Avaliação de várias concentrações de flúor na formação óssea ectópica em ratos jovens e velhos

Juliane Guimarães de Carvalho

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia, área
de Biologia Oral.

(Edição Revisada)

BAURU

2005

Avaliação de várias concentrações de flúor na formação óssea ectópica em ratos jovens e velhos

Juliane Guimarães de Carvalho

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia, área
de Biologia Oral.

(Edição Revisada)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU

2005

Carvalho, Juliane Guimarães

C253a Avaliação de várias concentrações de flúor na
formação óssea ectópica em ratos jovens e velhos /
Juliane Guimarães de Carvalho. – Bauru, 2005.

83 p. : il. ; 30cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. USP

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

**Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e/ ou meios eletrônicos.**

Assinatura do autor (a):

Data:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Pós-Graduação

e-mail: posgrad@fob.usp.br – Fone: (0XX14)235-8223

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por
JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 25 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. **ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM**
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. **GERSON FRANCISCO DE ASSIS**
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof.ª Dr.ª **MARÍLIA AFONSO RABELO BUZALAF**
Presidente da Banca
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. **José Carlos Pereira**
Presidente da CPG

JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO

02 de dezembro de

1973 Nascimento

Fernandópolis-SP

1994 – 1997 Curso de Graduação em Odontologia pela
Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP

1998 – 2000 Especialização em Dentística pelo Hospital de
Reabilitação em Anomalias Craniofaciais (HRAC -
USP) de Bauru.

2000 – 2002 Clínica Privada

2003 - 2005 Curso de Pós - Graduação em Biologia Oral, em
nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia
de Bauru – USP.

Associações Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica –
SBPqO

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas, e lhe darão confiança na presença divina que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”.

Francisco Cândido Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais

Geraldo Silva de Carvalho e

Doroty Guimarães de Carvalho por terem me proporcionado o alicerce necessário para a minha formação intelectual e espiritual e pelo amor incondicional.

“Depois de algum tempo você aprende que há mais de seus pais em você do que você supunha”

W. Shakespeare

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus irmãos Pedro, Olívia, Marcelo, Luciano, Fernanda e Fabiano pelo apoio, carinho e compreensão.

À tia Darcy Guimarães por ter me incentivado a seguir a carreira acadêmica.

À Aline Carvalho Batista amiga e “irmã”, por me apresentar ao curso de mestrado e pela presença (mesmo longe) em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pelo apoio, amizade, cumplicidade e orientação neste trabalho.

À amiga Cleide Cristina Rodrigues Martinhon que acompanhou de perto a evolução deste trabalho. Pela amizade, paciência, disponibilidade e tolerância.

À Jaqueline Polo, pela amizade sincera e por estar sempre disposta a me ouvir e ajudar nas diversas dificuldades da minha vida.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À orientadora deste trabalho, Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf pela confiança, paciência, generosidade e pelo exemplo de pessoa.

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, pelos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento intelectual.

Ao amigo Rodrigo Cardoso de Oliveira pela ajuda nunca negada.

Aos colegas do curso de Mestrado em Biologia Oral que contribuíram para minha formação: Cristina Miguel Sicca, Mauro Corotti, Kellen Gasque, Rejane Fukushima e Tatiana Salles .

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Bioquímica: Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes da Silva.

A todos os amigos que freqüentam o laboratório de Bioquímica e que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas disciplina de Histologia, Prof. Dr. Rumio Taga e Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis pela disponibilidade do laboratório de Histologia.

Aos alunos de graduação e pós - graduação que freqüentaram o laboratório de Histologia durante o curso desta pesquisa, agradeço a paciência e solidariedade de todos vocês.

Às amigas Tania Mary Cestari e Danielle Santi Ceolin pela orientação em toda a parte histológica, pela amizade e paciência. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, Erasmo, Wagner, Richard e Luís pela ajuda indispensável durante o período experimental deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação: Giane Tenório Quintela, Maria Margareth Pereira Mokarzel, Ana Letícia Palombo Momesso.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa de sua excelentíssima Diretora, Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, Prof. Dr. José Carlos Pereira;

Ao Departamento Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru.

SUMÁRIO

LISTA DE

ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Flúor.....	3
2.2 O Tecido ósseo.....	3
2.3 A utilização do flúor em doenças ósseas.....	5
2.4 Mecanismo de ação do flúor nas células ósseas.....	7
2.5 O efeito do flúor na estrutura óssea	9
3 PROPOSIÇÃO.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Obtenção e tratamento dos animais.....	17
4.2 Obtenção da matriz óssea desmineralizada.....	18
4.3 Procedimentos cirúrgicos para implantação da matriz óssea desmineralizada.....	19
4.4 Eutanásia dos animais.....	20
4.5 Procedimentos histológicos.....	21
4.6 Análise Morfométrica.....	22
4.7 Análise de flúor no plasma.....	23
4.8 Análise de flúor na superfície do fêmur.....	25
4.8.1 Análise de flúor.....	26
4.8.2 Análise de fósforo.....	26
4.9 Análise de flúor no fêmur.....	28
4.10 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Massa corporal.....	30

5.2	Consumo de água.....	31
5.3	Análises de flúor.....	32
5.4	Análise Morfométrica.....	41
5.4.1	Densidade de volume.....	41
5.5	Análise radiográfica.....	50
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	ABSTRACT.....	81
	APÊNDICE.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DP	Desvio padrão
F	flúor
g	grama
HCl	Ácido clorhídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HF	Ácido fluorídrico ou fluoreto de hidrogênio
HMDS	Hexametil-disilazano ou hexametil-disiloxano
Kg	Kilograma
KV	kilovoltagem
L	litro
M	Molar
mAs	Miliamperagens
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mV	milivoltagem
nm	nanômetro
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
MFP	Monofluorofosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	nanômetro
OH ⁻	Íon hidroxila
p	Nível de significância
P	fósforo
pH	potencial hidrogênico

ppm	parte por milhão
r	Coeficiente de correlação
TISAB	Tampão de ajuste de força iônica total

