrações de flúor no plasma, uma semelhança entre os perfis pode ser observada. As concentrações médias de flúor no plasma ($\pm$ DP) para V1 a V5, no pico e no declínio (17 horas), foram, $0,53 \pm 0,07$ e $0,50 \pm 0,05$; $0,67 \pm 0,09$ e $0,57 \pm 0,06$; $0,48 \pm 0,08$ e $0,44 \pm 0,03$; $0,52 \pm 0,03$ e $0,48 \pm 0,04$; e $0,57 \pm 0,11$ e $0,49 \pm 0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3).

As concentrações de flúor no plasma ao longo de cada dia em função dos horários de coleta de sangue para os voluntários 1 a 5, individualmente, estão descritas na Figura 12, de B a F, respectivamente. Apesar das diferenças intra e interindividuais encontradas para as concentrações de flúor no plasma, o perfil médio ao longo dos 5 dias é semelhante para todos os voluntários.

Tabela 3. Concentração plasmática de flúor ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) em função do horário de coleta de sangue ao longo de cada dia para cada voluntário.

		[F] no plasma					
Voluntário		1º. dia	2º. dia	3º. dia	4º. dia	5º. dia	Média $\pm$ DP
V1	8 h	0,76	0,44	0,47	0,48	0,45	0,52 $\pm$ 0,13
	11 h	0,61	0,49	0,56	0,47	0,51	0,53 $\pm$ 0,07
	14 h	0,56	0,44	0,51	0,51	0,52	0,50 $\pm$ 0,05
	17 h	0,52	0,46	0,55	0,49	0,48	0,50 $\pm$ 0,05
	20 h	0,48	0,43	0,46	0,53	0,42	0,46 $\pm$ 0,06
V2	8 h	0,73	0,69	0,64	0,64	0,60	0,66 $\pm$ 0,06
	11 h	0,68	0,71	0,66	0,61	0,61	0,67 $\pm$ 0,09
	14 h	0,74	0,67	0,62	0,61	0,57	0,65 $\pm$ 0,09
	17 h	0,61	0,62	0,64	0,53	0,54	0,57 $\pm$ 0,06
	20 h	0,60	0,63	0,63	0,54	0,53	0,59 $\pm$ 0,04
V3	8 h	0,55	0,50	0,48	0,44	0,42	0,47 $\pm$ 0,05
	11 h	0,67	0,42	0,52	0,43	0,43	0,48 $\pm$ 0,08
	14 h	0,52	0,43	0,48	0,47	0,48	0,47 $\pm$ 0,03
	17 h	0,44	0,47	0,48	0,40	0,43	0,44 $\pm$ 0,03
	20 h	0,48	0,39	0,53	0,47	0,43	0,46 $\pm$ 0,05
V4	8 h	0,51	0,45	0,50	0,39	0,40	0,45 $\pm$ 0,06
	11 h	0,54	0,54	0,54	0,47	0,50	0,52 $\pm$ 0,03
	14 h	0,49	0,55	0,46	0,51	0,58	0,51 $\pm$ 0,05
	17 h	0,46	0,53	0,45	0,47	0,54	0,48 $\pm$ 0,04
	20 h	0,49	0,52	0,45	0,47	0,50	0,48 $\pm$ 0,02
V5	8 h	0,72	0,50	0,55	0,48	0,47	0,53 $\pm$ 0,10
	11 h	0,69	0,66	0,52	0,47	0,46	0,57 $\pm$ 0,11
	14 h	0,55	0,51	0,49	0,50	0,52	0,51 $\pm$ 0,02
	17 h	0,57	0,52	0,45	0,45	0,47	0,49 $\pm$ 0,05
	20 h	0,53	0,48	0,45	0,47	0,49	0,48 $\pm$ 0,03

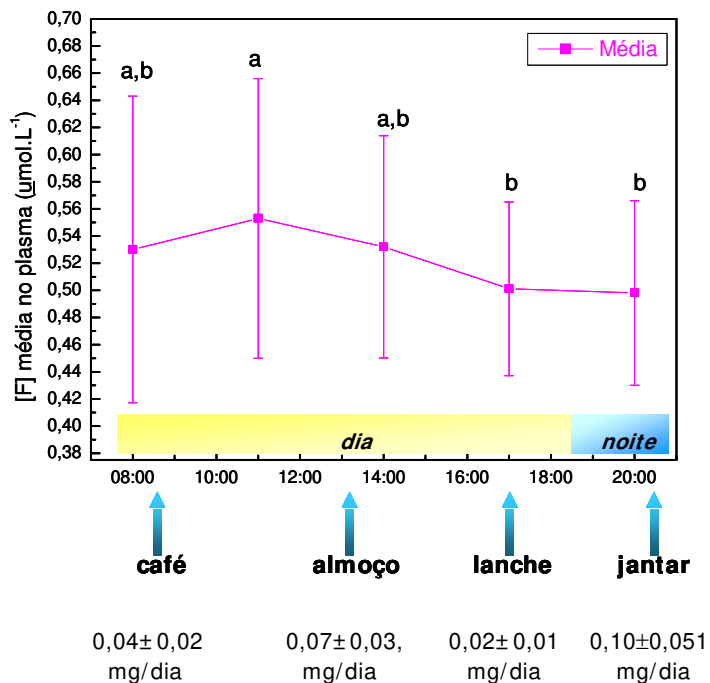


Figura 11. Concentração de flúor no plasma em função dos horários de coleta de sangue (n=5). Os dados estão mostrados como média da concentração de flúor no plasma. As barras indicam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes (p=0,0029).

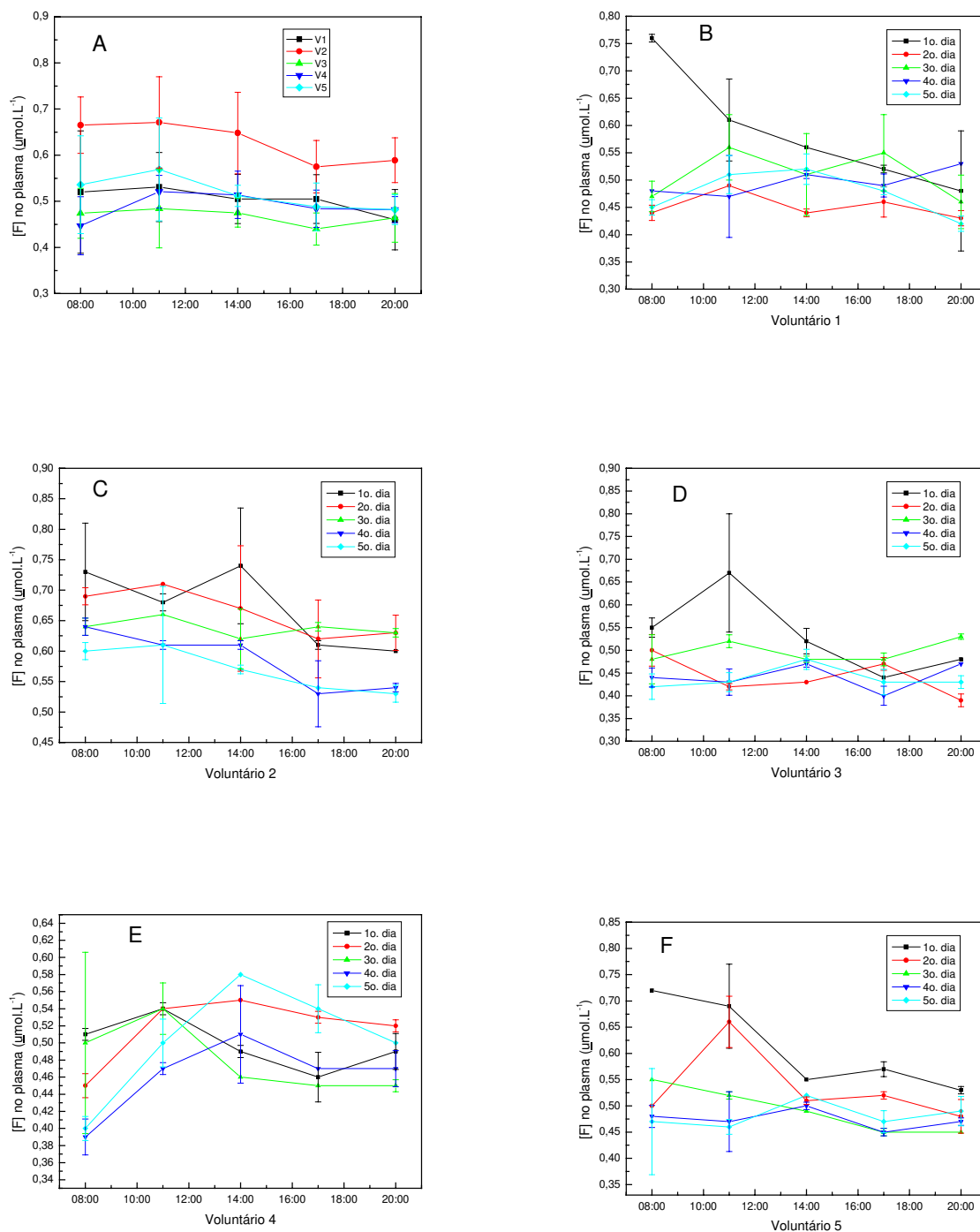


Figura 12. Perfil das variações das concentrações médias de flúor no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. A) média dos 5 dias para cada

voluntário; B a $\bar{A}$ perfil diário para V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente. Os dados estão mostrados como média da concentração de flúor no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de PTH no soro em função do dia e dos horários de coleta de sangue estão descritas na Figura 13. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=0,057$, $p=0,993$) e entre os horários ($F=0,391$, $p=0,812$), não havendo interação entre os critérios ($F=0,337$, $p=0,991$).

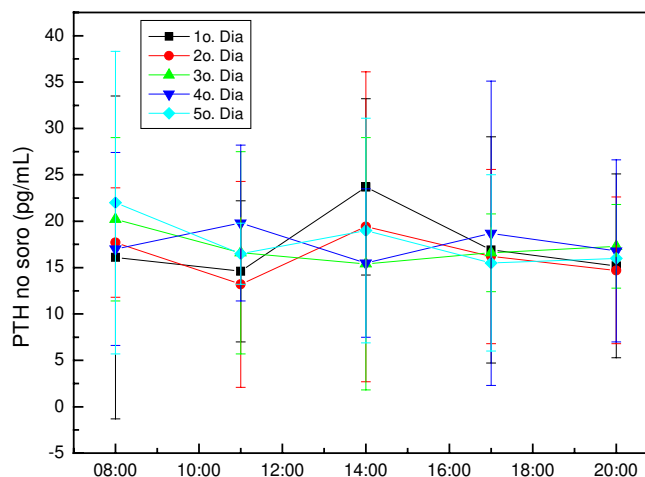


Figura 13. Concentração de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental ($n=5$; $F=0,337$, $p=0,991$). Os dados estão mostrados como média da concentração de PTH no soro. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dia estão descritas na Figura 14. Não houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue tanto no primeiro ($p=0,6513$), como entre o segundo e o quinto dia ($p=0,8368$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. Uma semelhança entre os perfis entre as 8 e as 11 horas, e a partir das 17 horas, pode ser observada.

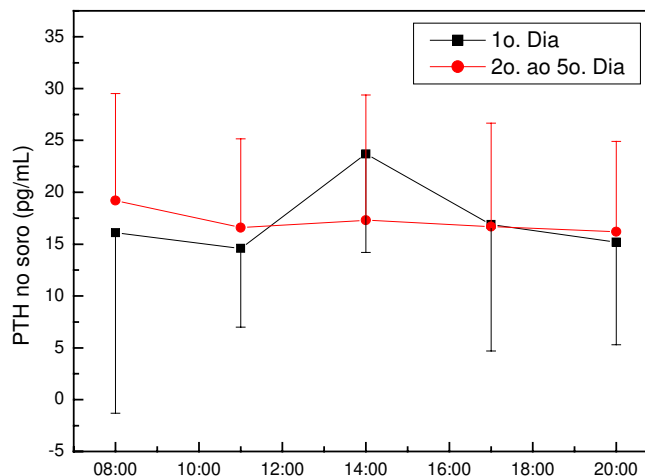


Figura 14. As concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dia ($n=5$). Os dados estão mostrados como média da concentração de PTH no soro. As barras indicam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p=0,6513$ e $p=0,8368$ para o primeiro e do segundo ao quinto dia, respectivamente).

As concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue estão descritas nas Figuras 15 e 16. As concentrações médias de PTH no soro para os 5 voluntários, mostradas na Figura 15, também mostram uma ritmicidade, apresentando pontos de pico e declínio alternados. Houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue ($p=0,0004$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações individuais apontou diferença estatisticamente significativa para os valores das 8 e das 11 horas quando comparados com 14 e 20 horas ($p<0,05$). Apesar das diferenças individuais nas concentrações médias de PTH no soro, uma semelhança no perfil das variações ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente, é mostrada na Figura 16.

Uma correlação positiva entre a concentração média de flúor no plasma e a concentração média de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue é observada na análise das Figuras 11 e 15 ($p=0,0252$; $r=0,2035$).

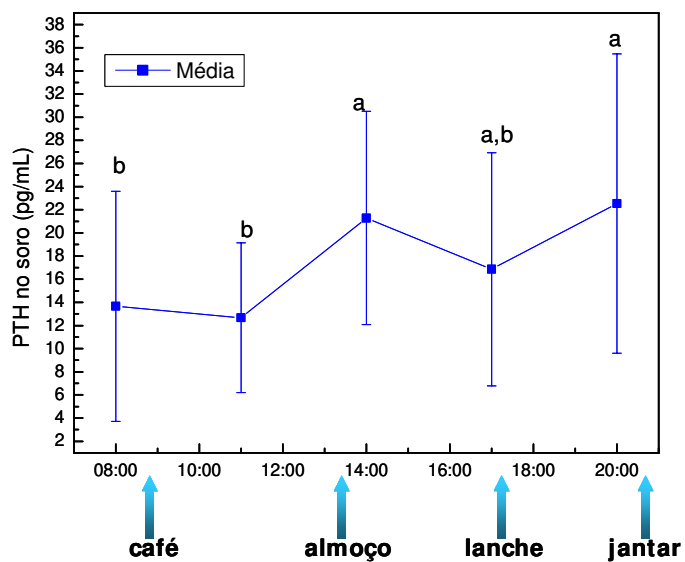


Figura 15. Concentração de PTH no soro em função dos horários de coleta de sangue (n=5). Os dados estão mostrados como média da concentração de PTH no soro. As barras indicam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p=0,0004$).

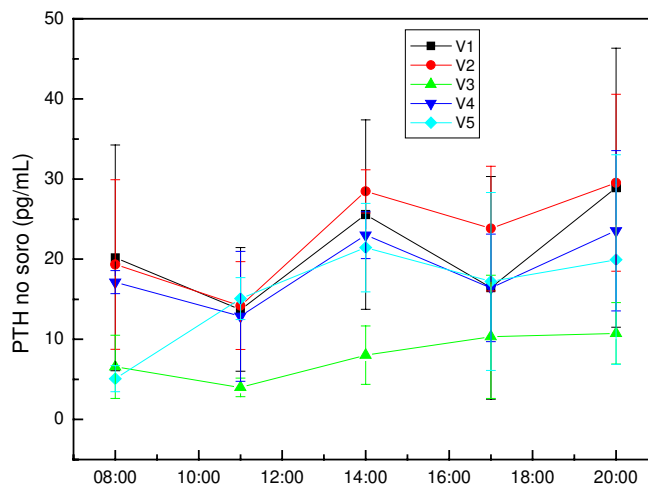


Figura 16. Perfil das variações das concentrações de PTH no soro ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. Os dados estão mostrados como média da concentração de PTH no soro. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de Ca^{2+} no plasma em função do dia e dos horários de coleta de sangue estão descritas na Figura 17. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=4,090$, $p=0,018$) e entre os horários ($F=3,645$, $p=0,270$), não havendo interação entre os critérios ($F=1,075$, $p=0,396$). O teste de Tukey mostrou uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de Ca^{2+} no plasma entre o primeiro e quinto dia, e entre o quarto e o quinto dia, bem como entre as 11 e as 17 horas ($p<0,05$).