RESUMO

O presente trabalho avaliou as concentrações de 0 (controle), 5, 15 e 50 ppm de flúor na água na indução ectópica de osso em ratos jovens (90 dias) e velhos (365 dias). Para tanto, 80 ratos Wistar, sendo 40 com 90 dias e 40 com 365 dias receberam implantes de matriz óssea alógena desmineralizada. Depois de 28 dias, os animais foram mortos e os implantes radiografados e analisados morfometricamente. Também foram obtidas amostras do fêmur e plasma dos animais, para análise de flúor com o eletrodo. A análise de flúor na superfície do fêmur foi feita pelo método direto e no fêmur e no plasma foi feita após difusão facilitada por HMDS. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, teste t e regressão linear ($p < 0,05$). A concentração média ($\pm DP$) de F no plasma ($\mu g/mL$) para os ratos de 90 dias foi de $0,025 \pm 0,002a$, $0,037 \pm 0,007ab$, $0,057 \pm 0,011b$, $0,145 \pm 0,029c$, na superfície do fêmur ($\mu g/g$) foi de $564 \pm 122a$, $961 \pm 357ab$, $1415 \pm 546bc$, $3194 \pm 502c$ e no fêmur ($\mu g/g$) foi de $207 \pm 21a$, $481 \pm 76a$, $1217 \pm 188b$, $2735 \pm 355c$, para as concentrações de 0 (controle), 5, 15 e 50 ppm, respectivamente. Para os ratos de 365 dias, a concentração de flúor no plasma ($\mu g/mL$) foi de $0,031 \pm 0,003a$, $0,045 \pm 0,010ab$, $0,063 \pm 0,016b$, $0,118 \pm 0,026c$, na superfície do fêmur ($\mu g/g$) foi de $675 \pm 120a$, $1298 \pm 426ab$, $2140 \pm 681bc$, $3870 \pm 843c$ e no fêmur ($\mu g/g$) foi de $694 \pm 152a$, $1376 \pm 583b$, $1732 \pm 564b$, $4494 \pm 343c$. Houve correlação positiva da quantidade de flúor presente entre o plasma e a superfície do fêmur ($r = 0,89$; $p < 0,0001$ e $r = 0,87$; $p < 0,0001$), plasma e o fêmur ($r = 0,91$; $p < 0,0001$ e $r = 0,82$; $p < 0,0001$) e entre a superfície do fêmur e fêmur ($r = 0,99$; $p < 0,0001$ e $r = 0,84$; $p < 0,0001$) para os ratos de 90 e 365 dias respectivamente. A análise morfométrica revelou uma maior formação óssea para os ratos jovens, que receberam 5 ppm F na água de beber, embora não

tenha havido significância, enquanto houve um prejuízo significativo na formação óssea para aqueles que receberam 50 ppm F. Para os ratos velhos, não houve diferença significativa entre os subgrupos. As observações radiológicas confirmaram os achados morfométricos. Os resultados sugerem que o flúor em pequenas doses na água de beber tem efeito anabólico na formação óssea em ratos, mas isto só acontece em animais jovens.

1 INTRODUÇÃO

Em várias regiões do mundo a água é naturalmente fluoretada com altas quantidades de flúor. Os habitantes que utilizam esta água para beber podem desenvolver fluorose endêmica, apresentando alterações nos ossos e nos dentes (KLEEREKOPER; BALENA, 1991)³⁷. Estudos deste fenômeno mostraram que o flúor tem um importante efeito biológico em potencializar a mineralização destes tecidos, chegando à conclusão de que poderia também ser utilizado em doenças onde houvesse perda óssea (PHIPPS, 1995)⁵².

Em contraste com os tratamentos que agem na inibição da reabsorção óssea o flúor tem sido utilizado no tratamento da osteoporose pela sua capacidade em estimular a formação óssea e aumentar substancialmente a quantidade de osso trabecular (JIANG, 1996)³². O flúor aumenta a formação de osso cortical e trabecular, no entanto, ele age primeiramente e melhor no osso trabecular (BAYLINK et al 1983)³.

Um aumento da massa pode não necessariamente indicar uma melhora na qualidade óssea (MOSEKILDE, 1987)⁴⁸. Em estudos feitos em animais mostrou-se que enquanto em baixas doses o flúor não causa diminuição da resistência óssea podendo até aumentá-la (EINHORN, 1992) em altas doses pode causar uma diminuição da resistência óssea tendo assim um efeito prejudicial (TURNER et al, 1992)⁶⁸.

O efeito anabólico do flúor sobre o osso é devido a um direto efeito mitogênico sobre as células ósseas (FARLEY, 1983)²⁰. Porém, a obtenção de melhores respostas ao tratamento se dá através de culturas com células precursoras de osteoblastos (TURNER, 1997)⁷³. Sendo assim, o flúor age melhor em células osteoprogenitoras e/ou em osteoblastos indiferenciados, os quais sintetizam uma maior

quantidade de fatores de crescimento (LAU; BAYLINK, 1998)³⁹. O flúor pode portanto agir de maneira diferente em indivíduos novos e velhos.

Ainda há controvérsias na utilização do flúor para o tratamento da osteoporose e um dos principais motivos é a determinação da dose a ser utilizada (RIGGS et al.1990)⁵⁸. Vários estudos mostram que em doses muito altas o flúor é prejudicial à estrutura óssea (RIGGS et al., 1990; KLEEREKOPER; BALENA, 1991; DURE SMITH, 1991)^{58,37,14}. Em humanos a dose limite seria de 80 mg NaF/dia (KLEEREKOPER ; BALENA,1991)³⁷. Entretanto a dose ideal ainda é um importante fator a ser determinado.

O método de osteoindução ectópica proposto por URIST et al (1965) proporciona um meio de estudar a formação de osso fora do tecido ósseo. A implantação de uma matriz óssea desmineralizada no músculo de ratos causa a migração de células indiferenciadas que se diferenciam em condroblastos e osteoblastos conduzindo à formação de tecido ósseo. TURNER et al (1989)⁶⁷ indicaram o método de osteoindução ectópica como um modelo de estudo da influência do flúor sobre o tecido ósseo, segundo os autores, embora o processo de formação óssea ectópica difere da formação endocondral *in situ*, os eventos histológicos e bioquímicos são similares (REDDI, 1981)⁵⁵.

Diante do colocado, propusemo-nos a realização de um estudo para avaliação da influência de diferentes concentrações de flúor no processo de mineralização óssea utilizando o modelo de osteoindução ectópica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O flúor

O flúor é um componente natural da biosfera. Entre os halógenos, o flúor é diferente em vários aspectos, incluindo o fato de se combinar reversivelmente com íons hidrogênio para formar um ácido fraco, o HF. Muito do comportamento fisiológico do flúor pode ser explicado com base na difusibilidade do HF.

Ávido por tecidos calcificados, o flúor tem grande habilidade em estimular a formação de novo osso, assim como reverter, a formação de lesões iniciais de cárie (WHITFORD, 1996)⁸³.

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 presente no osso é geralmente proporcional à ingestão ao longo do tempo (WHITFORD, 1994; WHITFORD, 1999)^{82,84}.

O “clearance” do flúor do plasma pelo esqueleto ocorre rapidamente. Aproximadamente 50% do flúor absorvido diariamente por jovens ou adultos saudáveis de meia-idade se associa aos tecidos calcificados em 24h, enquanto que quase todo restante é excretado pela urina. Esta distribuição 50:50 se desloca a favor de maior retenção em bebês e crianças pequenas (WHITFORD, 1996)⁸³, e provavelmente se desloca a favor de uma maior excreção em indivíduos mais velhos, embora se saiba pouco sobre este assunto (WHITFORD, 1994)⁸².

2.2 O tecido ósseo

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído de uma população heterogênea de células,

em diferentes estágios de diferenciação celular que, através de uma intrincada e muito bem coordenada seqüência de eventos, regula a mobilização e a deposição de mineral durante a vida (PIZAURO JR., 2002)⁵³.