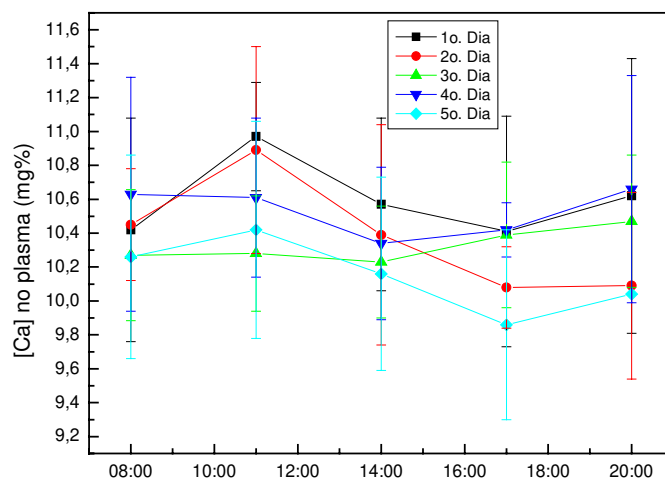


Figura 17. Concentração de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental ($n=5$; $F=1,075$, $p=0,396$). Os dados estão mostrados como média da concentração de Ca^{2+} no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dia estão descritas na Figura 18. Não houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue tanto no primeiro ($p=0,1797$), como entre o segundo e o quinto dia ($p=0,0582$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. Apesar das diferenças nas concentrações de Ca^{2+} no plasma para o primeiro e do segundo ao quinto dia, uma semelhança entre os perfis pode ser observada.

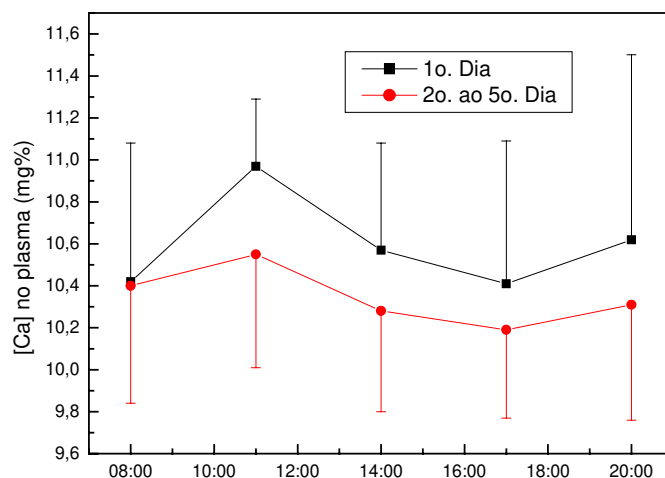


Figura 18. Perfil das variações das concentrações de Ca^{2+} no plasma ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia. Os dados estão mostrados como média da concentração de Ca^{2+} no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

A Figura 19 descreve o perfil das variações das concentrações médias de Ca^{2+} no plasma dos 5 voluntários em função do tempo. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue ($p=0,0224$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações individuais somente apontou diferença estatisticamente significativa para os valores das 11 horas quando comparado com 17 horas ($p<0,05$). A Figura 20 mostra o perfil das variações das concentrações médias ao longo do dia para os voluntários V1 a V5, individualmente.

Nenhuma relação estatisticamente significativa foi observada entre as concentrações plasmáticas de flúor e de Ca^{2+} em função dos horários de coleta de sangue (Figuras 11 e 19, $p=0,2517$; $r=-0,1046$). Uma correlação significativa foi encontrada entre as concentrações médias de PTH no soro e as concentrações médias de Ca^{2+} no plasma, dos 5 voluntários (Figuras 15 e 19, $p=0,0003$; $r=-0,3230$).

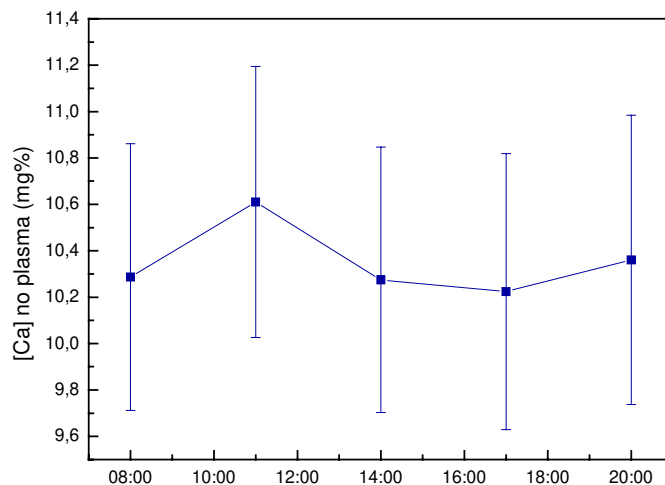


Figura 19. Concentração de Ca^{2+} no plasma em função dos horários de coleta de sangue ($n=5$). Os dados estão mostrados como média da concentração de Ca^{2+} no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

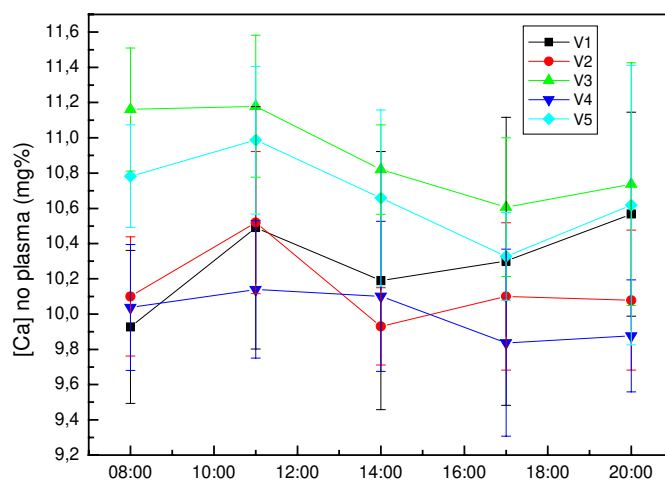


Figura 20. Perfil das variações das concentrações de Ca^{2+} no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. Os dados estão mostrados como média da concentração de Ca^{2+} no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de fósforo no plasma em função do dia e dos horários de coleta de sangue estão descritas na Figura 21. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=0,053$, $p=0,994$) e entre os horários ($F=0,261$, $p=0,898$), não havendo interação entre os critérios ($F=1,216$, $p=0,280$).

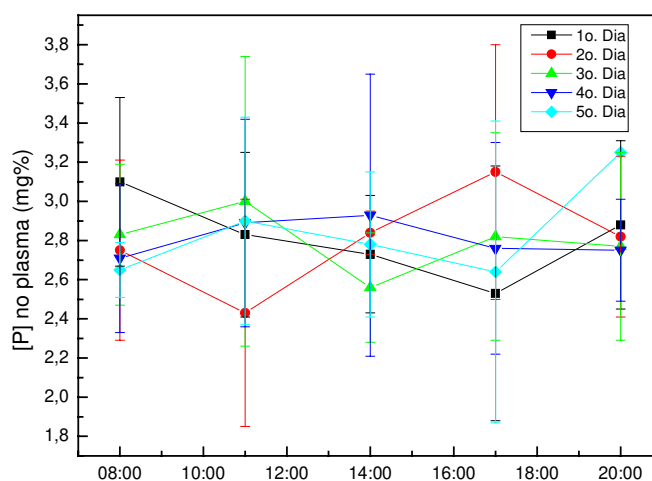


Figura 21. Concentração de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue em cada dia experimental ($n=5$; $F=1,216$, $p=0,280$). Os dados estão mostrados como média da concentração de fósforo no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As concentrações de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue para o primeiro e do segundo ao quinto dia estão descritas na Figura 22. Não houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue tanto no primeiro ($p=0,4896$), como entre o segundo e o quinto dias ($p=0,8258$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. Há uma tendência ao sentido oposto entre os perfis das concentrações de fósforo no plasma para o primeiro e do segundo ao quinto dia.

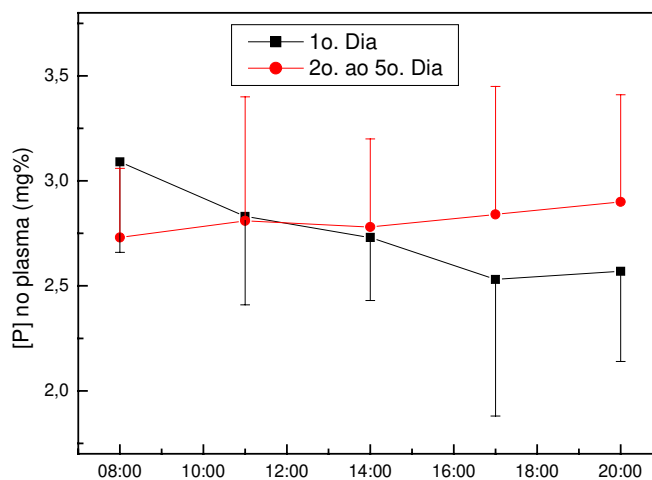


Figura 22. Perfil das variações das concentrações de fósforo no plasma ao longo do para o primeiro e do segundo ao quinto dia. Os dados estão mostrados como média da concentração de fósforo no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

As Figuras 23 e 24 mostram o perfil das variações das concentrações plasmáticas de fósforo em função dos horários de coleta de sangue. A variação das concentrações médias dos 5 voluntários é mostrada na Figura 23. A Figura 24 mostra as variações das concentrações médias de fósforo para os voluntários V1 a V5, individualmente.

Nenhuma relação estatisticamente significativa foi observada entre as concentrações plasmáticas de flúor e de fósforo em função dos horários de coleta de sangue (Figuras 11 e 23, $p=0,7042$; $r=-0,0356$).

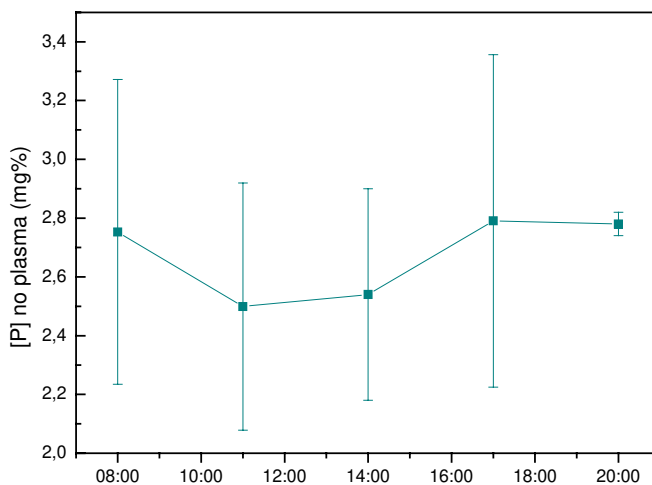


Figura 23. Concentração de fósforo no plasma em função dos horários de coleta de sangue (n=5). Os dados estão mostrados como média da concentração de fósforo no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

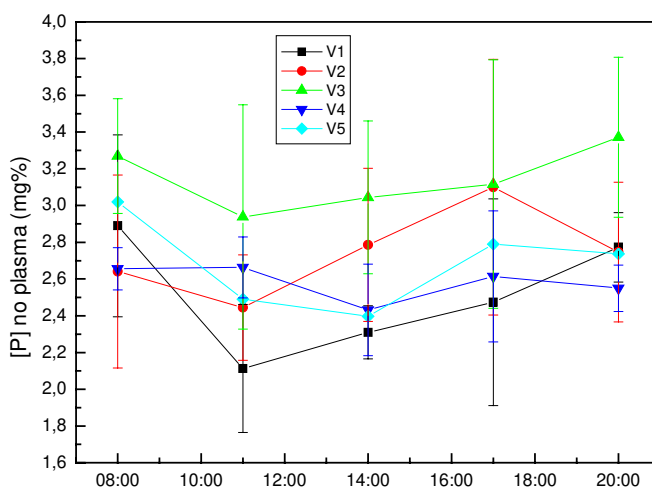


Figura 24. Perfil das variações das concentrações de fósforo no plasma ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. Os dados estão mostrados como média da concentração de fósforo no plasma. As barras indicam o desvio padrão.

A excreção de flúor pela urina em função do dia e dos horários de coleta estão descritas na Figura 25. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=1,634$, $p=0,214$) e entre os horários ($F=1,343$, $p=0,297$), não havendo interação entre os critérios ($F=0,734$, $p=0,749$).

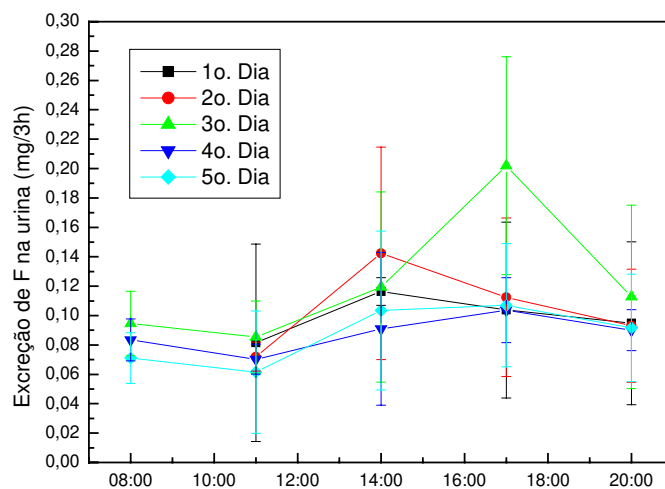


Figura 25. Excreção de flúor pela urina em função dos horários de coleta em cada dia experimental ($n=5$; $F=0,734$, $p=0,749$). Os dados estão mostrados como média da excreção de flúor na urina. As barras indicam o desvio padrão.

O perfil da excreção de flúor pela urina ao longo do dia para o primeiro e do segundo ao quinto dia está descrito na Figura 26. Não houve uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações de flúor excretadas na urina em função dos horários de coleta tanto no primeiro ($p=0,8406$), como entre o segundo e o quinto dia ($p=0,5614$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. Uma semelhança entre os perfis pode ser observada.

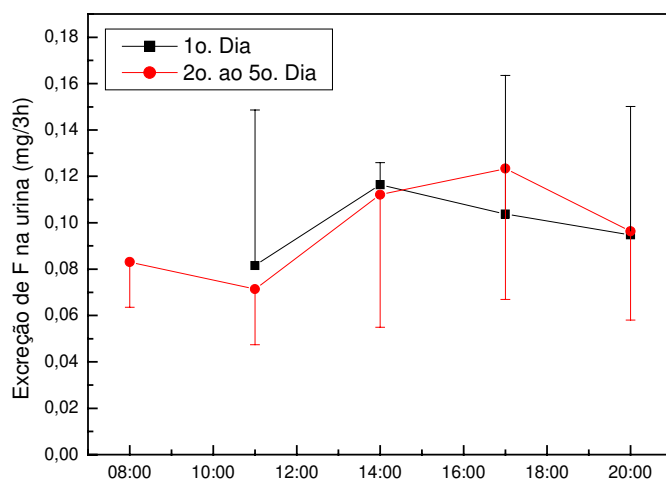


Figura 26. Perfil das variações das concentrações de flúor excretadas pela urina ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia. Os dados estão mostrados como média da excreção de flúor pela urina. As barras indicam o desvio padrão.

As Figuras 27 e 28 descrevem, respectivamente, o perfil das variações das concentrações médias de flúor excretadas na urina ao longo do dia para os 5 voluntários e para os voluntários V1 a V5, individualmente. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa na excreção urinária de flúor ao longo do dia ($p=0,0260$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações múltiplas somente apontou diferença estatisticamente significativa para os valores das 11 horas quando comparado com 17 horas ($p<0,05$).

A correlação entre as concentrações médias de flúor no plasma e a excreção média de flúor pela urina a cada 3 horas, dos 5 voluntários, é descrita pelas Figuras 11 e 27 ($p=0,0008$; $r=0,3296$).

A análise das Figuras 15 e 27 mostra a correlação estatisticamente significativa encontrada entre as concentrações médias de PTH no soro e a excreção média de flúor pela urina a cada 3 horas, dos 5 voluntários ($p=0,0087$; $r=0,2624$).

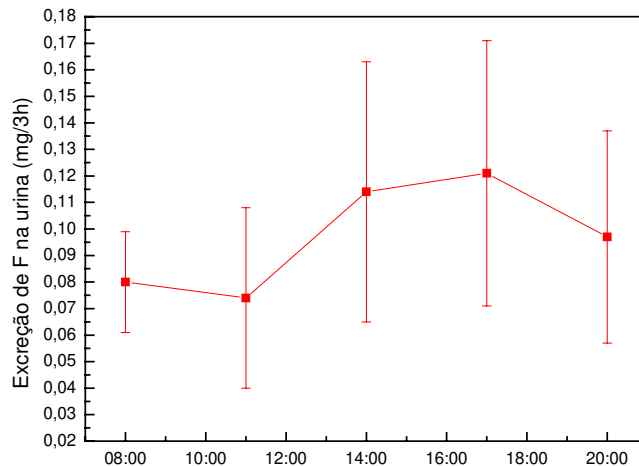


Figura 27. Perfil das variações das concentrações médias de flúor excretadas pela urina ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5). Os dados estão mostrados como média da concentração de flúor e média da excreção de flúor pela urina. As barras indicam o desvio padrão.

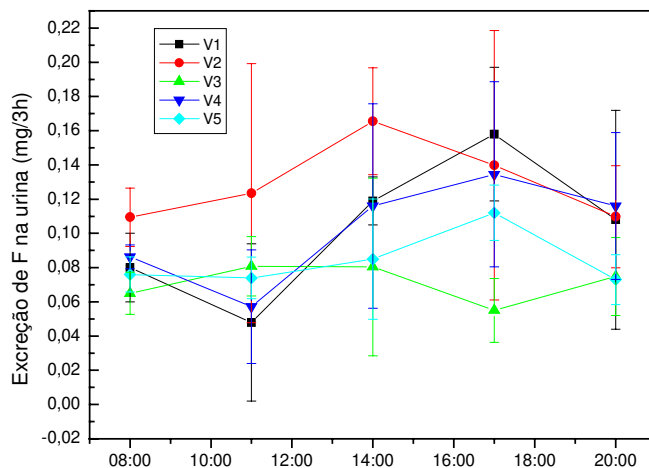


Figura 28. Perfil das variações das concentrações de flúor excretadas pela urina ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. Os dados estão mostrados

como média da concentração de flúor e média da excreção de flúor pela urina. As barras indicam o desvio padrão.

O fluxo urinário em função do dia e dos horários de coleta está descrito na Figura 29. A ANOVA a dois critérios de medidas repetidas não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias ($F=1,480$, $p=0,255$), mas revelou entre os horários ($F=3,546$, $p=0,029$), não havendo interação entre os critérios ($F=1,038$, $p=0,430$). O teste de Tukey mostrou uma diferença estatisticamente significativa para o fluxo das 17 horas em relação às 8 e às 11 horas.

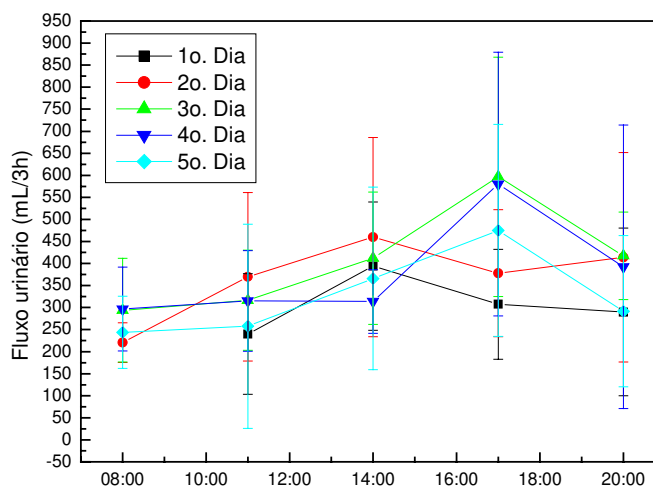


Figura 29. Fluxo urinário em função dos horários de coleta em cada dia experimental ($n=5$; $F=1,038$, $p=0,430$). Os dados estão mostrados como média do fluxo urinário. As barras indicam o desvio padrão.

O perfil do fluxo urinário ao longo do dia para o primeiro e do segundo ao quinto dia está descrito na Figura 30. Para o primeiro dia, não houve uma diferença estatisticamente significativa no fluxo urinário em função dos horários de coleta ($p=0,4363$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. Entre o segundo e o quinto dia houve uma diferença estatisticamente significativa no fluxo urinário em função dos horários de coleta ($p=0,0001$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações múltiplas aponta diferença estatisticamente significativa para os valores das 8 horas quando comparado com 17 horas ($p<0,001$), e para os valores das 11 horas quando comparado com 17 horas ($p<0,01$).

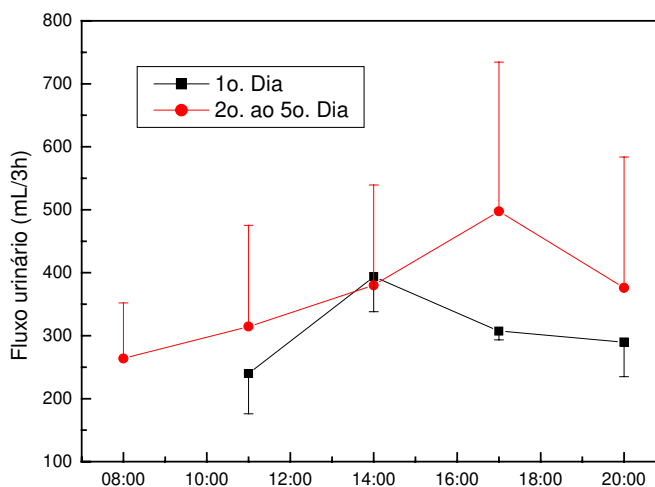


Figura 30. Perfil do fluxo urinário ao longo do primeiro e do segundo ao quinto dia.

Os dados estão mostrados como fluxo urinário médio. As barras indicam o desvio padrão.

O perfil das variações nas taxas de fluxo urinário ao longo do dia para a média dos 5 voluntários e para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente, é descrito nas Figuras 31 e 32, respectivamente. Houve uma diferença estatisticamente significativa no fluxo urinário ao longo do dia ($p=0,0064$), conforme avaliado pela ANOVA de medidas repetidas. O teste de Tukey para variações individuais somente apontou diferença estatisticamente significativa para os valores das 8 horas quando comparado com 17 e 20 horas ($p<0,05$), e para os valores das 11 horas quando comparado com 17 horas ($p<0,01$).

A correlação negativa entre as concentrações médias de flúor no plasma e a taxa de fluxo urinário média a cada 3 horas, é observada nas Figuras 11 e 31 ($p=0,0262$; $r=-0,2159$).

A análise das Figuras 27 e 31 revela a correlação extremamente significativa encontrada entre a concentração média de flúor excretada pela urina e o fluxo urinário médio, dos 5 voluntários ($p<0,0001$; $r=0,3873$).

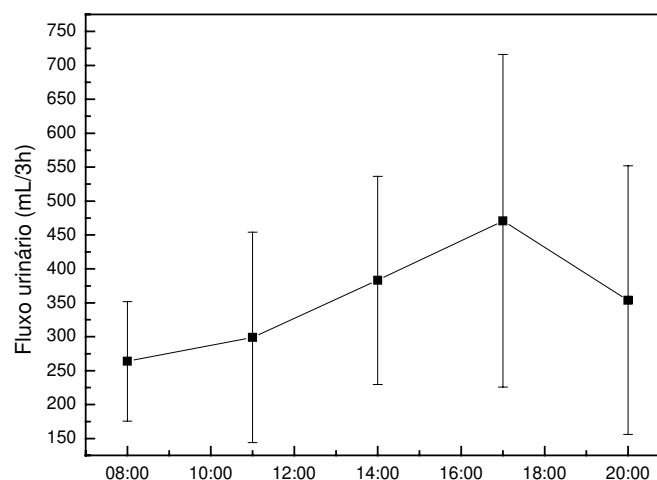


Figura 31. Perfil das variações do fluxo urinário médio dos 5 voluntários ao longo do dia. Os dados estão mostrados como média do fluxo urinário. As barras indicam o desvio padrão.

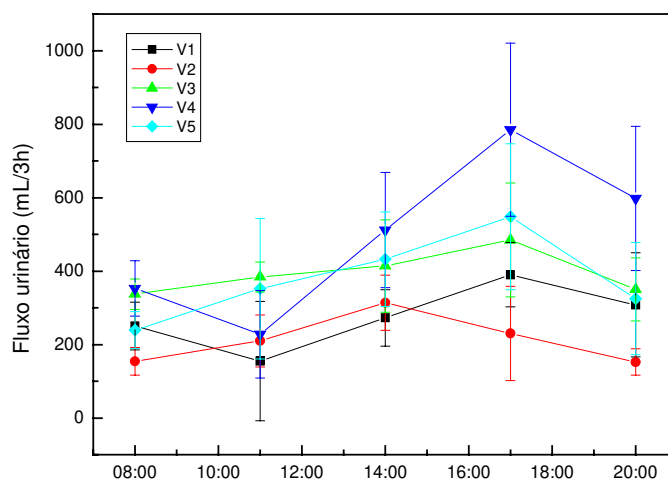


Figura 32. Perfil das variações do fluxo urinário ao longo do dia para os 5 voluntários (V1 a V5), individualmente. Os dados estão mostrados como média do fluxo urinário. As barras indicam o desvio padrão.

Os valores médios encontrados para todos os parâmetros avaliados (concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, concentração sérica de PTH, excreção urinária de flúor e fluxo urinário) em função das diferentes horas do dia estão descritos na Tabela 4.

A Tabela 5 mostra a correlação entre todos os parâmetros avaliados (concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, concentração sérica de PTH, excreção urinária de flúor e fluxo urinário) em todos os voluntários. A correlação entre a concentração de flúor no plasma e a excreção de flúor pela urina apresentou uma tendência positiva ($p=0,0008$; $r=0,3296$), enquanto que uma correlação negativa foi observada entre a concentração de flúor no plasma e o fluxo urinário ($p=0,0262$; $r=-0,2159$).

A correlação múltipla entre a média da concentração de flúor no plasma e os outros parâmetros avaliados (concentração plasmática de Ca^{2+} e fósforo, concentração sérica de PTH, excreção urinária de flúor e fluxo urinário) para os voluntários V1 a V5, individualmente, está representada na Tabela 6. Uma tendência positiva para a correlação entre a concentração de flúor no plasma e a excreção de flúor pela urina ($p=0,0008$; $r=0,4267$), e uma correlação negativa entre a concentração de flúor no plasma e o fluxo urinário ($p=0,0091$; $r=-0,0930$), foram observadas apenas para o voluntário 3.

As concentrações médias encontrados para a calcitonina, T3 e T4 livre, e de TSH no soro, estão descritos na Tabela 7.

A ingestão média de flúor através da dieta ($\pm$ DP) no café da manhã, almoço, lanche da tarde e jantar foi de $0,04 \pm 0,02$, $0,07 \pm 0,03$, $0,02 \pm 0,01$ e $0,10 \pm 0,051$ mg/dia, respectivamente (Anexo 2).

Tabela 4. Média ($\pm$ DP) da concentração plasmática de flúor, Ca^{2+} e fósforo, da concentração sérica de PTH, da quantidade de flúor excretado na urina e do fluxo urinário de flúor ao longo dos 5 dias experimentais.

Variável	Unidade	8 h	11 h	14 h	17 h	20 h
[F] no plasma	$\mu\text{M.L}^{-1}$	$0,53 \pm 0,11^{a,b}$	$0,55 \pm 0,10^a$	$0,53 \pm 0,08^{a,b}$	$0,50 \pm 0,06^b$	$0,50 \pm 0,07^b$
[PTH] no soro	pg/mL	$13,66 \pm 9,94^b$	$12,67 \pm 6,47^b$	$21,30 \pm 9,22^a$	$16,86 \pm 10,08^{a,b}$	$22,54 \pm 12,94^a$
$[\text{Ca}^{2+}]$ no plasma	mg%	$10,28 \pm 0,57^{a,b}$	$10,61 \pm 0,58^a$	$10,27 \pm 0,57^{a,b}$	$10,22 \pm 0,59^b$	$10,36 \pm 0,62^{a,b}$
[P] no plasma	mg%	$2,75 \pm 0,52^a$	$2,49 \pm 0,42^a$	$2,54 \pm 0,36^a$	$2,79 \pm 0,57^a$	$2,78 \pm 0,04^a$
[F] na urina	(mg/3h)	$0,08 \pm 0,02^{a,b}$	$0,07 \pm 0,03^a$	$0,11 \pm 0,05^{a,b}$	$0,12 \pm 0,06^b$	$0,1 \pm 0,04^{a,b}$
Fluxo urinário	mL/3h	$263,75 \pm 88,24^a$	$298,94 \pm 155,24^a$	$383,04 \pm 153,31^{a,b}$	$470,9 \pm 245,24^b$	$353,0 \pm 197,9^{a,b}$

* Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha são estatisticamente significantes; (n=25 (5 dados para cada voluntário)).

Tabela 5. Correlação entre os parâmetros avaliados em todos os voluntários

Variáveis	r	P
[F] plasma x [PTH] soro	0,2035	0,0252*
[F] plasma x [Ca ²⁺] plasma	-0,1046	0,2517
[F] plasma x [P] plasma	-0,0356	0,7042
[F] plasma x [F] urina	0,3296	0,0008*
[F] plasma x fluxo urinário	-0,2159	0,0262*
Fluxo urinário x [F] urina	0,3873	<0,0001*
[PTH] soro x [Ca ²⁺] plasma	-0,3230	0,0003*
[PTH] soro x [F] urina	0,2624	0,0087*

* Correlações estatisticamente significantes.

Tabela 6. Correlação múltipla entre as médias das concentrações de flúor no plasma (variável dependente) e outros parâmetros avaliados (variáveis independentes) para cada voluntário e para todos os voluntários.

Voluntários	Variáveis					
	r; p	AxB (r; p)	AxC(r; p)	AxD(r; p)	AxE(r; p)	AxF(r; p)
1	0,55; 0,470	-0,100; 0,354	0,327; 0,192	-0,291; 0,273	-0,028; 0,313	-0,167; 0,357
2	0,50; 0,571	0,168; 0,485	0,038; 0,613	0,052; 0,718	0,299; 0,542	0,442; 0,188
3	0,78; 0,019	0,045; 0,120	-0,004; 0,296	-0,116; 0,313	0,427; 0,0008*	-0,093; 0,009*
4	0,41; 0,732	0,239; 0,449	-0,312; 0,269	0,051; 0,784	0,166; 0,667	0,076; 0,757
5	0,62; 0,348	-0,250; 0,396	0,242; 0,648	0,402; 0,169	-0,295; 0,627	-0,487; 0,423
Todos (V1-V5)	0,62; <0,0001*	0,24; 0,811	-0,27; 0,076	0,04; 0,144	0,37; <0,0001*	-0,26; <0,0001*

* Correlações estatisticamente significantes.

A: concentração de flúor no plasma; B: concentração de PTH no soro; C: concentração de Ca^{2+} no plasma; D: concentração de fósforo no plasma; E: excreção urinária de flúor; F: fluxo urinário.

Tabela 7. Concentrações médias ($\pm$ DP) de calcitonina, T3 e T4 livre, e TSH encontradas no soro.

Horário da coleta	Análise	média $\pm$ DP
8, 11, 14, 17 e 20 h	Calcitonina (pg/mL)	1,0 $\pm$ 0
8 h	T3 livre (ng/dL)	0,39 $\pm$ 0,04
8 h	T4 livre (ng/dL)	0,98 $\pm$ 0,14
8 h	TSH (μ UI/mL)	1,78 $\pm$ 0,58

5. DISCUSSÃO

Para que se pudesse demonstrar um verdadeiro ritmo biológico, a concentração de flúor no plasma em jejum deveria ser constante. Em estudo preliminar, com um voluntário, procuramos determinar o tempo (em dias) necessário para que as alterações de flúor plasmáticas devidas à diminuição na ingestão de flúor seriam estabilizadas ou minimizadas. Um período de 18 dias se mostrou insuficiente tanto para a queda como para a estabilização dos níveis plasmáticos de flúor (dados não mostrados). Temporalmente, em discussões com o Prof. Dr. Gary Milton Whitford, do Medical College of Georgia, Augusta, EUA, nosso colaborador neste projeto, fomos surpreendidos com os achados de um trabalho de Largent (1952). Neste trabalho, o autor aumentou sua ingestão de flúor e analisou sua ingestão e excreção por um longo período, quando então passou a ingerir uma baixa concentração de flúor. Baseado em sua excreção urinária, o autor estimou que levaria aproximadamente 5 anos para que o flúor adicional ingerido, e que foi armazenado em seus ossos, fosse mobilizado e excretado.

Estas evidências nos induziram a questionar qual a relação entre o padrão moderno de ingestão de flúor, principalmente através da dieta e do dentífrico, e a concentração de flúor no plasma em humanos. Assim, delineamos o projeto *“Relação entre a ingestão de flúor e a concentração plasmática de flúor em humanos”* (CARDOSO; WHITFORD; BUZALAF, 2003, 2004). Este trabalho mostrou não haver variação nas concentrações plasmáticas de flúor ao longo do dia mesmo frente à ingestão de flúor por diversas fontes. Os resultados deste estudo ainda sugeriram que as concentrações de flúor no plasma são independentes de um efeito dose-resposta, até que esta ingestão de flúor exceda 3 mg/dia.