É um tecido conjuntivo especializado mineralizado, cujo peso consiste em 33% de matriz orgânica, dos quais 28% de colágeno do tipo I e 5% de proteínas do tipo não colágeno. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita, que perfazem os 67% remanescentes do osso. Além de suas funções esqueléticas de suporte, proteção e locomoção, o osso constitui um reservatório importante de minerais (TEN CATE, 2001)⁶⁶.

O tecido ósseo é celularizado, vascularizado, e está em um incessante processo de remodelação. Nesta participam células que destroem a matriz envelhecida (células gigantes, osteoclastos) e células que produzem, secretam e mineralizam a nova matriz óssea (células mononucleadas, osteoblastos).

A resistência e integridade do tecido ósseo dependem da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção pelos osteoclastos e a formação pelos osteoblastos. Com o envelhecimento ou como resultado de alguma doença, este equilíbrio é deslocado a favor dos osteoclastos de forma que a reabsorção excede a formação óssea, tornando os ossos frágeis e predispostos a fraturas (RODAN; MARTIN, 2000)⁵⁹.

2.3 A utilização do flúor em doenças ósseas

A primeira hipótese de que o flúor poderia ser utilizado como terapêutico no tratamento de doenças ósseas foi publicada em 1932 por MOLLER e GUDJONSSON⁴⁶, segundo PHIPPS⁵², 1995.

Na década de 1960, o flúor começou a ser utilizado no tratamento da osteoporose e se iniciaram os estudos clínicos do efeito do flúor sobre o tecido ósseo. A osteoporose é uma doença caracterizada pela perda de densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento da fragilidade óssea e a uma pré-disposição a fraturas. Acredita-se que a patofisiologia da osteoporose está relacionada a mudanças na função dos osteoblastos resultando em uma diminuição da formação óssea. A terapia ideal para osteoporose seria aumentar a massa óssea, a fim de diminuir a ocorrência de novas fraturas. No entanto, os agentes comumente utilizados como a calcitonina, estrogênio, cálcio, bifosfonato e estradiol agem na diminuição da reabsorção de massa óssea não atuando na reposição de osso perdido. Estes agentes estão direcionados para a inibição da atividade osteoclástica, reduzindo a reabsorção e o "turnover" ósseo (RIGGS et al., 1990; CHAE et al., 1999; SUSA, 1999)^{58,10}.

O flúor vem sendo utilizado no tratamento da osteoporose em função de sua capacidade de aumentar a densidade óssea. Este efeito parece ser através do aumento da quantidade de osso trabecular. Dados histomorfométricos mostraram que o flúor aumenta o volume de osso trabecular através do aumento do número de osteoblastos (FARLEY et al., 1983; LAU e BAYLINK 1998; DURE-SMITH, 1991; CHAE et al., 1999)^{20,39,14,10}.

A utilização do flúor em doenças ósseas causa controvérsias entre os pesquisadores. Um motivo de discussão é o

composto de flúor a ser utilizado. O fluoreto de sódio (NaF) e o monofluorofosfato de sódio (MFP) são os dois compostos que podem ser utilizados no tratamento de doenças ósseas. LIOTÉ et al.⁴¹, em 1992 não encontraram diferença na biodisponibilidade do flúor entre os dois compostos, porém a biodisponibilidade do NaF pode ser prejudicada pela concomitante absorção do cálcio, sendo que quando ingeridos ao mesmo tempo a absorção do flúor diminui de 20-50% (KANIS,1993)³³. Estas drogas devem ser ingeridas separadamente. O cálcio é uma droga normalmente utilizada no tratamento da osteoporose, portanto para simplificar a ingestão de medicamentos os autores recomendam a utilização do MFP que pode ser ingerido juntamente com o cálcio. O MFP também é considerado menos prejudicial à mucosa intestinal em relação ao NaF (RESCH et al, 1994; ROSEN, 2001)^{57,60}.

O efeito do flúor sobre a resistência óssea também é discutido. Vários estudos em animais mostram que o aumento da massa óssea não melhora a resistência óssea. (TURNER; DUNIPACE 1993; TURNER, 1996; TURNER et al, 2001; MOSEKILDE et al, 1987; TURNER et al.,1997; JIANG, 1996)^{70,72,74,48,73,32}. Porém EINHORN et al.¹⁶, em 1992 em estudo realizado com animais mostrou influência positiva do flúor em relação à resistência óssea. Existem vários resultados positivos em humanos (RUBIN, 2001; PAK ,1995; REGINSTER et al., 1998)^{61,50,56}. O flúor pode prejudicar a resistência óssea possivelmente pela alteração do tamanho e forma dos cristais alterando a união eletrostática entre os cristais e o colágeno (GRYNPAS, 1993; FRATZL, 1994; TURNER, 1993)^{24,23,69}.

A dose de flúor a ser utilizada é outro motivo de conflito e um importante fator a ser determinado. Estudos mostram uma variação de 10 a 200 mg de NaF/dia (RIGGS, 1990; KLEEREKOPER; BALENA, 1991)^{58,37}, porém já existe um consenso de que em doses

altas o flúor é prejudicial à estrutura óssea. DURE-SMITH et al.¹⁴, em 1991 em uma revisão sobre a dose, duração e ação do flúor sobre o esqueleto mostraram um efeito positivo em pacientes que receberam de 66-88 mg de NaF/dia (30-40 mg de íon flúor por dia). KLEEREKOPER ; BALENA³⁷, em 1991 relataram que em doses abaixo de 40 mg de NaF/ dia não há efeito consistente do flúor e em doses acima de 80 mg de NaF/ dia o flúor pode prejudicar a mineralização óssea.

As maiores desvantagens da utilização do flúor no tratamento de doenças ósseas são que nem todos os pacientes têm resposta ao tratamento, chegando a 20–44% dos pacientes tratados. A falta de resposta tem sido atribuída à diferença na absorção e retenção do flúor (DURE-SMITH,1991)¹⁴, além disto o flúor pode causar efeitos colaterais no trato gastrintestinal, calcificações nas articulações de alguns pacientes (BAYLINK et al.,1983)³ e maior índice de fraturas no quadril (INKOVARRA, 1991)³⁰.

2.4 Mecanismo de ação do flúor nas células ósseas

O flúor, em dose micromolar, age na estimulação da atividade de muitos osteoblastos maduros, isto é, aumenta a expressão da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e síntese de osteocalcina em culturas de células ósseas. Acredita-se, portanto, que este estímulo da proliferação e atividade dos osteoblastos conduza a um aumento da formação óssea (FARLEY, 1983; WERGEDAL, 1988; LAU e BAYLINK, 1998)^{20,80,39}.

FARLEY et al.²⁰, em 1983 foram os primeiros a encontrarem evidências da ação do flúor em células ósseas *in vitro*. A dose mitogênica do flúor para células ósseas foi de aproximadamente 10 µM, similar ao nível de flúor efetivo no plasma em humanos. O efeito mitogênico do flúor foi posteriormente confirmado por outros

pesquisadores (BURGENER; CAVERSASIO; BONJOUR,1995; HALL, 1987)^{6,25}.

LAU; BAYLINK³⁹, em 1998 publicaram algumas propriedades consideradas únicas do flúor: 1ª)A dose mitogênica do flúor para células ósseas é muito pequena (micromolar), duas ordens de magnitude mais baixa do que a dose requerida para o efeito do flúor sobre outros sistemas biológicos (milimolar). 2ª)De acordo com observações de que o efeito anabólico do flúor é específico para o tecido ósseo, a atividade mitogênica do flúor é também específica para células ósseas. 3ª)Parece ser pré-requisito a presença de um fator de crescimento para a atividade mitogênica do flúor em células ósseas. 4ª)O flúor age primeiramente em células osteoprogenitoras e/ou indiferenciadas, as quais sintetizam uma grande quantidade de fatores de crescimento. 5ª)A atividade mitogênica do flúor em células ósseas envolve o aumento da fosforilação de muitas proteínas sinalizadoras, incluindo a proteína quinase ativada mitogenicamente (MAPK).

A ação do flúor é específica para células ósseas, aumentando a proliferação celular através de um aumento da fosforilação intracelular. O aumento da fosforilação ocorre através do desequilíbrio entre duas enzimas, a proteína tirosina quinase, responsável pela fosforilação e a fosfotirosina fosfatase, responsável pela desfosforilação. Segundo o modelo de mecanismo de ação do flúor em células ósseas proposto por LAU; BAYLINK³⁹, em 1998, o flúor age sozinho, porém, necessita da presença de um fator de crescimento acoplado ao receptor de membrana da célula para a ativação inicial da fosforilação. O flúor, nesta proposta, agiria na inibição de uma fosfotirosina fosfatase, aumentando a fosforilação intracelular, ativando assim uma via de tradução de sinais Ras-Raf-MAPK. Esta via ativada possibilitaria a migração da MAPK para o

interior do núcleo onde ativaria um número de fatores de transcrição, ação que levaria a um aumento da expressão gênica, síntese de DNA e proliferação e/ou diferenciação celular.

Outro modelo do mecanismo de ação do flúor em células ósseas foi proposto por CAVERZASIO; PALMER; BONJOUR (1998)⁹ para eles o flúor não age sozinho, necessitando da presença do íon alumínio para formar o complexo fluorossilicato (dose milimolar de flúor para uma dose micromolar de alumínio). Este complexo ativaria a proteína G, a qual seria responsável pela ativação das proteínas tirosina quinases, aumentando a fosforilação intracelular e ativando uma via de tradução de sinais Ras – Raf – MAPK. Como na proposta anterior a MAPK ativada migra para o interior do núcleo ativando fatores de transcrição, levando a um aumento da expressão gênica, síntese de DNA e conseqüentemente a proliferação celular.

Ainda há controvérsias entre os pesquisadores sobre a ação do flúor nas células ósseas, a única evidência é o envolvimento da ativação da via de tradução de sinais Ras – Raf – MAPK.

2.5 O efeito do flúor na estrutura óssea

2.5.1 Estudos em Humanos

LEHMANN et al.⁴⁰ (1998) relataram em um estudo longitudinal de 30 anos em duas cidades na Alemanha: Chemnitz, com água fluoretada (1ppm) e Halle, com água não fluoretada e chegaram à conclusão de que a água fluoretada, em concentrações que auxiliam na prevenção da cárie dental, não provoca aumento de densidade óssea, mas pode reduzir a incidência de fraturas no quadril em pacientes com osteoporose. Em 2001, DEMOS et al.¹² em uma revisão sobre a influência da água

fluoretada (1 ppm) sobre incidência de fraturas na doença osteoporose, concluíram que o flúor nesta dose não tem nenhum efeito adverso na incidência de fraturas. Alguns estudos anteriores mostraram aumento na incidência de fraturas após exposição à água fluoretada com 1 ppm. Entretanto, estes estudos foram realizados por um curto período de tempo (JACOBSEN et al,1992; DANIELSON et al, 1992)^{31,11}.

FARRERONS et al.²¹ (1997) concluíram que no tratamento da osteoporose, o fluoreto de sódio (NaF), na dose de 25 mg/dia tem efeito protetor na incidência de fraturas, enquanto RIGGS et al.⁵⁸ (1990), avaliaram a influência do NaF (75mg/dia) concluindo que a terapia com flúor aumenta a densidade do osso trabecular, mas diminui a densidade de osso cortical, aumentando assim, a fragilidade esquelética.

Em 1995, PAK⁵⁰ realizou um estudo de 4 ciclos de 14 meses (12 meses recebendo NaF e 2 meses sem) completando 4 anos de estudo, onde os pacientes receberam 25 mg de fluoreto de sódio duas vezes ao dia. Foi realizado em 110 mulheres com osteoporose e evidência radiográfica de perda óssea. Dos pacientes, 56 mulheres receberam tratamento placebo e 54 mulheres tratamento com fluoreto de sódio. Concluiu que após 4 anos de tratamento o flúor inibe novas fraturas (mas não fraturas recorrentes) e aumenta a massa óssea espinhal e femoral. REGINSTER et al.⁵⁶ em 1998, utilizaram 200 mulheres com osteoporose divididas em 2 grupos. O primeiro grupo de 100 mulheres recebeu dois tabletes de 76 mg diários de monofluorfosfato de sódio (MFP) equivalente a 10 mg de íon flúor ou 20 mg de íon F/ dia mais 1000 mg de cálcio e o outro grupo recebeu somente cálcio. Concluíram que o flúor com o cálcio, administrado por períodos prolongados, pode diminuir fraturas mais que o cálcio sozinho em pacientes com osteoporose moderada.

Em 1990 RIGGS et al.⁵⁸ realizaram um estudo com 202 mulheres com osteoporose com presença de fraturas. Metade das mulheres receberam 75 mg de NaF/dia e metade receberam placebo, todas receberam suplemento de cálcio (1500 mg/dia). O estudo foi feito em 4 anos e concluíram que o flúor aumenta o osso trabecular, mas diminui a densidade mineral de osso cortical e aumenta a fragilidade esquelética. Neste estudo o flúor não foi efetivo no tratamento da osteoporose.

2.5.2 Estudos em animais

EINHORN et al.¹⁶ (1992) após um estudo em ratos que receberam flúor na água de beber nas concentrações de 0 (controle), 25, 50 e 75ppm, chegaram à conclusão de que a incorporação do flúor não prejudica as propriedades mecânicas do osso. Este resultado entra em conflito com os de outros pesquisadores, que têm demonstrado uma diminuição na resistência óssea quando o nível de flúor no osso aumenta. Um estudo feito por JIANG et al.³², em 1996, em ratas que ingeriram doses de 0,5 mg NaF /kg /dia mostrou que houve um aumento da quantidade óssea porém não houve melhora na resistência óssea. MOSEKILDE; KRAGSTRUP; RICHARDS⁴⁸ (1987) em um trabalho com porcos que receberam 2 mg F/ kg/ dia concluíram que o aumento da massa óssea não necessariamente indica uma melhora na qualidade óssea. TURNER et al.⁷³, em 1997, em uma pesquisa feita em coelhos que receberam 16 mg de F / dia, concluíram que o flúor associado ao IGF-1 aumentou o "turnover" ósseo, mas diminuiu a resistência óssea.