Quando consideramos a implicação do dia e da hora nas concentrações de flúor no plasma, nenhum ritmo biológico pode ser observado (Figura 9, Tabela 2). Para a maioria dos dias (após as 14 horas para o primeiro dia, e para os dias segundo, terceiro e quinto), nenhuma variação nas concentrações plasmáticas de flúor ao longo do dia é evidenciada, confirmando a falta de variação nos níveis de flúor em função dos horários de coleta de sangue observada por Cardoso; Whitford; Buzalaf, 2003, 2004. Contudo, embora saibamos que uma análise estatística que considere a influência da hora independentemente do dia nos níveis de flúor no plasma não seja o modelo mais adequado para este estudo, quando consideramos apenas a hora como variável capaz de influenciar os níveis de flúor no plasma, um evidente ritmo biológico nas concentrações de flúor no plasma em humanos pode ser observado (Figura 11). Nesta condição, o pico da concentração de flúor (média $\pm$ DP), $0,55 \pm 0,11 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ocorre às 11 horas, e a depressão da concentração de flúor (média $\pm$ DP), $0,50 \pm 0,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ocorre após 6 horas, às 17 horas, permanecendo até as 20 horas. A variabilidade do perfil dos níveis de flúor durante o dia é consistente com a descrita para humanos quando sua ingestão diária de flúor não excede a 1 mg (CARDOSO; WHITFORD; BUZALAF, 2004), bem como à descrita em cães por Whitford (1996), embora os horários de pico e depressão entre os estudos sejam diferentes. No trabalho realizado por Cardoso; Whitford; Buzalaf (2004), o pico da concentração de flúor no plasma também ocorreu pela manhã, às 12 horas, e a depressão da concentração de flúor ocorreu às 16 horas. Contudo, como os horários de coleta de sangue foram diferentes (a cada 4 horas, das 8 às 20 horas), os horários das refeições não foram padronizados, e os voluntários fizeram uso de dentifrício fluoretado, o que poderia promover um pico artificial (induzido) nas concentrações de flúor no plasma, os horários de pico e depressão entre os dois experimentos não deveriam ser comparados. No trabalho realizado por Whitford, o pico da concentração de flúor no plasma

também ocorreu pela manhã, às 9 horas, e a depressão da concentração de flúor ocorreu após exatas 12 horas, às 21 horas. Esta diferença para os horários de pico e depressão poderiam ser explicadas pelo fato de os cães terem sido expostos a um ciclo de 12 horas em claro (6-18 horas) e de 12 horas em escuro (18-6 horas), enquanto os voluntários do presente estudo não foram. A regulação da expressão dos ritmos endógenos pela alternância claro/escuro se deve ao fato de que pulsos de luz aplicados na fase de escuro têm efeitos diferentes sobre eles, aumentando ou diminuindo o período dos ritmos em função do momento de incidência de pulsos. Alterações periódicas da intensidade dessa luz também podem afetar os períodos dos ritmos biológicos (MENDES, 1999).

Por outro lado, se as condições ambientais do presente estudo tivessem sido adequadamente controladas, como envolvendo o alojamento dos voluntários em um quarto sem janelas, com exposição contínua a alimentos, ausente ainda de qualquer estímulo visual e auditivo capaz de orientar a hora que se fazia durante o dia, talvez a influência do dia realmente pudesse ser desconsiderada, sendo as concentrações de flúor no plasma dependentes apenas do horário de coleta de sangue, confirmando, assim, o ritmo biológico para as concentrações de flúor no plasma observado. Mesmo unicelulares, metafitas e metazoários, à sua maneira, “percebem” o tempo que passa, ajustando seus ritmos a ciclos temporais. Ainda que se possa discutir se tais ritmos são exógenos ou endógenos, a tendência preponderante é admitir que tais ritmos, de alguma maneira, acabam se tornando inatos, ajustando-se mais ao tempo que passa (horas) que ao tempo que faz (temperatura) (MENDES, 1999).

No mais, um aspecto interessante é que mesmo para as análises onde a interação entre o dia e a hora são consideradas, para as poucas diferenças encontradas entre as concentrações de flúor no plasma, uma relação entre um pico para as 11 horas e um declínio

para as 17 horas parece ocorrer. Diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de flúor no plasma foram encontradas para as 11 horas do segundo dia em relação às 17 horas do quarto dia, e para as 11 horas do terceiro dia em relação às 17 horas do quarto dia (Figura 9).

Ainda, quando analisamos o primeiro dia experimental isoladamente dos dias segundo ao quinto, observamos que embora os níveis de flúor no plasma tenham sido bem maiores para o primeiro dia em relação aos demais, o perfil ao longo do dia foi bastante semelhante. Isto novamente reforça a existência de um ritmo biológico para as concentrações de flúor no plasma, independentemente dos níveis de flúor alcançados, com o pico ocorrendo entre as 8 e as 11 horas, e o declínio ocorrendo entre as 17 e as 20 horas (Figura 10). Para os altos níveis de flúor no plasma encontrados para as 8 horas no primeiro dia, podemos dizer que estes valores estão sendo influenciados pelos voluntários 1, 2 e 5 (Figura 12 *B*, *C* e *F*, respectivamente). A diferença para os níveis de flúor encontrado para o primeiro dia em relação aos demais ainda sugere que quando a ingestão de flúor é minimizada, é no período das próximas 12 a 24 horas que ocorre a variação máxima na concentração de flúor no plasma devida à troca de flúor entre a superfície óssea e o plasma. No presente estudo, os voluntários modificaram sua dieta a partir do primeiro dia experimental, onde passaram a ingerir uma dieta com baixa concentração de flúor. Isto talvez ajude a explicar por que, no estudo preliminar, um período de 18 dias se mostrou insuficiente para a queda dos níveis plasmáticos de flúor (dados não mostrados). Como a voluntária normalmente ingeria porções pequenas de alimentos a cada refeição, e esta quantidade não havia sido modificada, como aconteceu no experimento oficial, parece bastante provável que a redução da ingestão de flúor pela dieta não possa ter sido detectada no plasma. No mais, devemos ainda considerar os achados de Cardoso; Whitford; Buzalaf (2004), onde os autores sugerem que as

concentrações de flúor no plasma são independentes de um efeito dose-resposta, até que esta ingestão de flúor exceda 3 mg/dia.

Um achado interessante é que quando analisamos as variações nos níveis de flúor no plasma dia a dia, os dados sugerem não apenas uma discreta queda nos níveis de flúor com o passar dos dias, mas também que esta variação é modulada a cada período de 48 horas, ou seja, a cada dois dias o perfil dos níveis de flúor no plasma tem uma alteração em sua trajetória (Figura 9). No presente estudo, observamos o mesmo perfil para o segundo e o terceiro dia, e depois para o quarto e quinto dia. No entanto, mais uma vez os dados sugerem que apesar das variações intra e interindividuais (Figura 12 de *B a F*), o perfil para a média das concentrações de flúor no plasma para cada voluntário tende a ser o mesmo (Figura 12 *A*), descrevendo um ritmo para os níveis de flúor no plasma. Para V1, o perfil encontrado para o primeiro e o segundo dia é que determina a curva biológica. Para V2 são o segundo, o terceiro e o quinto dias. Para V3 são os dias quatro e cinco. Para V4 e V5 são o primeiro e o segundo e o segundo e o terceiro dias, respectivamente. Estes dados talvez possam explicar por que, no estudo preliminar, um período de 18 dias se mostrou insuficiente para a estabilização dos níveis plasmáticos de flúor (dados não mostrados).

A análise destes dados em conjunto poderia sugerir que ao invés de uma ritmicidade para o flúor, o que o perfil das concentrações de flúor no plasma ao longo dos dias deste estudo descreve é apenas uma mobilização de flúor do osso. No entanto, devemos considerar que trinta dias antes do estudo os voluntários passaram a usar dentifrício sem flúor, e ainda, que os voluntários já bebiam água mineral sem flúor. Desta forma, a mobilização de flúor do osso já teria começado há pelo menos trinta dias antes do experimento. No mais, se o impacto da redução da ingestão de flúor pela dieta tivesse sido tão marcante, não teríamos encontrado uma diferença para os níveis de flúor no plasma

apenas para o primeiro dia em relação aos demais, mas dia após dia, durante um certo período, a não ser que a variação máxima na concentração de flúor no plasma devida à troca de flúor entre a superfície óssea e o plasma, após a redução da ingestão de flúor, realmente ocorra no período das próximas 12 a 24 horas, o que, na verdade, também descartaria a hipótese única de mobilização de flúor do osso, uma vez que o presente estudo durou 5 dias. Um outro aspecto é que a excreção de flúor ao longo dos cinco dias experimentais foi constante (Figura 25), exceto para o pico das 17 horas encontrado no terceiro dia. Uma outra possibilidade é que entre 12 a 24 horas após a descontinuação da ingestão de flúor, uma liberação máxima de flúor do osso para o plasma ocorresse, e que a partir de então, a liberação de flúor do osso para o plasma previnisse a queda dos níveis de flúor no plasma (COSTEAS; WOODWARD; EKSTRAND, 1996; ERICSSON; HELLSTROM; HOFVANDER, 1972; HALL et al., 1977; LAUGHLIN, 1971; LIKINS; MCCLURE; STEERE, 1956; NEUMAN; NEUMAN, 1958 apud WHITFORD, 1996; WHITFORD, 1996; ZIPKIN et al., 1956). De fato, o achado mais interessante para o perfil das concentrações de flúor no plasma ao longo dos dias foi a modulação a cada 48 horas, e não grandes alterações nos níveis de flúor do plasma com o passar dos dias, o que, na verdade, iria indiretamente de encontro ao trabalho de Largent (1952), ressaltando a necessidade de um intervalo de 5 anos após a redução da ingestão de flúor pelo dentífrico e pela dieta para que um estudo metabólico desta magnitude pudesse ser adequadamente conduzido, eliminando qualquer viés em seu delineamento.

No presente estudo, os voluntários realizaram suas refeições em horários padronizados. Contudo, nenhum cuidado foi tomado na padronização dos horários de lazer (ouvir música, ler, assistir televisão) e de dormir. Em experimentos cronobiológicos com humanos, tanto no laboratório como fora dele, a questão da sincronização é fundamental (BENEDITO-SILVA, 1999).

Outros osciladores externos sincronizadores dos ciclos endógenos (*zeitgeber* ou agentes arrastadores) e que deveriam ser considerados são os fatores sociais. Durante os 5 dias experimentais do presente estudo, os voluntários foram mantidos na mesma casa. Existem fortes evidências de que em várias espécies a interação social é capaz de arrastar os ritmos de atividade (REGAL; CONNOLLY, 1980).

Embora acreditássemos que o uso de um dispositivo de liberação lenta de flúor pudesse não apenas aumentar a fidelidade das análises para flúor, como também mascarar as pequenas variações que ocorrem normalmente nos níveis plasmáticos, devido aos padrões de exposição ao flúor ao longo do dia (WHITFORD, 1996), este procedimento foi desconsiderado para o delineamento do presente estudo, pois considerando-se os possíveis efeitos colaterais do flúor, não poderíamos mensurar as possíveis respostas individuais frente à uma constante ingestão de flúor. Embora mínimos, efeitos colaterais como diarreia, náusea, dores e câibras abdominais, dores nos pés e nos ligamentos, têm sido relatados durante terapia com liberação lenta de fluoreto de sódio (PAK et al., 1986). No mais, precisaríamos que os voluntários ficassem imobilizados durante os 5 dias experimentais. No estudo realizado por Whitford (1996), em cães, os animais foram constantemente infundidos com 0,9 mg F/Kg/dia. Este procedimento buscou elevar os níveis de flúor no plasma, aumentando a precisão das determinações analíticas. Muitas manipulações de rotina em animais de laboratório, como mudanças de gaiola, apresentação de novos estímulos para a atividade, manipulação dos animais (mesmo para a administração de drogas e placebos), têm efeitos importantes sobre o sistema circadiano de mamíferos (MROSOVSKY et al., 1989 apud MARQUES; MENNA-BARRETO, 1999; MROSOVSKY; SALMON, 1990).

Para o tempo que faz, embora a temperatura ambiente também possa ser um oscilador externo sincronizador dos ciclos endógenos, para homeotermos, a temperatura

ambiente é, em geral, um agente arrastador fraco (ASCHOFF; TOKURA, 1986; FRANCIS; COLEMAN, 1988; SULZMAN; FULLER; MOORE-EDE, 1977).

No presente estudo, as amostras de sangue foram coletadas a cada 3 horas, das 8 às 20 horas. Se a frequência da amostragem fosse aumentada, talvez uma característica pulsátil também pudesse ser identificada. Quanto à taxa de amostragem, ela deve ser no mínimo, de acordo com o teorema da amostragem (BENEDITO-SILVA, 1993), duas vezes maior que a frequência do ritmo estudado, que no caso do circadiano corresponde a duas medidas a cada 24 horas (Benedito-Silva, 1999). Em geral, quando se sabe pouco sobre a forma de onda de uma variável, deve-se medir pelo menos 6 pontos por ciclo (Minors; Waterhouse, 1989).

Embora a concepção de uma regulação homeostática para os níveis de flúor no plasma seja inconsistente (CARDOSO; WHITFORD; BUZALAF, 2004; COWELL; TAYLOR, 1981; EKSTRAND, 1978; EKSTRAND et al., 1977; GUY; TAVES, 1973) se o conceito de homeostasia fosse revisado, especialmente em sua especificação temporal, a sutileza encontrada para as variações dos níveis de flúor no plasma ao longo do dia poderia sugerir tal regulação (Tabelas 2 e 3). A homeostasia descreve a tendência dos mecanismos fisiológicos em atingir um estado estável de seu meio interno (CANNON, 1929), onde a dimensão temporal dos fenômenos biológicos está ausente (HALBERG, 1967). Contudo, a homeostasia não implica algo fixo e imóvel, mas sim, uma condição que poderia variar, mas ainda assim relativamente constante (HALBERG, 1967; MOORE-EDE, 1986). De qualquer modo, essa linha de pensamento falha por não fornecer informações sobre as bases dessas variações, apesar de permitir sua existência dentro de limites de variações homeostáticas (ROTENBERG; MARQUES; MENNA BARETO, 1999).

Para o presente estudo, os níveis de flúor no plasma (Tabelas 2 e 3) são semelhantes ou maiores aos encontrados por Cardoso; Whitford; Buzalaf (2003, 2004) para indivíduos

expostos a diferentes níveis de ingestão de flúor através da água de beber e do uso de dentifrício fluoretado. Estes dados sugerem que quando a ingestão de flúor é reduzida por um período, o flúor liberado pelo osso previne a queda das concentrações de flúor no plasma (COSTEAS; WOODWARD; EKSTRAND, 1996; ERICSSON; HELLSTROM; HOFVANDER, 1972; HALL et al., 1977; LAUGHLIN, 1971; LIKINS; McCLURE; STEERE, 1956; NEUMAN; NEUMAN, 1958 apud WHITFORD, 1996; WHITFORD, 1996; ZIPKIN et al., 1956). No entanto, se a concepção homeostática fosse aceita, poderíamos descrever o envolvimento dos dois tipos de homeostasia propostos por Moore-Ede (1986), a “reativa”, onde os mecanismos homeostáticos se iniciam a partir de perturbações no sistema, e a “preditiva”, a qual corresponderia ao conjunto de respostas corretivas iniciadas como antecipação a alterações rítmicas previsíveis e repetitivas (ROTENBERG; MARQUES; MENNA BARETO, 1999).

Embora não exista um padrão tão significativo a ponto de elucidarmos um mecanismo de regulação, pois alguns valores são positivos e outros negativos, a análise dos resultados médios obtidos para todos os voluntários em relação aos diferentes parâmetros avaliados (Figuras 11, 15, 19, 23, 27 e 31; Tabelas 5 e 6) nos permite sugerir que as variações nas concentrações de flúor no plasma ao longo do dia são controladas positiva e simultaneamente pelos sistemas fisiológicos ósseo e renal. O envolvimento simultâneo de mais de um sistema na regulação dos níveis de flúor seria comprovado pelo fato de que todas as correlações encontradas entre os parâmetros avaliados, sejam elas positivas ou negativas, foram fracas, mas estatisticamente significantes.

A correlação positiva entre a concentração de flúor no plasma e a concentração de PTH no sangue era esperada (Figuras 11 e 15; Tabela 5), e confirma os dados publicados por Waterhouse; Taves; Munzer (1980). A correlação negativa encontrada entre os níveis séricos de PTH e plasmáticos de Ca^{2+} pode oferecer suporte adicional a este achado (Tabela 5).

Pequenos aumentos na concentração de Ca^{2+} no plasma têm sido mostrados mesmo durante a primeira hora seguinte à administração de PTH em humanos. Como a maior parte do Ca^{2+} provém do osso, e quase todo o flúor armazenado no organismo também está associado ao tecido ósseo, seria esperado que a concentração de flúor no plasma mudasse no mesmo sentido (PERAULT-STAUD; STAUD; MILHAUD, 1974; TALMADGE; ROYCROFT; MILHAUD, 1975; WHITFORD, 1996).

A tendência positiva da correlação entre a concentração de flúor no plasma e a excreção urinária de flúor também foi exatamente como esperado (Figuras 11 e 27; Tabela 5 e 6). Isto é devido ao fato de o flúor da urina vir do plasma (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Então, se certas variáveis como a taxa de filtração glomerular (EKSTRAND, 1996; SCHIFFEL; BINSWANGER, 1980; WATERHOUSE; TAVES; MUNZER, 1980), o pH urinário (EKSTRAND et al., 1980; EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO, 1982; WHITFORD, 1990) e a taxa de fluxo urinário (JÄRNBERG; EKSTRAND; EHRNEBO, 1983) estão relativamente constantes em um indivíduo durante o experimento, qualquer aumento (ou redução) na concentração de flúor no plasma seria acompanhada por um aumento (ou redução) na excreção de flúor. Isto explica porque o “clearance” do flúor não é afetado por mudanças na concentração de flúor do plasma (WHITFORD, 1996).