Segundo TURNER et al.⁶⁸ (1992) o flúor em doses inferiores a 16 ppm aumenta a resistência óssea e em doses acima de 16 ppm, diminui. TURNER et al.⁹⁵ (1995) publicaram outro trabalho realizado em

ratos jovens e velhos, que receberam 0 (controle), 5, 15 e 50 ppm de flúor na água. Os autores observaram que a resistência óssea diminuiu 23% nos ratos velhos que receberam água com 50 ppm de flúor, concluindo que a diminuição da resistência óssea parece estar envolvida com os efeitos da idade e da alta concentração de flúor, mas não encontraram associação com a diminuição da densidade óssea ou defeito de mineralização.

TURNER et al.⁷⁴ (2001) relataram que o flúor, quando adicionado à água de beber na concentração de 50 ppm pode prejudicar a mineralização em ratos velhos, devido a um aumento na quantidade de osteóide não mineralizada, diminuindo, assim, a resistência das vértebras.

2.5.3 Estudos in vitro

Em 1983 FARLEY; WERGEDAL; BAYLINK²⁰ publicaram o primeiro estudo *in vitro* onde encontraram evidências de que o flúor em doses de aproximadamente 10 μ M estimula a proliferação celular de células ósseas da calvária, em embriões de galinha.

Um estudo realizado em 1990 por KHOKHER e DANDONA³⁶ em osteoblastos humanos utilizando concentrações de flúor entre 0,1 a 20 mmol/L, mostrou que o fluoreto de sódio estimula a proliferação de osteoblastos e a liberação da fosfatase alcalina. Em 1990, MARIE; VERNEJOUL; LOMRI⁴⁴ realizaram uma pesquisa utilizando osteoblastos de pacientes com osteoporose, eles compararam os pacientes tratados e não tratados com flúor e encontraram *in vitro* que células de pacientes tratados com flúor têm maior proliferação do que as dos pacientes não tratados.

Porém, em 1990 um estudo realizado por KOOP; ROBEY³⁸ com cultura de osteoblastos diferenciados derivados de pacientes

adultos, mostrou que o flúor não aumenta a proliferação de células ósseas ou a síntese de proteínas, as análises foram feitas através de contagem de células e incorporação de timidina e a dose de NaF utilizada pelos autores foi de 10^{-6} a 10^{-3} M.

2.5.4 Estudos de osteoindução ectópica

Em 1989, TURNER et al.⁶⁷ sugeriram que a ação do flúor sobre o osso poderia ser estudada em um modelo de formação ectópica. Isto acontece através de um processo de osteoindução, formação de um novo osso, que ocorre fora do tecido ósseo (WLODARSKI, 1990)⁸⁵.

URIST⁷⁵ em 1965, implantou segmento de osso alogênico desmineralizado em músculo da coxa de coelhos e verificou que a quantidade de osso neoformado era proporcional à matriz enxertada e que esta substituição de matriz sem vitalidade por osso vital com todos seus constituintes morfológicos, ocorria em 4-6 semanas. A análise histológica mostrou que a matriz enxertada era inicialmente invadida por vasos sanguíneos com conseqüente neovascularização, em seguida, por uma população proliferante de células mesenquimatosas indiferenciadas. A seguir, diferenciavam-se em condroblastos que formavam uma cartilagem hialina. A cartilagem sofria mineralização e era invadida por vasos sanguíneos e substituída por tecido ósseo produzido por diferenciados a partir de células mesenquimatosas. Os eventos celulares que ocorrem durante a osteogênese ectópica foram posteriormente estudados por REDDI; ANDERSON (1976)⁵⁵.

URIST et al.^{77,78} (1979 e 1983) isolaram e descreveram o primeiro fator de crescimento e diferenciação ósseo. Estes autores após em estudos anteriores observarem que fragmentos de osso

desmineralizado alógeno, implantados em sítios subcutâneos e/ou intramusculares de cobaias induziam a formação de tecido ósseo e atribuírem este achado a um fator osteoindutor ativo presente na matriz óssea, conseguiram isolar de osso bovino este fator que designaram de proteína morfogenética do osso (bone morphogenetic protein [BMP]). SAMPATH et al.⁶², 1987 e LUYTEN et al.⁴³, 1989 também isolaram um fator osteoindutor ao qual chamaram de osteogenina.

Os materiais alógenos são osteoindutores, portanto, capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando o crescimento ósseo ou mesmo formando osso onde não era esperado (TAGA, 1996)⁶⁴.

Alguns estudos foram realizados utilizando material alógeno na indução ectópica de osso com estimulação do flúor.

MOHR; KRAGSTRUP⁴⁵ (1991) induziram formação ectópica de osso em 14 ratos que receberam água de beber com 100 ppm de flúor por 14 e 20 dias, concluindo que o flúor induz alterações quantitativas na formação de osso ectópico.

BROULÍK⁵ (1996), avaliou a formação de osso ectópico em ratos que receberam água de beber nas concentrações de 19, 114 e 152 ppm de flúor por um período de 30 dias e observou inibição na formação e mineralização óssea nas maiores concentrações de flúor.

A dose ideal de flúor ainda é um dos motivos de discussão entre os autores nos diferentes modelos de estudo, embora tenham mostrado que em concentrações muito altas o flúor pode prejudicar a formação e a mineralização óssea (HILLIER, 1996)²⁹.

Este trabalho foi proposto com base em evidências na literatura sobre a influência do flúor na mineralização óssea. Considerando as dificuldades na obtenção de uma dose "ideal" de

flúor no tratamento de doenças ósseas, partimos do princípio de que em doses elevadas (mais de 100 ppm) o flúor seria prejudicial ao tecido ósseo e optamos por utilizar doses inferiores a esta e analisar sua influência sobre o tecido ósseo. Para isto utilizamos o modelo de osteoindução ectópica proposto por URIST⁷⁵ (1965) implantando osso alógeno desmineralizado no músculo de ratos jovens e velhos que ingeriram concentrações de flúor diferentes na água de beber desde o desmame.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de várias concentrações de flúor na água de beber, na indução ectópica de osso em ratos jovens e velhos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a concentração de flúor no plasma de ratos jovens e velhos, submetidos a diferentes concentrações de flúor;
- Avaliar a concentração de flúor na superfície do fêmur de ratos jovens e velhos, submetidos a diferentes concentrações de flúor;
- Avaliar a concentração de flúor no fêmur de ratos jovens e velhos, submetidos a diferentes concentrações de flúor;
- Correlacionar a concentração de flúor encontrada no plasma de ratos jovens e velhos, com aquela encontrada na superfície do fêmur e no fêmur dos animais;
- Analisar histomorfométrica e radiograficamente a formação ectópica de osso em ratos jovens e velhos, submetidos a diferentes concentrações de flúor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e tratamento dos animais

Os animais deste estudo foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética em Animais (Proc. nº 007/2003), com 21 dias de vida (pós-desmame), onde permaneceram em caixas plásticas em grupos de 5 durante todo o período experimental.