Em adição, a correlação positiva entre a concentração de PTH no soro e a excreção urinária de flúor (Figuras 15 e 27; Tabela 5) poderia ser explicada pela associação dos dois mecanismos acima descritos. Assim, o PTH, por seu papel em estimular a reabsorção óssea para restabelecer os níveis séricos de Ca^{2+} , aumentaria conseqüentemente (indiretamente) a concentração de flúor no plasma, que, por sua vez, levaria a um aumento na excreção urinária de flúor.

Embora os níveis de flúor e de PTH não tenham sido implicados na determinação da concentração sérica de calcitonina, é provável que a calcitonina também possa contribuir, de alguma maneira, para a regulação do ritmo do flúor no plasma. Neste experimento, as análises para calcitonina foram solicitadas. Contudo, negligenciamos ao não confirmar se a análise por imunorradiometria poderia nos fornecer resultados com um mínimo de 3 casas decimais após a vírgula. Para nossa surpresa, os resultados não foram liberados com casas decimais devido à sensibilidade analítica ser de 1 pg/mL e por os responsáveis pela análise não terem conhecimento das características deste experimento e de que as análises eram de voluntários normais, considerando esse fracionamento clinicamente não significativo (Tabela 7). Para estudos complementares, uma possibilidade seria tentar realizar as análises para calcitonina por outra metodologia, como quimioluminescência, e verificar os valores.

A correlação positiva entre a excreção urinária de flúor e a taxa do fluxo urinário (Figuras 27 e 31; Tabela 5) é consistente com os achados de outros investigadores (Baez; Baez; Marthaler, 2000; Ekstrand et al., 1994; Schiffli et al., 1981). Entretanto, a existência de uma ligação causal entre estas duas variáveis é improvável. Ao invés disso, é sugestivo que quando a taxa do fluxo urinário aumenta, ela dilui a concentração dos íons hidrogênio, levando a um aumento do pH no fluido tubular. Isto reduziria a concentração de HF, e, conseqüentemente, a reabsorção de flúor pelos túbulos renais (Whitford, 1990).

A falta de uma correlação entre a concentração de flúor no plasma e as concentrações plasmáticas de Ca^{2+} e fósforo não foram surpreendentes (Figuras 11, 19 e 23; Tabela 5). Isto é pelo menos parcialmente devido ao fato de o Ca^{2+} e o fósforo serem regulados homeostaticamente, enquanto o flúor, ao que parece, não. Talvez, se um estudo com um número maior de voluntários fosse realizado, uma correlação positiva pudesse ser encontrada. O sentido oposto entre o perfil das variações plasmáticas do fósforo e do flúor é

consistente ao observado por Perault-Staub; Staub; Milhaud (1974) e Talmadge; Roycroft; Milhaud (1975), em ratos, e por Whitford (1996), em cães. Contudo, o perfil das variações plasmáticas do Ca^{2+} e o perfil das variações plasmáticas de flúor sofreram alterações na mesma direção e ao mesmo tempo. Como descrito previamente, isto era o esperado, uma vez que quase todo o flúor retido no nosso organismo está basicamente associada ao esqueleto (WHITFORD, 1996), e a maior parte do Ca^{2+} também provém do esqueleto. No entanto, esta coincidência torna-se difícil de se explicar apenas pela influência dos hormônios que agem no osso. Sendo as variações destes íons parcialmente atribuídas ao balanço entre a aposição e a reabsorção óssea (PERAULT-STAU; STAUB; MILHAUD, 1974; TALMADGE; ROYCROFT; MILHAUD, 1975; WHITFORD, 1996), como os níveis de flúor poderiam sofrer algum aumento nos momentos em que os níveis de Ca^{2+} no plasma estivessem normais, inibindo a secreção de PTH?

Ainda para o Ca^{2+} , um achado interessante foi que assim como para o flúor, os níveis de Ca^{2+} no plasma foram maiores no primeiro dia em relação aos demais, apresentam uma discreta queda ao longo dos dias, e também tendem a variar a cada 48 horas (Figuras 17 e 18). O mesmo perfil para as concentrações de Ca^{2+} no plasma foi encontrado para o primeiro, o segundo e o quinto dia (Figura 17).

Para o PTH, também encontramos o mesmo perfil para o primeiro, o segundo e o quinto dia (Figura 13), sendo ele semelhante ao perfil da média para os cinco dias experimentais (Figura 15), com um pico às 14 horas. Apesar do perfil diferente para os outros dias, poucas variações são observadas para as concentrações de PTH no soro. Quando analisamos a média do segundo ao quinto dia, uma homeostasia para os níveis de PTH é sugerida (Figura 14). Isto é devido ao perfil do terceiro dia (Figura 13).

Assim como no estudo de Whitford (1996), um achado intrigante foi a queda gradativa nos níveis de flúor no plasma mesmo após a alimentação entre o primeiro e o terceiro dia, bem como para a média dos cinco dias (Figuras 9, 11 e 12 A; Tabela 2 e 3). Uma possível explicação seria que durante e após algum tempo após a alimentação, uma considerável porção do fluido extracelular entra no trato gastrointestinal. É provável que este fluido carregue o flúor, bem como outros íons, para o trato gastrointestinal. Devido às altas concentrações de Ca^{2+} não absorvido no quimo, é possível que parte, ou talvez muito, do flúor, seja “capturado” no trato gastrointestinal, devido à formação de sais de fluoreto de cálcio (WHITFORD, 1994b).

Uma outra explicação para a queda da concentração de flúor no plasma após a alimentação seria que a partir de uma dose limite, a ingestão de flúor pudesse sincronizar e otimizar os processos celulares e fisiológicos responsáveis por sua eliminação do plasma, prevenindo mudanças periódicas no meio ambiente. Murphy e Coll (1992), Utegalieva; Ivashchenko; Esyrev (1990), observaram que a atividade da Ca-ATPase do retículo sarcoplasmático é inibida por flúor, sugerindo que o mesmo interage com o sítio de ligação ao ATP na ATPase, formando um complexo Ca-ATPase-F inativo. Em adição, danos oxidativos induzidos pelo flúor têm sido descritos em uma variedade de órgãos de ratos, como pulmão (AYDIN et al., 2003), fígado (ZHANG et al., 1987; WANG et al., 2000), hipocampo (BHATNAGAR et al., 2002), rim (GUAN et al., 2000), sendo observadas redução das atividades da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), bem como redução de ubiquinona. Possíveis efeitos do flúor na indução de apoptose em células HL-60 também foram descritos (Anuradha et al., 2001). Em adição, é conhecido o papel do flúor na alteração da atividade de diversas enzimas (BAYKOV; ALEXANDROV; SMIRNOVA, 1992; EASTOE; FEJERSKOV, 1985 apud AOBA; FEJERSKOV, 2002; THIBODEAU;

BOWEN; MARQUIS, 1985; WHITFORD 1996, 1997). Desta forma, um aumento da ingestão de flúor, sinalizando uma possível interferência na manutenção dos processos biológicos, exigiria um certo grau de integração entre diferentes setores do organismo de modo a ajustar a concentração de flúor ao longo do tempo, refletindo na eliminação mais rápida do flúor ingerido do organismo. Para Anokhin, um significado biológico dos ritmos tornados endógenos seria permitir aos organismos se anteciparem a alterações ambientais decisivas para a sobrevivência e cuja regularidade daria sentido às antecipações, tornando-se útil poder se antecipar a uma mudança ambiental que ocorreria inevitavelmente, marcando internamente esse tempo, porque assim não só esse organismo estaria melhor preparado para enfrentar a mudança do ambiente como eventualmente poderia prescindir de sinais externos para iniciar o processo e ajuste interno às condições que mudariam em seguida (MENDES, 1999; MENNA BARRETO, 1999).

De um modo geral, pode-se dizer que os ciclos de alimentação têm alguma influência sobre o oscilador circadiano. Sua ação assemelha-se àquela de um arrastador fraco, proporcionando apenas uma coordenação relativa (ASCHOFF, von GOETZ, 1986; BOULOS et al., 1980; MISTLEBERGER, 1994).

Também parece provável que o ritmo biológico do flúor no plasma possa estar acoplado a oscilações de fatores ambientais.

Os ciclos de claro e escuro parecem influenciar os níveis de flúor no plasma. Como podemos observar nas Figuras 15 e 16, a secreção de PTH aumenta durante a noite, período onde a reabsorção óssea é particularmente ativa (KURBEL et al., 2003). Isoladamente, isto levaria a um aumento dos níveis de flúor no plasma durante o escuro. Contudo, no período de escuro, os níveis de melatonina também estarão aumentados (KURBEL et al., 2003). O

pico de secreção da melatonina acontece entre 2 e 6 horas da manhã (ARENDT, 1988). O indício de que a melatonina possa ter um papel importante na promoção do crescimento dos ossos (ROTH et al., 1999) nos sugere que apesar da maior secreção de PTH, os níveis plasmáticos de flúor não estariam aumentados durante o escuro, uma vez que o flúor liberado pela reabsorção óssea estaria sendo simultaneamente mobilizado para a formação do osso *de novo*. Isto não apenas justificaria o sentido oposto dos ritmos do flúor e da melatonina, como também poderia explicar o fato de o pulso noturno do PTH independender da concentração plasmática de Ca^{2+} (CHAPOTOT et al., 1996). Esta regulação simultânea também explicaria o aumento dos níveis de flúor no plasma logo pela manhã, período no qual a secreção de melatonina estaria diminuindo (KURBEL et al., 2003).

Quando pensamos na alta altitude como um possível fator que modifica o metabolismo do flúor (WHITFORD, 1996), esta possível regulação do ritmo do flúor pela melatonina, ou simplesmente, pelos ciclos de claro e escuro, poderia fazer algum sentido, uma vez que as regiões de alta altitude parecem ser expostas a uma maior intensidade de luz, o que poderia levar a níveis de flúor no plasma maiores. No entanto, estudos adicionais, conduzidos por períodos de 24 horas, poderiam contribuir para a elucidação destas suposições. Vários relatos na literatura descrevem que a severidade da fluorose dentária aumenta significativamente com o aumento na altitude, tanto em áreas com baixa quanto com concentração de flúor mais alta, sugerindo que certas alterações fisiológicas devem ocorrer em humanos que residem em altas altitudes, exacerbando os efeitos do flúor nos tecidos mineralizados (MANJI; BAELUM; FEJERSKOV, 1986; RWENYONYI et al., 1999; YODER, 1998). Os distúrbios no esmalte observados podem ser devidos à hipóxia da alta altitude por si ou a um ou mais de seus múltiplos efeitos fisiológicos, que incluem crescimento e desenvolvimento alterados,

status ácido-básico, balanço hormonal, hematócrito, hemodinâmica e funções renal e cardiovascular (WHITFORD, 1996).

Uma vez que os resultados analíticos dos estudos realizados suportam a concepção de que os níveis de flúor no esmalte em desenvolvimento estão diretamente relacionados aos níveis de flúor no plasma (AOBA; MORENO, 1987; BAWDEN; CRENSHANW, 1984; BAWDEN; DEATON; CRENSHANW, 1982, 1987; SPEIRS, 1986), poderíamos extrapolar estas especulações dos ciclos de claro e escuro e sugerir que o período de claro seria o de maior susceptibilidade ao desenvolvimento da fluorose dentária. A ultraestrutura e funções das células epiteliais ameloblásticas parecem ser afetadas pela administração de altas concentrações de flúor, como em níveis milimolares, mas não é conclusivo como baixos níveis de flúor, semelhantes aos níveis fisiológicos de flúor encontrados no soro humano, realmente causam estes efeitos (AOBA; FEJERSKOV, 2002; SMITH, 1998). DenBesten; Gao; Li (2004), reportaram que células ameloblásticas expostas a concentrações de flúor maiores que 25 μM (aproximadamente 0,5 ppm) podem ter sua proliferação inibida, mas não sua diferenciação, sugerindo que os efeitos do flúor nos ameloblastos são limitados, embora possam ser um fator na formação da fluorose dentária em concentrações de flúor séricas relativamente altas.

Desta forma, se houvesse um padrão semelhante para as concentrações de flúor no plasma entre os adultos e as crianças, para que as crianças na faixa de risco para o desenvolvimento da fluorose não fossem excluídas dos efeitos terapêuticos do flúor na prevenção da cárie dentária enquanto minimizassem o risco de desenvolvimento da fluorose, uma sugestão seria se fazer o uso de produtos fluoretados apenas no período da noite, quando os níveis de flúor no plasma parecem estar menores. Um grande número de estudos já evidenciou que os componentes celulares responsáveis pela elaboração de enzimas envolvidas no metabolismo e na desintoxicação apresentam ritmicidade circadiana

(SMOLENSKY; REINBERG, 1990 apud MARQUES; MENNA-BARRETO, 1999). Em adição, uma periodicidade circadiana de permeabilidade foi também encontrada para as membranas nucleares (KITTLICK, 1970 apud MARQUES; MENNA-BARRETO, 1999).

Geralmente, pouca atenção é dada às variações interindividuais dos parâmetros ritmicos. Contudo, muitas vezes a variabilidade dificulta a generalização dos resultados. Como provavelmente há diferentes mecanismos regulando a ritmicidade dos níveis de flúor no plasma, abordagens individuais dos ritmos frente a um mesmo esquema temporal são importantes para classificá-los e encontrarmos as diretrizes básicas. O momento do estabelecimento da ritmicidade, da sincronização com os eventos ambientais, assim como o padrão do desenvolvimento subsequente, variam entre os indivíduos (ANDRADE; MENNA BARETO; LOUZADA, 1999).

Quando os diferentes parâmetros avaliados foram analisados individualmente para cada voluntário através de regressão linear múltipla, a existência de uma regulação dos níveis plasmáticos de flúor não ficou clara, exceto para V3, cujas variações nas concentrações de flúor no plasma se mostraram reguladas pelo sistema renal (Tabela 6). Portanto, parece haver uma grande variação individual na regulação do metabolismo do flúor (Figuras 12 de A a F, 16, 20, 24, 28 e 32; Tabela 6).

Apesar das diferenças intra e interindividuais, observamos que as concentrações de flúor no plasma realmente parecem apresentar uma ritmicidade biológica (Figura 12 A). Observamos também que este ritmo independe do sexo: V1-V2 e V3-V5, são do sexo masculino e feminino, respectivamente. Com exceção a V1, o perfil da curva dos níveis de flúor no plasma ao longo do dia é bastante semelhante. V1 apresentava obesidade leve-média. Suas amostras se apresentavam lipêmicas. Este dado, associado ao fato de os

voluntários comerem quantidades padrão de alimentos durante as refeições, pode, talvez, explicar a ausência de uma queda nas concentrações de flúor no plasma às 17 horas para V1. Uma pessoa submetida a uma dieta restrita passa a degradar suas reservas lipídicas para fornecer a energia necessária ao funcionamento do organismo (NELSON; COX, 2000a). Assim como a ingestão de uma dieta rica em gorduras pode aumentar a biodisponibilidade do flúor por aumentar sua permanência no trato gastrointestinal (BUTTNER; MUHLER, 1958; MILLER; PHILLIPS, 1955), o aumento dos níveis séricos de lipídios poderia, de alguma forma, retardar a queda dos níveis de flúor no plasma. O alto desvio padrão encontrado às 8 horas para V1 pode oferecer suporte adicional a esta especulação. A maior ingestão de flúor ocorreu no jantar (última refeição), que era realizado às 20:30 horas, e, durante o jejum noturno, uma maior quantidade de lipídios seria degradada.

A queda dos níveis de flúor no plasma às 8 horas para V4 poderia ser explicada pelas mesmas razões acima descritas. Além da maior ingestão de flúor no jantar, havia a questão da quantidade padronizada da dieta ingerida, que, na maioria das vezes, excedia o normalmente consumido por V4. Desta forma, a necessidade em degradar lipídios daria lugar à sua síntese (NELSON; COX, 2000b). Com menor quantidade de gordura “livre” circulante, menores seriam os níveis de flúor no plasma, e maior sua excreção pela urina, como podemos ver pela análise das Figuras 12 A e 28.

Para V2 (Figura 12 A; Tabela 3), seus níveis de flúor se apresentaram mais elevados em todos os momentos. É possível que haja a influência da etnia e do genótipo nos diferentes padrões de concentrações plasmáticas de flúor que descrevem um ritmo biológico para o flúor. Isto poderia ajudar a explicar a diferente susceptibilidade individual à fluorose dentária, que tem sido sugerida para humanos e comprovada para camundongos (Everett et al., 2002). Assim, indivíduos com ritmos caracterizados por maiores concentrações de flúor

poderiam ser mais resistentes ao desenvolvimento da fluorose dentária ou ainda mais susceptíveis à patologia. Variações no desenvolvimento e na severidade da fluorose dentária em diferentes linhagens de camundongos, onde a idade, o gênero, a alimentação, o alojamento e a exposição ao flúor são rigorosamente controlados, suportam a influência do código genético na resistência/susceptibilidade à fluorose dentária (EVERETT et al., 2002).