Foram utilizados 80 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, divididos aleatoriamente em 2 grupos de 40. Os 40 animais do grupo 1 foram submetidos à cirurgia após aproximadamente 60 dias de nascimento e os 40 do grupo 2, após 335 dias, a fim de avaliar o potencial indutor do flúor sobre animais jovens e velhos. Ambos os grupos foram subdivididos em 4 subgrupos, contendo 10 animais cada, que diferiram com respeito às concentrações de flúor (NaF) presente na água de beber, a saber :

Subgrupo I: os ratos receberam, desde o desmame, água deionizada.

Subgrupo II: os ratos receberam, desde o desmame, água com 5 ppm F.

Subgrupo III: os ratos receberam, desde o desmame, água com 15 ppm F.

Subgrupo IV: os ratos receberam, desde o desmame, água com 50 ppm F.

Estas concentrações de flúor na água foram escolhidas pelo fato de se estimar que causem níveis plasmáticos de flúor equivalentes aos medidos em humanos que consomem água fluoretada contendo 0, 1, 3 e 10 ppm, respectivamente (DUNIPACE et al. 1995)¹³. Os animais receberam ainda ração da marca Purina, a qual teve o seu teor de flúor em torno de 40 µg/g.

Periodicamente, o consumo de água foi avaliado através de proveta graduada, para posterior cálculo da quantidade de flúor ingerida a partir da água (mg/kg peso corporal/dia).

Em adição, 40 animais foram utilizados como doadores, utilizados para obtenção da matriz óssea desmineralizada quando estavam com 90 dias de vida.

4.2 Obtenção da matriz óssea desmineralizada

Foram coletados os fêmures dos membros posteriores dos animais doadores. Os ossos foram processados segundo a técnica de URIST; MIKULSKI; BOYD⁷⁶ (1975) para a obtenção da matriz óssea desmineralizada em blocos, seguindo o seguinte protocolo:

- Os fêmures foram cuidadosamente retirados, limpos e armazenados sob refrigeração (-20°C).
- Descalcificados em solução de ácido clorídrico a 0,6 M com controle a cada 4 horas através de imagens radiográficas (até observar a total descalcificação do tecido).
- Neutralizados em solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%).
- Armazenados por um período de até 3 dias em solução de etanol a 70%.

4.3 Procedimentos cirúrgicos para implantação da matriz óssea desmineralizada alógena

A cirurgia foi realizada nos animais do 1º e 2º grupo sob anestesia geral intraperitoneal, com cloridrato de quetamina injetável com nome comercial de Dopalen (AgribRANDS do BRASIL LTDA) e cloridrato de xilazina injetável com nome comercial de Anasedan (AgribRANDS do BRASIL LTDA). A partir do momento em que os animais perderam os reflexos foi realizada a tricotomia da coxa direita do animal com auxílio de uma lâmina de barbear. Após assepsia vigorosa com iodoform alcoólico, foi feita, com lâmina de bisturi nº 11, uma incisão de 1 cm no tegumento que reveste a coxa do animal. Em seguida, foi feita a divulsão do epimísio, que separa dois feixes musculares, formando uma loja na qual foi implantado um segmento de 1 cm de comprimento de matriz óssea desmineralizada alo gênica previamente embebida com sangue do próprio animal, obtido através de punção cardíaca. Os retalhos foram recolocados em sua posição e suturados, primeiramente as fáscias musculares com linha reabsorvível de polyvicryl nº 5-0 (Ethicon - Johnson & Johnson) e em seguida o tegumento com linha de seda preta nº 4-0 (Ethicon - Johnson & Johnson), através de suturas descontínuas. Após o término da sutura, uma gaze embebida em solução de álcool iodado foi passada sobre a área.

Concluídos os procedimentos cirúrgicos, os animais permaneceram isolados em caixas plásticas por 5 dias.

4.4 Eutanásia dos animais

Os animais foram mortos ao término do período de 28 dias após a cirurgia de implantação. Os animais foram anestesiados e a partir do momento em que perderam os reflexos foi feita punção cardíaca, sendo o sangue (3-4 mL) coletado em seringas plásticas e transferido para tubos plásticos (tipo Eppendorff) heparinizados (10 µL heparina contendo 0,184 ppm flúor) e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (centrífuga Jouan, modelo A 14), para obtenção de plasma (1-2 mL), posteriormente analisado para o flúor.

Em seguida, as regiões onde foram realizadas as implantações foram radiografadas, utilizando filme radiográfico oclusal 57 mm x 76 mm (IO-41 Eastman Kodak Company). Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado um aparelho de raios X odontológico com 70 kVp e 10 mAs, com filtragem total equivalente a 2 mm de alumínio. O cilindro localizador foi posicionado de maneira que o feixe de raios X central incidisse perpendicularmente ao filme, com uma distância padronizada de 40 cm (distância foco-filme) com uma exposição de 0,4 segundos. Após a exposição dos filmes os mesmos foram processados pelo método de tempo e temperatura no laboratório da Clínica de Radiologia do Departamento de Estomatologia da FOB-USP.

Após a obtenção das radiografias, os implantes, juntamente com o tecido muscular que os reveste foram coletados, e em seguida, submetidos ao processo de fixação em formol tamponado a 10% durante uma semana. Os fêmures direitos também foram removidos para análise de flúor no osso.

4.5 Procedimentos histológicos

Após o processo de fixação foi realizado o tratamento das peças em solução desmineralizante à base de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44% de Hidróxido de sódio), por um período aproximado de 60 dias com trocas semanais da solução desmineralizante. Foi feito um controle através de imagens radiográficas para certificação da desmineralização das peças.

Em seguida, as peças foram submetidas ao seguinte procedimento histológico:

- a) lavagem em água destilada por 24 horas;
- b) banho em etanol 70% até o dia seguinte;
- c) início do processo de desidratação em etanol a 80% por 1 hora;
- d) banho de uma hora em etanol a 90%;
- e) banho de uma hora em etanol a 95%;
- f) dois banhos de uma hora em etanol a 100%;
- g) banho de etanol a 100% durante 24 horas;
- h) início do processo de diafanização xilol histológico (Merck) por 30 minutos;
- i) banho de uma hora em xilol;
- j) banho em Histosec (parafina + resina sintética - Laboratório Merck) liqüefeita em estufa a 60°C por uma hora;
- l) banho em Histosec liqüefeita em estufa a 60°C por vinte horas;
- m) inclusão em Histosec liqüefeita;

Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica RM2045 e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968)⁴².