Por outro lado, os maiores níveis plasmáticos de flúor para o V2 podem refletir sua ingestão prévia de flúor, principalmente através do dentifrício fluoretado. Como a superfície óssea apresenta um “pool” de flúor passível de troca, e os voluntários sofreram mudanças consideráveis na exposição diária ao flúor, não apenas pelo uso de dentifrício não fluoretado por um mês antes do estudo, mas também pela ingestão de uma dieta com baixo teor de flúor durante o experimento, esta reserva de flúor no osso pode ter sido mobilizada, prevenindo a queda dos níveis de flúor no plasma do voluntário (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1990, 1996). Uma outra explicação seria a heterogeneidade entre os voluntários quanto ao hematócrito. Este voluntário é do sexo masculino, e a presença de um hematócrito maior poderia influenciar a concentração de flúor no plasma, uma vez que ela é aproximadamente o dobro daquela das células (WHITFORD, 1996).

Apesar das diferenças intra e interindividuais, observamos que as concentrações de PTH no soro também parecem apresentar uma ritmicidade biológica (Figura 15). Observamos que este ritmo também independe do sexo. Com exceção de V3 e V5, o perfil da curva dos níveis de PTH no soro ao longo do dia é bastante semelhante. Acreditamos que estas diferenças possam estar relacionadas ao estresse. V3 e V5 estavam mais envolvidas com projetos profissionais que os demais voluntários. Além disso, como o horário de dormir não foi controlado, geralmente dormiam mais tarde que os demais, entre 00:00 e 01:00 hora. É possível que a maior exposição à luz artificial tenha atuado como um arrastador dos níveis

séricos de PTH, e, talvez, da melatonina (dados não alisados), modulando estas diferenças no perfil ao longo do dia. O estresse aumenta a secreção da melatonina (GOLOMBEK; CARDINALI; AGUILAR-ROBLERO, 1999). A luz artificial de uma intensidade aproximada de 2500 lux, semelhante àquela do meio dia em um dia de verão, anula o pico noturno da melatonina numa exposição de 10 a 20 minutos, retornando a melatonina a seu valor em 40 minutos de escuro. A mesma intensidade de luz aplicada durante a manhã adianta o pico secretório e à tarde, nas últimas horas de claro, atrasa; luz fluorescente com intensidade de cerca de 200 a 400 lux, não suprime a secreção do hormônio (GOLOMBEK; CARDINALI; AGUILAR-ROBLERO, 1999).

Para as concentrações de Ca^{2+} no plasma, os dados sugerem haver uma dependência do perfil ao longo do dia relacionada ao sexo (Figura 20). Para V3-V5, observamos que os níveis de Ca^{2+} e de flúor no plasma apresentam o mesmo padrão de variação, ou seja, mudam na mesma direção. Para V1-V2, esta relação não se mantém, embora sejam semelhantes entre si. Já para os níveis de fósforo no plasma, nenhuma relação ligada ao sexo parece existir (Figura 24). Os níveis de fósforo e de flúor no plasma realmente tendem a apresentar sentidos opostos.

Perfis semelhantes entre a excreção urinária de flúor e o fluxo urinário ao longo do dia são observados para todos os voluntários (Figuras 28 e 32).

Todos estes dados em conjunto nos permitem sugerir que a ritmicidade do flúor em humanos é regulada pelo relógio biológico. Dessa forma, os ritmos biológicos refletem a contribuição, em maior ou menor grau, de componentes endógenos e de seus mascaradores (MINORS; WATERHOUSE, 1987 apud MARQUES; MENNA-BARRETO, 1999).

Já para as implicações biológicas desta ritmicidade, pouco no momento se poderia afirmar. A compreensão dos aspectos metabólicos e toxicológicos do flúor pode oferecer

perspectivas na Saúde Pública, já que fundamentalmente levaria aos dados necessários para o desenvolvimento e aplicação de medidas eficientes e de custo-benefício que poderiam maximizar os benefícios do flúor na prevenção e redução da cárie dentária. Apesar do declínio da incidência de cárie dentária nas populações infantis nos últimos anos, deve-se considerar que a cárie dentária ainda é uma causa predominante da perda de dentes na população mundial (FEJERSKOV; BAEUM, 1998). Ao mesmo tempo, o conhecimento destes mecanismos para o flúor é também importante para a minimização dos riscos para o desenvolvimento da fluorose dentária. Outra possibilidade seria racionalizar o uso do flúor no tratamento da osteoporose. Desta maneira, cada vez mais, os conhecimentos dos aspectos bioquímicos e fisiológicos do flúor permitiriam avaliar com precisão as possibilidades de algumas de suas aplicações já em curso em diversas áreas da Saúde.

Quando analisamos as variações das concentrações de flúor no plasma estabelecidas durante o pico e o declínio do ritmo por si (Tabela 3 e 4), torna-se difícil imaginar uma possível colaboração dos resultados deste estudo para o tratamento da osteoporose, uma vez que os níveis ótimos de flúor no plasma durante o tratamento devem ser de 5 a 10 μM (HASLING et al., 1987; TAVES, 1970). No entanto, quando comparamos as diferenças nos níveis de flúor no plasma diante do uso de um mecanismo de liberação (infusão) lenta de flúor, alguma contribuição pode ser dada à área. Para os cães infundidos diariamente com 0,9 mg F/Kg de peso, os níveis de flúor para o pico e a depressão encontrados para o 1º. e o 2º. experimentos foram, respectivamente de 17,1 e 14,6, e de 10,3 e 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (WHITFORD, 1996). Desta forma, um ajuste entre a dose de tratamento e o horário de ingestão, ou ainda o desenvolvimento de medicamentos “temporizados”, poderia promover níveis ótimos de flúor no plasma constantes durante todo o dia.

Como efeitos colaterais, ainda que mínimos, como diarreia, náusea, dores e câibras abdominais, dores nos pés e nos ligamentos, têm sido relatados durante terapia com liberação lenta de fluoreto de sódio (PAK et al., 1986), a cronoterapia poderia não apenas otimizar os efeitos benéficos da administração do flúor, como também controlar seus efeitos indesejáveis, utilizando como referência os ritmos biológicos. Tratamentos individualizados poderiam utilizar protocolos cronoterapêuticos e tentar ajustar a dosagem do flúor aos ritmos biológicos dos indivíduos. Este tipo de tratamento teria como finalidade reduzir a toxicidade do flúor, administrando-o durante os períodos de maior tolerância dos indivíduos.

Em adição, informações detalhadas concernentes à variabilidade dos ritmos endógenos diários das concentrações de flúor e seus fatores determinantes são importantes para todos os estudos que direcionam suas conclusões baseadas nestas concentrações. Desta maneira, sabendo-se quais os horários de maior e menor concentração de flúor no plasma, os experimentos deveriam padronizar os horários de coleta de plasma, para que os resultados obtidos em diferentes estudos possam ser comparados.

Finalmente, ressaltamos que apesar das diferenças intra e interindividuais, este trabalho mostrou pela primeira vez uma ritmicidade para as concentrações de flúor no plasma em humanos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

1. Apesar das diferenças intra e interindividuais, parece haver um ritmo biológico para as concentrações de flúor no plasma em humanos.
2. Este ritmo parece ser simultaneamente regulado pelos sistemas ósseo e renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDRADE, M.; MENNA BARETO, L.; LOUZADA, F. Ontogênese da ritmicidade biológica. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo. 1999, p. 183-202.

ANGMAR-MANSSON, B.; WHITFORD, G. M. Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. *J dent Res*, v. 69, p. 706-713, 1990. Special Issue.

ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2001.

AOBA T, FEJERSKOV O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 13, n. 2, p. 155-170, 2002.

AOBA, T.; MORENO, E. C. The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis: chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. *Calcif Tissue Int*, v. 41 2. p. 86-94, 1987.

ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res*, p. 601-605, 1990. Spec 69 /Discussion, p. 634-636, 1990/

ARENDT, J. Melatonin. *Clin Endocrin*, v. 29, p. 205-229, 1988.

ASCHOFF, J.; TOKURA, H. Circadian activity rhythms in squirrel monkeys: entrainment by temperature. *J Biol Rhythms*, v. 1, p. 91-100, 1986.

* Citação baseada na Norma Brasileira de Referência (NBR) 6023 de setembro de 2003.

ASCHOFF, J.; VON GOETZ, C. Effects of feeding cycles on circadian rhythms in squirrel monkeys. *J Biol Rhythms*, v. 1, p. 267-276, 1986.

AYDIN, G. et al. Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations. *J Appl Toxicol*, v. 23, n. 6, p. 437-446, 2003.

BAEZ, R. J.; BAEZ, M. X.; MARTHALER, T. M. Urinary fluoride excretion by children 4-6 years old in a south Texas community. *Rev Panam Salud Publica*, v. 7, n. 4, p. 242-248, Apr. 2000.

BAWDEN, J. W.; CRESHAW, M. A. Effect of inhibition of the net calcium uptake on net uptake fluoride in developing rats molars. *J Dent Res*, v. 63, p. 642-645, 1984.

BAWDEN, J. W.; DEATON, T.G.; CRESHAW, M. A. Role of the enamel organ in limiting fluoride uptake during the maturation phase of enamel development. *J Dent Res*, v. 61, p. 506-509, 1982.

BAWDEN, J. W.; DEATON, T. G.; CRESHAW, M. A. Diffusion of fluoride through the rat enamel organ *in vitro*. *J Dent Res*, v. 66, p. 1360-1363, 1987.

BAYKOV, A. A.; ALEXANDROV, A. P.; SMIRNOVA, I. N. A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys*, v. 294, n. 1, p. 238-243, Apr. 1992.

BAYLINK, D. J. et al. Monofluorophosphate physiology: the effects of fluoride on bone. *Caries Res.*, v. 1, p. 56-76, 1983. 17 Suppl.

BENEDITO-SILVA, A. A. A modelagem dos ritmos biológicos. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo. 1999, p. 97-110.

BHATNAGAR, M. et al. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian J Exp Biol*, v. 40, n. 5, p. 546-554, 2002.

BIRDSON-WHITFORD, N. L.; DICKINSON, A.; WHITFORD, G. M. Effect of hematocrit on plasma fluoride concentrations. *J Dent Res*, v. 65, p. 184, 1986. Spec issue. /Abstract/

BOULOS, Z.; ROSENWASSER, A.; TERMAN, M. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res*, v. 1, p. 39-65, 1980.

BRAMBILLA, E. Fluoride – Is it capable of fighting old and new dental diseases? *Caries Res*, v. 35, p. 6-9, 2001. Supplement 1.

BRIANCON, D.; MEUNIER, P. J. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. *Orthop Clin North Am*, v. 12, n. 3, p. 629-648, 1981.

BUCHER, J. R. et al. Results and conclusions of the National Toxicology Program's rodent carcinogenicity studies with sodium fluoride. *Int J Cancer*, v. 48, n. 5, p. 733-737. Jul. 1991.

BUTTNER, W.; MUHLER, J. C. The retention of fluoride by the skeleton, liver, heart and kidney as a function of dietary fat intake in the rat. *J Nutr*, v. 65, n. 2, p. 259-266, Jun. 1958.

BUZALAF, M. A. R. Fatores de risco para fluorose dentária e biomarcadores de exposição ao flúor. 2002. 84 f. Tese de Livre Docência. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

CANNON, W. B. Organization for physiological homeostases. *Physiol Rev*, v. 9, p. 399-431, 1929.

CARDOSO, V. E. S.; WHITFORD, G. M.; BUZALAF, M. A. R. Relação entre a concentração de flúor na água de beber e no plasma humano. In: Reunião da Sociedade Brasileira de

Pesquisa Odontológica, 20., 2003, Águas de Lindóia. **Proceedings**. São Paulo. Braz Oral Res, 2003. v.17, p.18-18.

CARDOSO, V. E. S.; WHITFORD, G. M.; BUZALAF, M. A. R. Interactive effects of fluoride intake on plasma fluoride concentrations. In: International Association for Dental Research, 82., 2004, Honolulu. **Proceedings**. J. dent Res, 2004, v. 83.

CARLSON, C. H.; ARMSTRONG, W. D.; SINGER, L. Distribution, migration and binding of whole blood fluoride evaluated with radiofluoride. *Am J Physiol*, v. 199, p. 187-189, Jul. 1960.

CAVERZASIO, J.; PALMER, G.; BONJOUR, J. P. Fluoride: mode of action. *Bone*, v. 22, n. 6, p. 585-589, Jun. 1998.

CDC. Recommendation for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2001; p. 50.

CHAPOTOT, F. et al. Relationships between intact parathyroid hormone 24-hour profiles, sleep-wake cycle, and sleep electroencephalographic activity in man. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 81, n. 10, p. 3759-3765, Oct. 1996.

CHARLES, P.; MOSEKILDE, L.; JENSEN, F. T. The effects of sodium fluoride, calcium phosphate, and vitamin D2 for one to two years on calcium and phosphorus metabolism in postmenopausal women with spinal crush fracture osteoporosis. *Bone*, v. 6, n. 4, p. 201-206, 1985.

CHEN, P. S. J. R.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chem*, v. 28, p. 1756-1758, 1956.

COSTEAS, A.; WOODWARD, H. Q.; LAUGHLIN, J. S. Comparative Kinetics of calcium and fluoride in rabbit bone. *Radiat Res*, v. 46, p. 317-333, 1971.

CORREIA SAMPAIO, F. et al. Dental fluorosis and nutritional status of 6- to 11-year-old children living in rural areas of Paraiba, Brazil. *Caries Res*, v. 33, n. 1, p. 66-73, 1999.

COWELL, D. C.; TAYLOR, W. H. Ionic fluoride: a study of its physiologic variation in man. *Ann. Clin. Biochem*, v. 18, p. 76-83, 1981.

CRANDALL, C. Combination treatment of osteoporosis: a clinical review. *J Womens Health Gend Based Med*, v. 11, n. 3, p. 211-224, Apr 2002.

CREMER, H. D.; BUTTNER, W. Absorption of fluorides. *Monogr Ser World Health Organ*, v. 59, p. 75-91, 1970.

CUTRESS, T. W.; SUCKLING, G. W. Differential diagnosis of dental fluorosis. *J Dent Res*, p. 714-20, 1990. Spec No 69 /Discussion 721/

DEAN, H. T. Classification of mottled enamel diagnosis. *J Am Dent Assoc*, v. 21, p. 1421-1426, 1934.

DEAN, H. T. The investigations of physiological effects by the epidemiological method. In: MOULTON, F.R. ed. Fluoride and dental health. Washington, DC, 1942; 23-31.

DEAN, H. T.; ELVOVO, E. Studies on the minimal threshold of the dental signs of chronic endemic fluorosis (mottled enamel). *Pub Health Rep*, v. 50, p. 1719-1729, 1935.

DeLUCIA, R. **Cronofarmacologia**. Disponível em:

<<http://www.crono.icb.usp.br/cronotxt.html>>. Acesso em 2 de agosto de 2004.

DENBESTEN, P. K.; GAO, C.; LI, W. Effect of micromolar levels of fluoride on ameloblasts in vitro. In: International Association for Dental Research, 82., 2004, Honolulu. **Proceedings**. J. dent Res, 2004, v. 83.

DeSANTIS, A.; BUCHMAN, A. Current and emerging therapies in osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother*, v. 3, n. 7, p. 835-843, Jul. 2002.

EASTOE, J. E.; FEJERSKOV, O. **Composition of mature enamel proteins from fluorosed teeth**. In: Proceedings, tooth enamel IV. 1984, Odawara, Japan. FEARNHEAD, R.W.; SUGA, S., editors. Amsterdam: Elsevier, p. 326-330 apud AOBA, T; FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 155-170, 2002.

EKSTRAND, J. Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. *Caries Res*, v. 12, p. 123-127, 1978.

EKSTRAND, J. Fluoride metabolism. In: **Fluoride in dentistry**. Denmark, 1996, p. 55-68.

EKSTRAND, J. et al. Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 12, p. 311-317, 1977.

EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M. Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 16, n. 3, p. 211-215, Sep. 1979.

EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M.; BORÉUS, L. O. Fluoride bioavailability after intravenous and oral administration: importance of renal clearance and urinary flow. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23:329-337.

EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics during acid-base changes in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, v. 18, p. 189-194, 1980.

EKSTRAND, J.; ERICSSON, Y.; ROSELL, S. Absence of protein-bound fluoride from human and blood plasma. *Arch Oral Biol*, v. 22, n. 4, p. 229-232, 1977.

EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics in infancy. *Pediatr Res*, v. 35, n. 2, p. 157-163, Feb. 1994.

EKSTRAND, J. et al. Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults. *Caries Res*, v. 15, n. 3, p. 213-220, 1981.

EKSTRAND, J.; SPAK, C. J.; EHRNEBO, M. Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. *Acta Pharmacol Toxicol*, v. 50, p. 321-325, 1982.