4.6 Análise Morfométrica

De cada peça histológica foram obtidas 2 lâminas contendo 6 cortes semi-seriados cada uma. De cada lâmina foi selecionado 1 corte histológico e foi contado 25 campos histológicos de cada um, totalizando uma contagem de 50 campos de cada peça. Para esta contagem, utilizamos um microscópio binocular AXIOLAB-ZEISS associado a ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede composto de 10 linhas paralelas e 100 pontos (CARL ZEISS-4740680000000-Netzmikrometer 12,5x).

Para a escolha dos 25 campos microscópicos por corte, utilizamos um esquema de casualização sistemática segundo as indicações de WEIBEL⁷⁹ (1969). Salientamos que nesse esquema os campos microscópicos foram escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico fossem representadas. A imagem do graticulo foi superposta sucessivamente aos 25 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática e foram anotados os números de pontos (P_i) que caíram sobre cada constituinte (i) e sobre a loja cirúrgica inteira (P). Calculamos a densidade de volume de cada constituinte (V_{vi}), através da fórmula: $V_{vi} = P_i/P$. Os constituintes que contamos foram: Tecido Conjuntivo, Tecido Ósseo, Tecido Mielóide, e Matriz Óssea Desmineralizada.

4.7 Análise de flúor no plasma

A análise de flúor foi feita após difusão facilitada por HMDS (hexametil-disiloxano), pelo método de TAVES⁶⁵ (1968), como modificado por WHITFORD⁸³ (1996). Entretanto, por se tratar o plasma de um fluido biológico, contendo, portanto CO₂, foi feita uma pré-difusão para se eliminar o CO₂. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada numa placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado em hexametildisiloxano (HMDS) em um volume correspondente a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi 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 min 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 TAVES⁶⁵ (1968) e modificado por WHITFORD⁸³ (1996). Na tampa das placas, foram colocados 50 µL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 4 gotas. As placas foram então fechadas e vedadas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa 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 contém 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.

Todas as análises, sem exceção, foram feitas, no mínimo em duplicata e foi calculada a porcentagem de concordância entre as mesmas, a fim de se preservar a precisão da análise. A repetibilidade média das análises foi de 92 %.

Validação da análise:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o flúor da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do flúor pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de flúor acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de flúor plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 µmol/L (0,0095-0,019 µg/mL), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de flúor de 0,0095-0,019 µg, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo.

As soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F⁻ (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma a serem analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda

quando a metade das amostras já ter sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV), foram convertidas para μg de flúor, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de flúor medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de flúor que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o flúor nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Foi feita também uma seqüência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV foram as mesmas tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

4.8 Análise de flúor na superfície do fêmur

Os fêmures de todos os animais foram desidratados em estufa por 24 h a 90°. Em seguida eles foram seccionados transversalmente, com disco de Carborundum, sendo obtido da região diafisária de cada fêmur uma amostra de aproximadamente

5,0 mm. As extremidades foram fechadas com cera utilidade e uma área circular (4,52 mm²) foi isolada com adesivo. Todo o osso foi pincelado com esmalte de unhas, cor vermelha para contraste, de tal modo que removido o adesivo à área a ser analisada ficou exposta. Uma camada óssea foi removida em 0,25 mL de HCl 0,5 M durante agitação por 15 segundos e neutralizada com 0,25 mL de TISAB II (20 g NaOH/L). Esta solução foi submetida à análise de flúor e de fósforo.

4.8.1 Análise de flúor

Para a análise de flúor foi utilizado eletrodo específico para íon flúor (Orion 96-09) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-940), previamente calibrados com padrões de flúor contendo 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 µg flúor/ mL. As leituras, obtidas em mV, foram convertidas para µg de flúor, através de uma planilha de dados (Microsoft Excel). As soluções-padrão, empregadas na construção da curva de calibração, foram obtidas a partir de diluição seriada de uma solução-estoque, contendo 100 ppm flúor (Orion# 940907). Todas as curvas de calibração foram feitas em triplicata, sendo que somente curvas com coeficiente de correlação (r) $\geq 0,999$ foram aceitas. A repetibilidade média das análises, baseada nas amostras em duplicata, foi de 91%.

4.8.2 Análise de fósforo

A dosagem de P foi realizada conforme descrito por FISKE; SUBBAROW²² (1925), empregando-se os seguintes reagentes:

- Reativo Redutor: Ácido alfa amino naftol sulfônico (AANS): 0,2 g + Sulfeto de sódio: 1,2 g + Dissulfito de sódio: 1,2 g.

A mistura acima foi triturada em gral e armazenada em frasco escuro. Na hora da análise, cada 0,025 g da mistura foi dissolvida em 1,0 mL de água deionizada.

- Ácido Molibdico: Molibdato de amônio: 6,25 g + Ácido sulfúrico concentrado: 27,0 mL
- Padrão contendo 3 mg% P

A reação foi feita de acordo com a tabela 1

TABELA 1 - Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBBAROW²² (1925)

	Blank	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Amostra
Água deionizada	2,3 mL	2,25 mL	2,275 mL	2,2 mL	2,1 mL	1,9 mL	2,2 mL
Padrão P 3 mg%	-	0,025 mL	0,05 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,4mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	0,1 mL
Ácido molibídico	0,5 mL em todos, agitar e esperar 10 minutos						
Reativo redutor	0,2 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler a 660 nm						
µg P	0	0,75	1,5	3	6	12	-

Seguindo a tabela 1, inicialmente foi colocada água deionizada nos tubos de ensaio. A seguir foram colocados, em duplicatas, os padrões de P e as amostras. Então foram colocados 0,5 mL de ácido molibdico em todos os tubos, feita agitação e esperou-se 10 min. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição de 0,2 mL de reativo redutor. Após 20 min da colocação do reativo redutor procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (Cary 50) a 660

nm de absorbância. Todas as análises foram feitas em duplicata. A repetibilidade média das análises foi de 98 %.

Para se calcular a quantidade de osso removida pelo ataque ácido assumiu-se que no osso há 13,5% de fósforo, semelhante à dentina. Deste modo a concentração de flúor na superfície óssea pode também ser expressa em ppm ($\mu\text{g F/g}$ de osso).

4.9 Análise de flúor no fêmur

Após a análise da superfície óssea, foi removido o esmalte dos ossos, eles foram pesados e levados para calcinação em um forno tipo mufla a 600°C *overnight*. As cinzas foram pesadas e pulverizadas com pistilo. Após virarem pó, foram pesadas alíquotas de 4-5 mg para análise do flúor pelo método de difusão facilitada por HMDS, conforme descrito para o plasma (item 4.7), exceto pela pré-difusão e pelos padrões empregados na realização da curva de calibração (1,9; 3,8; 19 e $38 \mu\text{g F}$). A repetibilidade média das análises, baseada nas amostras em duplicata, foi de 94 %.