EKSTRAND, J.; SPAK, C. J.; VOGEL, G. Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. *J Dent Res*, v. 69, p. 550-555, 1990. Spec Iss.

EKSTRAND, J.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism: a longitudinal study in growing dogs. *J dent Res*, v. 63, p. 206, 1984. Spec Iss. /Abstract 324/

EMMERICH, A.; FREIRE, A. S. **Flúor e Saúde Coletiva**. 1^a. ed. Vitória: EDUFES. 2003. p. 185.

ERICSSON, Y. Cariostatic mechanisms of fluorides: clinical observations. *Caries Res*, v. 11, p. 2-41, 1977. Supplement 1.

ERICSSON, Y.; HELLSTRM, I.; HOFVANDER, Y. Pilot studies on the fluoride metabolism in infants on different feedings. *Acta paediat scand*, v. 61, p. 459-464, 1972.

ERIKSEN, E. F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Effect of sodium fluoride, calcium, phosphate, and vitamin D2 on trabecular bone balance and remodeling in osteoporotics. *Bone*, v. 6, n. 5, p. 381-389, 1985.

EVERETT, E. T. et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res*, v. 81, n. 11, p. 794-798, Nov. 2002.

FARLEY, J. R.; WERGEDAL, J. E.; BAYLINK, D. J. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone forming cells. *Science*, v. 227, p. 330-332, 1983.

FARLEY, J. R. et al. Fluoride therapy for osteoporosis: characterization of the skeletal response by serial measurements of serum alkaline phosphatase activity. *Metabolism*, v. 36, n. 3, p. 211-218, 1987.

FEATHERSTONE, J. D. B. et al. Dependence of *in vitro* demineralization and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J. dent. Res*, v. 69, p. 620-625, 1990.

FEATHERSTONE, J. D. B. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. Community. *Dent. oral Epidem*, v. 27, p. 31-40, 1999.

FEJERSKOV, O.; BAEUM, V. Changes in prevalence and incidence of the major oral diseases. In: **Oral biology at the turn of the century**: Truth, misconcepts and challenges. 1998. p. 1-9.

FEJERSKOV, O.; JOHNSON, N. W.; SILVERSTONE, L. M. The ultrastructure of fluorosed human dental enamel. *Scand J Dent Res*, v. 82, n. 5, p. 357-372, 1974.

FEJERSKOV, O. et al. Dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res*, v. 8, n. 1, p. 15-31, 1994.

FEJERSKOV, O. et al. Histological features of fluorosed human dental enamel. *Caries Res*, v. 9, n. 3, p. 190-210, 1975.

FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A.; LARSEN, M. J. Clinical and structural features and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. *Scand J Dent Res*, v. 85, n. 7, p. 510-534, 1977.

FOMON, S. J.; EKSTRAND, J.; ZIEGLER, E. E. Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: trends in fluoride intake with special attention to infants. *J Publ Hlth Dent*, v. 60, n. 3, p. 131-139, 2000.

FRANCIS, A. J. P.; COLEMAN, G. J. The effect of ambient temperature cycles upon circadian running and drinking activity in male and female laboratory rats. *Physiol Behav*, v. 43, n. 4, p. 471-477, 1988.

GERSTER, J. C. et al. Bilateral fractures of femoral neck in patients with moderate renal failure receiving fluoride for spinal osteoporosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*, v. 10, p. 723-725, Sep. 1983.

GESEK, F. A.; FRIEDMAN, P. A. Calcitonin stimulates calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol*, v. 264, n. 4 Pt 2, p. 744-751. Apr. 1993.

GLASS, R.L. Introduction – the first international conference on the declining prevalence of dental caries. *J. dent. Res*, v. 61, p. 1304, 1982.

GLEMSER, O. Inorganic fluoride chemistry, 1900-1945. *J Fluoride Chem*, v. 33, p. 45-69, 1986.

GOLOMBEK, D.; CARDINALI, D.; AGUILAR-ROBLERO, R. Mecanismos de temporização em vertebrados. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo, 1999. p. 137-161.

GUAN, Z. Z. et al. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol*, v. 74, n. 10, p. 602-608, 2000.

GUHA-CHOWDHURY, N.; DRUMMOND, B.K.; SMILLIE, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years: a longitudinal study. *J. dent. Res.*, v. 75, n. 7, p. 1451-7, 1996.

GUTKNECHT, J.; WALTER, A. Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, v. 644, p. 153-156, 1981.

GUTTERIDGE, D. H. et al. A randomized trial of sodium fluoride (60 mg) +/- estrogen in postmenopausal osteoporotic vertebral fractures: increased vertebral fractures and peripheral bone loss with sodium fluoride; concurrent estrogen prevents peripheral loss, but not vertebral fractures. *Osteoporos Int*, v. 13, n. 2, p. 158-170, 2002.

GUY, W. S. **Inorganic and organic fluorine in human blood**. AAAS Selected Symo 11. Boulder, CO: Westview Press 1976, p. 125-147 apud FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B. A. **Fluoride in dentistry**. 2nd ed. Denmark. Munksgaard, 1996. 363 p.

GUY, W. S.; TAVES, D. R. Relation between F in drinking water and human plasma. In: International Association for Dental Research, 51., 1973. **Proceedings**. /Abstract n. 718/

HALBERG, F. **Claude Bernard, referring to an extreme variability of the internal milieu**. In: Claude Bernard and Experimental Medicine. Cambridge: Schenkman, 1967, p. 193-210 apud MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. 2^a ed. São Paulo: EDUSP. 1999, 321 p.

HALL, L. L. et al. Kinetic model of fluoride metabolism in the rabbit. *Environ Res*, v. 13, p. 285-302, 1977.

HAMILTON, I. R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J dent Res*, v. 69, p. 660-671, 1990. Special Issue.

HAMILTON, I. R.; BOWDEN, G. H. W. Fluoride effects on oral bacteria. In: **Fluoride in Dentistry**. Denmark, 1996, p. 230-251.

HANHIJÄRIVI, H. Comparison of free ionized fluoride concentrations in plasma and renal clearance in patients of artificially fluoridated and non-fluoridated drinking water areas. *Proc. Finn Dent Soc*, v. 70, p. 1-67, 1974.

HASLING, C. et al. Safety of osteoporosis treatment with sodium fluoride, calcium phosphate and vitamin D. *Miner Electrolyte Metab*, v. 13, n. 2, p. 96-103, 1987.

HODGE, H. C.; SMITH, F. A. **Biological properties of inorganic fluorides**. In: Simons, Fluoride chemistry. New York: Academic Press, 1965, p. 1-42 apud WHITFORD, G. M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2nd ed. Basel: Karger, 1996. 156 p.

HOFER, A. M.; BROWN, E. M. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, n. 7, p. 530-538, 2003.

HUNSTADBRATEN, K. Fluoride in caries prophylaxis at the turn of the century. *Bull Hist Dent*, v. 2, p. 117-120, 1982.

ISMAIL, A. I. Fluoride supplements: current effectiveness, side effects, and recommendations. *Comm Dent oral Epidemiol*, v. 22, p. 164-172, 1994.

JARNBERG, P. O.; EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M. Renal excretion of fluoride during water diuresis and induced urinary pH-changes in man. *Toxicol Lett*, v. 18, n. 1-2, p. 141-166, Aug. 1983.

JOHNSTON, D. W. Current status of professionally applied topical fluorides. *Community Dent oral Epidem*, v. 22, p. 159-163, 1994.

KAMINSKY, L. S. et al. Fluoride: benefits and risks of exposure. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 1, n. 4, p. 261-281, 1990.

KARGUL, B.; CAGLAR, E.; TANBOGA, I. History of water fluoridation. *J Clin Pediatr Dent*, v. 27, p. 213-217, 2003.

KASSEM, M.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E. F. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*, v. 8, n. 12, p. 1453-1458, Dec. 1993.

KASSEM, M.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E. F. Effects of fluoride on human bone cells in vitro: differences in responsiveness between stromal osteoblast precursors and mature osteoblasts. *Eur J Endocrinol*, v. 130, n. 4, p. 381-386, Apr. 1994.

KLEEREKOPER, M.; MENDLOVIC, D. B. Sodium fluoride therapy of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*, v. 14, n. 3, p. 312-323, 1993.

KITTLICK, P. D. **Untersuchungen über die tageszeitliche Änderung der membranpermeabilant von Ratten-Laberzellkernen.** Exp Pathol, v. 4, p. 143-154, 1970 apud MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e aplicações.** 2^a ed. São Paulo: EDUSP. 1999, 321 p.

KURBEL, S. et al. A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol. *Med Hypotheses*, v. 61, n.3, p. 346-350, Sep. 2003.

LAMB, W. J. et al. In situ remineralization of subsurface enamel lesion after the use of a fluoride chewing gum. *Caries Res*, v. 27, n. 2, p. 111-116, 1993.

LARGENT, E. J. Rates of elimination of fluoride stored in the tissues of man. *Arch Ind Hyg*, v. 6, p. 37-42, 1952.

LAU, K. H.; BAYLINK, D. J. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. *J Bone Miner Res*, v. 13, n. 11, p. 1660-1667, Nov. 1998.

LAWRENZ, M.; MITCHELL, H. H.; RUTH, W. A. Adaptation of the growing rat to the ingestion of a constant concentration of fluoride in the diet. *J Nutr*, v. 19, p. 531-546, 1940.

LENNON, M. A. A systematic review of public water fluoridation--a commentary. *Community Dent Health*, v. 17, n. 3, p. 130-133, Sep. 2000.

LEVY, S. M. et al. Patterns of fluoride intake from birth to 36 months. *J Public Health Dent*, v. 61, n. 2, p. 70-77, 2001.

LINKINS, R. C.; MCCLURE, F. J.; STEERE, A. C. Urinary excretion of fluoride following defluoridation o a water supply. *Public Health Rep*, v. 71, p. 217-220, 1956.

LOPES, J. R. Disponível em: <<http://www.crono.icb.usp.br>>. Acesso em 2 de agosto de 2004.

MANJI, F.; BAEUM, V.; FEJERSKOV, O. Fluoride, altitude and dental fluorosis. *Caries Res*, v. 20, p. 473-480, 1986.

MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. In: **Cronobiologia: Princípios e aplicações**. São Paulo. 1999, p. 45-84.

McCLURE, F. J. **Water fluoridation**. The search and the victory. Washington, DC: US Government Printing Office. 1970.

McDONAGH, M. S. et al. Systematic review of water fluoridation. *Brit Med J*, v. 7, n. 321, p. 855-859, Oct. 2000.

MELLO, L.; MORENO, C. **O horário de verão traz mudanças para o relógio biológico?** Disponível em: <<http://www.crono.icb.usp.br/horarioverao.html>>. Acesso em 2 de agosto de 2004.

MENDES, E. G. Apresentação: o tempo e a vida. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo. 1999, p. 9-16.

MENNA BARRETO, L. O tempo na biologia. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo, 1999. p. 17-21.

MENNA BARRETO, L. Uma introdução ao tema.

Disponível em: <http://www.crono.icb.usp.br/cap1_2.html>. Acesso em 2 de agosto de 2004.

MESSER, H. H.; OPHAUG, R. Effect of delayed gastric emptying on fluoride absorption in the rat. *Biol Trace Elem Res*, v. 31, n. 3, p. 305-315, Dec. 1991.

MESSER, H. H.; OPHAUG, R. H. Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. *J Dent Res*, v. 72, n. 3, p. 619-622, Mar. 1993.

MILAN, A. M.; WADDINGTON, R. J.; EMBERY, G. Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization. *Arch Oral Biol*, v. 46, n. 4, p. 343-351, Apr. 2001.

MILLER, R. F.; PHILLIPS, P. H. The enhancement of the toxicity of sodium fluoride in the rat by dietary fat. *J. Nutr*, v. 56, p. 447-454, 1955.

MINORS, D. S.; WATERHOUSE, J. M. **Analysis of biological time series**. In: Biological rhythms in clinical practice. 1989 apud MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. 2^a ed. São Paulo: EDUSP. 1999, 321 p.

MISTLEBERGER, R. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 18, p. 171-195, 1994.

MOORE-EDE, M. Physiology of the circadian timing system; predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol*, v. 250, R 737-752, 1986.

MORABITO, N. et al. Three-year effectiveness of intravenous pamidronate versus pamidronate plus slow-release sodium fluoride for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*, v. 14, n. 6, p. 500-506, Jul. 2003.

MROSOVSKY, N. et al. **Behavioral entrainment of circadian rhythms**. Experientia (Basel), v. 45, p. 696-702, 1989 apud MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e aplicações**. 2^a ed. São Paulo: EDUSP. 1999, 321 p.

MROSOVSKY, N.; SALMON, P. A. Triazolan and phase-shifting acceleration reevaluated. *Chronobiol Int*, v. 11, p. 343-348, 1990.

MURPHY, A. J.; COLL, R. J. Fluoride binding to the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum converts its transport sites to a low affinity, lumen-facing form. *J Biol Chem*, v. 267, n. 24, p. 16990-16994, 1992.

NELSON, D. G. et al. Effect of carbonete and fluoride on the dissolution behaviour of synthethic apatites. *Caries Res*, v. 17, p. 200-211, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lipids. In: **Lehninger**: Principles of biochemistry. United States of America, 2000a, p. 363-388.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lipid biosynthesis. In: **Lehninger**: Principles of biochemistry. United States of America, 2000b, p. 770-817.

NEUMAN WF, NEUMAN MW. **The chemical dynamics of bone mineral**. p 75-100 (University of Chicago Press, Chicago, 1958) apud WHITFORD, G. M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2nd ed. Basel: Karger, 1996. 156 p.

NOPAKUN, J.; MESSER, H. H.; VOLLER, V. Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. *J. Nutr*, v. 119, p. 1411-1417, 1989.

OGAARD, B. et al. Effect of fluoride mouthrinsing on caries lesion development in shark enamel; an in situ caries model study. *Scand J dent Res*, v. 99, p. 372-377, 1991.

OGAARD, B. et al. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in human caries model. *Scand J dent Res*, v. 96, p. 209-211, 1988.

OSTROWSKA, Z. et al. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 23, n. 5-6, p. 417-425, Oct-Dec. 2002.

OSTROWSKA, Z. et al. Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr Regul*, v. 37, n. 3, p. 163-174, Sep. 2003.

OSTROWSKA, Z. et al. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 22, n. 2, p. 121-127, Apr. 2001a.

OSTROWSKA, Z. et al. Assessment of the relationship between dynamic pattern of nighttime levels of melatonin and chosen biochemical markers of bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 22, n. 2, p. 129-136, Apr. 2001b.

PAK, C. Y. et al. Attainment of therapeutic fluoride levels in serum without major side effects using a slow-release preparation of sodium fluoride in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, v. 1, n. 6, p. 563-571, Dec. 1986.

PARKINS, F. M. et al. Relationships of human plasma fluoride and bone fluoride to age. *Calcif Tissue Res*, v. 16, n. 4, p. 335-338, 1974.

PATZ, J.; HENSCHLER, D.; FICKENSCHER, H. Bioavailability of fluorides from various salts and from various dietary components. *Dtsch Zahnarztl Z*, v. 32, n. 6, p. 482-486, Jun. 1977 apud FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B. A. **Fluoride in dentistry**. 2nd ed. Denmark. Munksgaard, 1996. 363 p.

PERAULT-STaub, A. M.; STaub, J. F.; MILHAUD, G. A new concept of plasma calcium homeostasis in the rat. *Endocrinology*, v. 95, p. 480-484, 1974.

PEREIRA, A. C. et al. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. *ASDC J dent Child*, v. 67, n. 2, p. 132-135, 2000.

PINDBORG, J. J. Aetiology of developmental enamel defects not related to fluorosis. *Int Dent J*, v. 32, n. 2, p. 123-134, 1982.

RADIGAN, L. R.; ROBINSON, S. Effects of environmental heat stress and exercise on renal blood flow and filtration rate. *J appl Physio*, v. 2, p. 185-193, 1949.

RAISZ, L. G.; KREAM, B. E. Regulation of bone formation. *N Engl J Med*, v. 309, n. 1, p. 29-35, Jul. 1983.

REGAL, P. J.; CONNOLLY, M. S. Social influences on biological rhythms. *Behaviour*, v. 72, p. 171-199, 1980.

RENSON, C. E. Changing patterns of dental caries: a survey of 20 countries. *Ann Acad Med Singapore*, v. 15, n. 3, p. 284-298, Jul. 1986.

RESCH, H. et al. Pharmacokinetic profile of a new fluoride preparation: sustained-release monofluorophosphate. *Calcif Tissue Int*, v. 54, n. 1, p. 7-11, Jan. 1994.

RICHARDS, A.; KRAGSTRUP, J.; NIELSEN-KUDSK, F. Pharmacokinetics of chronic fluoride ingestion in growing pigs. *J Dent Res*, v. 64, n. 3, p. 425-430, Mar. 1985.

RIGGS, B. L. et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, v. 322, n. 12, p. 802-809, Mar. 1990.

RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. 3rd. Osteoporosis and age-related fracture syndromes. *Ciba Found Symp*, v. 134, p. 129-142, 1988.

RIGGS, B. L. et al. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. *J Bone Miner Res*, v. 9, n. 2, p. 265-275, Feb. 1994.

ROBINSON, C. et al. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res*, v. 38, p. 268-276, 2004.

ROLLA, G.; OGAARD, B.; CRUZ, R. A. Clinical effect and mechanism of cariostatic action of fluoride-containing toothpastes: a review. *Int dent J*, v. 41, p. 171-174, 1991.

ROTENBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA BARETO, L. Desenvolvimento da cronobiologia. In: **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. São Paulo. 1999, p. 23-44.

ROTH, J. A. et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*, v. 274, n. 31, p. 22041-22047, 1999.

RUBIN, C. D. et al. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. *Arch Intern Med*, v. 161, n. 19, p. 2325-2333, Oct. 2001.

RWENYONYI, C. et al. Altitude as a risk indicator of dental fluorosis in children residing in areas with 0.5 and 2.5 mg fluoride per litre in drinking water. *Caries Res*, v. 33, p. 267-274, 1999.

SAHLIN, K. Intracellular pH and anergy metabolism in skeletal muscle man. *Acta physiol scand*, 1978. Suppl 455

SCHIFFL, H. et al. Renal fluoride excretion: experimental evaluation of the role of extracellular volume status during intact and impaired kidney function. *Nephron*, v. 29, n. 5-6, p. 245-249, 1981.

SCINFFEL, H. H.; BINSWANGER, U. Human urinary fluoride excretion as influenced by renal functional impairment. *Nephron*, v. 26, p. 69-72, 1980.

SEEMAN, E.; EISMAN, J. A. Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. The single most important consideration is the individual's absolute risk of fracture. *Med J Aust*, v. 180, n. 6, p. 298-303, Mar. 2004.

SINGER, L.; ARMSTRONG, W. D. Regulation of plasma fluoride concentration. *J Appl Physiol*, v. 15, p. 508, 1960.

SINGER, L.; ARMSTRONG, W. D. Regulation of plasma fluoride in rats. *Exptl Biol Med*, v. 117, p. 686, 1964.

SJOGREN, K.; BIRKHED, D. Factors related to fluoride retention after toothbrushing and possible connection to caries activity. *Caries Res*, v. 27, n. 6, p. 474-477, 1993.

SMITH CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 9, n. 2, p. 128-161, 1998.

SMITH, F. A.; EKSTRAND, J. The occurrence and the chemistry of fluoride. In: **Fluoride in dentistry**. Denmark, 1996, p. 17-26.

SMOLENSKY, M. H.; REINBERG, A. **Clinical chronobiology**: relevance and applications to the practice of occupational medicine. In: Shiftwork. Occupational Medicine: State of Art Reviews. v. 5, p. 239-272, 1990 apud MARQUES, N.; MENNA BARRETO, L. **Cronobiologia**: Princípios e aplicações. 2^a ed. São Paulo: EDUSP. 1999, 321 p.

SPAK, C. K.; EKSTRAND, J.; ZYLBERSTEIN, D. Bioavailability of fluoride added by baby formula and milk. *Caries Res*, v. 16, p. 249-256, 1982.

SPEIRS, R. L. The relationship between fluoride concentrations in serum and in mineralized tissues in the rats. *Arch oral Biol*, v. 31, p. 373-381, 1986.

SULZMAN, F. M.; FULLER, C. A.; MOORE-EDE, C. Environmental synchronizers of squirrel monkey circadian rhythms. *J Appl Physiol*, v. 43, p. 795-806, 1977.

SUTTIE, J. W.; PHILLIPS, P. H. The effect of age on the rate of fluorine deposition in the femur of the rat. *Arch Biochem Biophys*, v. 83, p. 355-359, Aug. 1959.

TABARI, E. D. et al. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. *Br Dent J*, v. 189, n. 4, p. 216-220, 2000.

TALMADGE, R. V.; ROYCROFT, J. H.; MILHAUD, G. Daily fluctuations in plasma calcium, phosphate and their radionuclide concentrations in the rat. *Calcif Tissue Res*, v. 17, p. 19-26, 1975.

TAVES DR. Electrophoretic mobility of serum fluoride. *Nature*, v. 220, n. 167, p. 582-583, Nov. 1968.

TAVES, D. R. New approach to the treatment of bone disease with fluoride. *Fed Proc*, v. 29, p. 1185-1187, 1970.

TAVES, D. R.; GUY, W. S. **Distribution of fluoride among body compartments**. In: Continuing evaluation of the use of fluorides. AAAS Selected Symp 11. Boulder, CO: Westview Press, 1976, p. 159-185 apud FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B. A. **Fluoride in dentistry**. 2nd ed. Denmark. Munksgaard, 1996. 363 p.

TAVES, O. R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v. 15, p. 969-974, 1968.

TEN CATE, J. M.; FEATHERSTONE, J. D. B. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev oral Biol*, v. 2, p. 283-296, 1991.

TEN CATE, J. M. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res*, v. 38, p. 254-257, 2004.

THIBODEAU, E. A.; BOWEN, W. H.; MARQUIS, R. E. pH-dependent fluoride inhibition of peroxidase activity. *J Dent Res*, v. 64, n. 10, p. 1211-1213, Oct. 1985.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol*, v. 6, n. 6, p. 315-328, 1978.

TOUMBA, K. J. Slow-release devices for fluoride delivery to high-risk individuals. *Caries Res*, v. 35, p. 10-13, 2001. Supplement 1.

TRAUTNER, K.; EINWAG, J. Influence of milk and food on fluoride bioavailability from NaF and Na₂FPO₃ in man. *J Dent Res*, v. 68, n. 1, p. 72-77, 1989.

TRAUTNER, K.; SIEBERT, G. An experimental study of bio-availability of fluoride from dietary sources in man. *Archs Oral Biol*, v. 31, n. 4, p. 223-228, 1986.

UTEGALIEVA, R. S.; IVASHCHENKO, V. I.; ESYREV, O. V. Competitive inhibition of Ca-ATPase in the sarcoplasmic reticulum by sodium fluoride. *Ukr Biokhim Zh*, v. 62, n. 5, p. 43-48, 1990.

VAN LOUVEREN, C. The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition. *J dent Res*, v. 69, p. 676-681, 1990.

VIEGAS, A. R. et al. Fluoretação da água de abastecimento público. *Rev Ass paul Cirurg Dent*, v. 41, n. 4, p. 202-204, 1987.

WANG YN, XIAO KQ, LIU JL, DALLNER G, GUAN ZZ. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. *Toxicology*, v. 146, n. 2-3, p. 161-169, 2000.

WATERHOUSE, C.; TAVES, D. R.; MUNZER, A. Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption. *Clin Sci*, v. 58, p. 145-152, 1980.

WEIDMANN, S. M.; WEATHERELL, J. A. The uptake and distribution of fluorine in bones. *J Pathol Bacteriol*, v. 78, p. 243-255, Jul. 1959.

WHITFORD, G. M. et al. Fluoride uptake by *Streptococcus mutans* 6715. *Infect Immun*, v. 18, p. 680-687, 1977.

WHITFORD, G. M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J dent Res*, v. 69, p. 539-549, 1990. Special issue.

WHITFORD, G. M. Intake and metabolism of fluoride. *Adv dent Res*, v. 8, n. 1, p. 5-14, 1994a.

WHITFORD, G. M. Effects of plasma fluoride and dietary calcium concentrations on GI absorption and secretion of fluoride in the rat. *Calcif Tissue Int*, v. 54, n. 5, p. 421-425, 1994b.

WHITFORD, G. M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2nd ed. Basel: Karger, 1996. 156 p.

WHITFORD, G. M. Determinants and mechanisms of enamel fluorosis. *Ciba Found Symp*, v. 205, p. 226-245, 1997.

WHITFORD, G. M.; AUGIERI, J. M. Net secretion of fluoride into the GI tract: effect of calcium in rats. *Caries Res*, v. 27, n. 212, 1993. /Abstract/

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H. Plasma fluoride levels in the dog as a function of age. *Caries Res*, v. 17, p. 561, 1983.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H. Fluoride absorption: the influence of gastric acidity. *Calcif. Tissue Int*, v. 36, p. 302-307, 1984.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H.; REYNOLDS, K. E. Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. *Amer J Physiol*, v. 236, p. 141-148, 1979.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H.; STRINGER, G. I. Fluoride renal clearance: a pH dependent event. *Amer J Physiol*, v. 230, p. 527-532, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fluorides and oral health. Report of WHO expert committee and oral health status and fluoride use. WHO Technical Report Series 846. Geneva, WHO. 1994; p. 37.

YAMAMOTO, G. et al. Distribution and forms of fluorine in whole blood of human male. *Anal Biochem*, v. 182, n. 2, p. 371-376, Nov. 1989.

YODER, K. M. et al. Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community Dent oral Epidem*, v. 26, p. 382-393, 1998.

ZHANG, B. et al. Preservation of the activity state of hepatic branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase during the isolation of mitochondria. *Biochem J*, v. 246, n. 3, p. 625-631, 1987.

ZIMMER, S. Caries-preventive effects of fluoride products when used in conjunction with fluoride dentifrice. *Caries Res*, v. 35, p. 18-21, 2001. Supplement 1.

ZIPKIN, I. et al. Urinary fluoride levels associated with the use of fluoridated waters. *Public health rep*, v. 71, p. 767-772, 1956.

ZIPKIN, I.; MCCLURE, F. J. Deposition of fluorine in the bones and teeth of the growing rat. *J Nutr*, v. 47, n. 4, p. 611-620, Aug. 1952.

Carta de Informação

O flúor tem um importante papel na prevenção de cáries, por isto, tem-se buscado conhecer todos os mecanismos envolvidos no seu metabolismo no organismo. Como a quantidade de flúor ingerido através da alimentação pode ser analisada no sangue e na urina, este estudo terá como objetivo avaliar se existe influência do relógio biológico na quantidade de flúor encontrada no sangue, e o que, no organismo, poderia controlar isto. Assim, este estudo será realizado em duas etapas. Na primeira etapa, os voluntários deverão escovar os dentes com uma pasta dentária fornecida por nós, sem flúor, durante um período 30 dias. Na segunda etapa, os voluntários se alimentarão durante 5 dias apenas com comidas fornecidas por nós, usarão pasta dentária também fornecida por nós, todos os dias farão 5 exames de sangue, de 3 em 3 horas, e também guardarão toda a urina eliminada durante o dia em potes fornecidos por nós. Após este estudo, os voluntários deverão ficar por no mínimo 3 meses sem doar sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO VOLUNTÁRIO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, de de

Assinatura do Voluntário

Profa. Dra. Marília A. R. Buzalaf

Vanessa Eid da Silva Cardoso

ANEXO 2

Conteúdo de flúor nos alimentos analisados e descrição da dieta

O conteúdo de flúor nos alimentos não cozidos (média $\pm$ DP) está apresentado na Tabela 1.

A Tabela 2 apresenta o teor de flúor nos alimentos preparados ou cozidos com água e bebidas reconstituídas (média $\pm$ DP).

A descrição do cardápio elaborado pela nutricionista (medidas padrão para indivíduo do sexo feminino, idade, peso e altura médios de 26 anos, 64 Kg e 1,70 m, respectivamente, sem relato sobre prática de atividade física) está apresentada na Tabela 3.

A Tabela 4 descreve o cardápio adaptado pelas pesquisadoras.

A seleção de voluntários de ambos os sexos para o estudo requereu algumas modificações no cardápio elaborado pela nutricionista, na tentativa de oferecermos uma dieta mais pesada, porém em menores quantidade e frequência, e que se adequasse às necessidades dos diferentes sexos.

As concentrações de flúor encontradas para os grupos de alimentos selecionados neste estudo foram menores que as descritas por Krause; Mahan (1985).

Tabela 1. Conteúdo de flúor em alimentos não cozidos (média $\pm$ DP).

Grupo de alimentos	N	Média $\pm$ DP (ppm)	[F] (ppm)	
			mínimo	máximo
Vegetais ^a	7	0,025 $\pm$ 0,017	0,004	0,047
Frutas ^b	7	0,012 $\pm$ 0,007	0,002	0,020
Leite	1	0,015 $\pm$ 0,002	0,013	0,016
Gorduras e óleo ^c	2	0,340 $\pm$ 0,400	0,002	0,710

^a Inclui cenoura, pepino, chuchu, abobrinha, alface, alho, cebola,

^b Inclui limão, tomate, laranja, mamão, pêra, maçã, banana

^c Inclui manteiga e óleo

Tabela 2. Conteúdo de flúor em alimentos preparados ou cozidos com água e bebidas reconstituídas (média $\pm$ DP).

Alimentos/bebidas	Média $\pm$ DP (ppm)	[F] (ppm)	
		mínimo	máximo
Carne vermelha	0,030 $\pm$ 0,004	0,027	0,032
Peito de frango	0,096 $\pm$ 0,007	0,090	0,102
Ovo	0,010 $\pm$ 0	0,010	0,010
Arroz e feijão	0,103 $\pm$ 0,004	0,100	0,105
Carne com legumes ^a	0,070 $\pm$ 0,004	0,067	0,073
Carne ao molho de cebola	0,061 $\pm$ 0,003	0,059	0,063
Bife com batata frita	0,065 $\pm$ 0,005	0,061	0,068
Legumes cozidos ^b	0,142 $\pm$ 0	0,142	0,142
Panqueca	0,074 $\pm$ 0,002	0,072	0,075
Misto quente	0,077 $\pm$ 0,001	0,076	0,078

Doces ^c	0,069 ±0,015	0,054	0,089
Suco ^d	0,055±0,003	0,052	0,059

^a Inclui cenoura, batata, pimentão, cebola

^b Inclui cenoura, batata, beterraba

^c Inclui doce de leite, bananada, pé de moleque

^d Inclui suco MID (maçã, carambola)

Tabela 3. Descrição do cardápio elaborado pela nutricionista (medidas padrão para indivíduo do sexo feminino, idade, peso e altura médios de 26 anos, 64 Kg e 1,70 m, respectivamente, sem relato sobre prática de atividade física).

Refeição	Alimento	Medida Caseira	Substituição
Café da manhã	Leite desnatado	1 copo (req.)	-
	Café	1 xíc. caf.	-
	Requeijão Light	2 col. chá	Margarina, (2 c.chá)
	Biscoito Cream Craker	6 unidades	Pão francês(1 unid)
	Açúcar	2 col. chá	Adoçante, livre
Colação	Banana nanica	1 unidade	Laranja pêra, pêra, maçã, papaya (1 unidade)
Almoço	Arroz	6 col. sopa	Macarrão ao sugo (1 prato raso)
	Feijão	4 col. sopa	-
	Bife grelhado	1 unidade	Peito de frango (1 unidade)
	Milho refogado	4 col. sopa	-
	Tomate		Cenoura, batata, chuchu, abobrinha, rúcula
	Alho	1 col. chá	-
	Cebola	2 col. chá	-
	Óleo de girassol	1 col. sopa	-
	Sal	2 g	-
	Azeite	1 col. chá	limão
	Vinagre	1 col. sobremesa	
Lanche da tarde	Laranja pêra	1 unidade	Banana, pêra, maçã, papaya (1 unidade)
Jantar	Arroz	5 col. sopa	Macarrão ao sugo (1 prato raso)
	Feijão	3 col. sopa	-
	Filé de frango grelhado	1 unidade	Bife grelhado (1 unidade)
	Abobrinha refogada		Milho refogado (3 col. sopa)
	Cenoura	2 unidades	Batata, chuchu, abobrinha, rúcula
	Alho	1 unidade	-
	Cebola		-
	Óleo de girassol	1 col. chá	-
	Sal	2 col. chá	-
	Azeite	1 col. sopa	-
	Vinagre	2 g	-
		1 col. chá	limão
		1 col. sobremesa	
Ceia	Pão de forma	2 fatias	Pão francês (1 unidade), Bolacha Cream cracker cookie (6 unidades)
	Margarina	2 col. chá	Requeijão light

Tabela 4. Descrição do cardápio adaptado pelas pesquisadoras.

Refeição	Alimento	Medida Caseira	Substituição
Café da manhã	Leite desnatado Café Misto quente	1 copo (req.) 1 xíc. caf. 2 unidades	Vitamina (1 copo) - Pão com manteiga (2 fatias)
Almoço e Jantar	Arroz Feijão Carne com legumes cozidos Salada de alface Suco de limão	6-8 col. sopa 2 conchas 1 unidade Livre 1 copo	- - Bife com batata frita (1 unidade), panqueca de carne (2 unidades), carne com batata e molho de tomate (1 unidade) tomate, beterraba, cenoura, pepino Suco MID (apenas no jantar)
Lanche da tarde	Leite desnatado Café Misto quente	1 copo (req.) 1 xíc. caf. 2 unidades	Nescau (1 c. sopa) Bolo (1 fatia)