4.10 Análise estatística

Todos os dados foram checados com relação à normalidade e homogeneidade. A partir daí, os testes estatísticos apropriados foram empregados.

Todas as amostras do estudo foram identificadas apenas pelo número do animal, de forma que as análises foram conduzidas sem que se soubesse qual tratamento tinha sido realizado. O efeito da idade na concentração de flúor presente no plasma, fêmur e superfície do fêmur, para cada subgrupo (controle, 5, 15 ou 50 ppm flúor) isoladamente, foi analisado pelo teste *t* não pareado ($p < 0,05$).

A análise da influência da concentração de flúor presente na água de beber, na concentração de flúor encontrada no plasma, fêmur e superfície do fêmur foi feita pelo teste de Kruskall-Wallis, complementado pelo teste de Dunn para comparações múltiplas ($p < 0,05$). Os grupos de 90 dias e 365 dias foram comparados isoladamente.

A correlação entre a concentração de flúor presente no plasma e no fêmur, plasma e superfície do fêmur, e fêmur e superfície do fêmur, para os grupos de 90 dias e 365 dias, isoladamente, foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear ($p < 0,0001$).

Com relação aos parâmetros histológicos (matriz óssea desmineralizada, tecido ósseo neoformado, tecido mielóide e tecido conjuntivo), a influência de diferentes níveis de flúor presente na água sobre os mesmos, foi avaliada por ANOVA e teste de Bonferroni para comparações múltiplas ($p < 0,05$). As densidades de volume foram submetidas a análises estatísticas após transformação arco-seno dos dados originais. A análise foi feita isoladamente para os grupos de 90 dias e 365 dias. A comparação entre os grupos (90 dias e 365 dias), para cada subgrupo (controle, 5, 15 e 50 ppm), foi feita pelo teste *t* não pareado ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi aferida em gramas, utilizando-se uma balança de precisão. A primeira pesagem foi feita no início do experimento logo após o desmame dos animais e a segunda e última pesagem foi feita antes da eutanásia, como mostram as TABELAS 2 e 3.

TABELA 2 - Média e desvio padrão das massas corporais dos ratos (g) de 90 dias no início e final do experimento

<i>Período</i>	<i>controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
Início	92,91± 8,83	88,42 ± 5,82	85,52 ± 8,65	83,68 ± 6,97
Final	286,50±15,48	266,80±25,51	263,50±17,03	267,77±25,22

TABELA 3 - Média e desvio padrão das massas corporais dos ratos (g) de 365 dias no início e final do experimento

<i>Período</i>	<i>controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
Início	87,65 ± 5,56	91,48 ± 7,82	89,54 ± 9,63	84,56 ± 8,36
Final	401,42±52,95	433,50±27,79	425,10±49,27	404,60±39,37

O confronto estatístico dos dados de massa corporal entre os subgrupos nos grupos de 90 e 365 dias não demonstrou haver diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.2. Consumo de água

O consumo de água foi mensurado em mililitros, periodicamente, durante o período experimental de cada grupo. O método consistia em preencher os frascos de cada caixa com 400 mL de água e após aproximadamente 48 horas, eram medidas as sobras de cada frasco com uma proveta graduada e calculada a média de ingestão para cada animal. Para ter o controle de evaporação da água e perdas ao colocar o frasco na caixa, colocou-se em uma caixa vazia um frasco controle. A média de evaporação e perda de água por frasco foi de 20 mL. Conforme se pode observar nas TABELAS 4 e 5, o consumo de água foi similar para ambos os grupos e todos os subgrupos.

TABELA 4 – Média do consumo diário de água por animal, em mililitros, dos ratos de 90 dias e média e desvio padrão totais

<i>Período</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
outubro	30,00	26,00	27,00	29,00
novembro	26,00	27,00	29,60	30,80
dezembro	28,00	31,00	25,50	27,20
Média ± DP	28,00 ± 2,00	28,00 ± 2,00	27,36 ± 2,07	27,92 ± 2,92

TABELA 5 – Média do consumo diário de água por animal, em mililitros, dos ratos de 365 dias e média e desvio padrão totais

<i>Período</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
outubro	29,60	28,00	27,60	25,20
novembro	26,00	29,00	25,60	28,40
dezembro	29,40	27,20	28,00	27,20
fevereiro	26,00	24,80	26,40	26,00
maio	27,60	28,40	31,00	30,60
Média ± DP	27,72 ± 1,75	27,48 ± 1,63	27,72 ± 2,06	27,48 ± 2,12

5.3 Análises de flúor

A TABELA 6 e a FIGURA1 mostram a concentração média de flúor no plasma dos ratos em função da idade e da concentração de flúor na água de beber. Para ambos os grupos, houve um aumento significativo na concentração plasmática de flúor com o aumento na concentração de flúor na água ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas revelou diferença estatisticamente significativa para o subgrupo controle em relação aos de 15 ($p < 0,01$) e 50 ppm ($p < 0,001$), e entre os subgrupos de 5 e 50 ppm ($p < 0,001$) e 15 e 50 ppm ($p < 0,001$). O perfil foi o mesmo para os grupos de 90 dias e 365 dias.

Houve um aumento significativo na concentração plasmática de flúor com a idade apenas para o grupo controle. No grupo de 50 ppm houve uma diminuição na concentração de flúor no plasma com a idade, embora sem significância estatística.

TABELA 6 - Concentração média de flúor ($\pm$ DP) no plasma ($\mu\text{g/mL}$) de ratos em função da idade e da concentração de flúor na água de beber

<i>[F] na água de beber (ppm)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>50</i>
90 dias	0,025 $\pm$ 0,002aA	0,037 $\pm$ 0,007abA	0,057 $\pm$ 0,011bA	0,145 $\pm$ 0,029cA
365 dias	0,031 $\pm$ 0,003aB	0,045 $\pm$ 0,010abA	0,063 $\pm$ 0,016bA	0,118 $\pm$ 0,026cA

Valores na mesma linha seguidos por letras minúsculas diferentes possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores na mesma coluna com letra maiúscula diferente indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 1-Concentração média de flúor no plasma ($\mu\text{g/mL}$) de ratos de 90 e 365 dias nas diferentes concentrações de flúor na água de beber

A TABELA 7 e a FIGURA 2 mostram a concentração média de flúor na superfície do fêmur de ratos em função da idade e da concentração de flúor na água de beber. Para ambos os grupos, houve um aumento significativo na concentração de flúor com o aumento na concentração de flúor na água, para os grupos 90 dias (KW = 25749, $p < 0,0001$) e 365 dias (KW = 28825, $p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas revelou diferença estatisticamente significativa para o subgrupo controle em relação aos de 15 ($p < 0,05$) e 50 ppm ($p < 0,001$), e entre os grupos de 5 e 50 ppm ($p < 0,01$), para ambos os grupos (90 dias e 365 dias). Com relação à idade, houve uma tendência para um aumento na concentração de flúor na superfície óssea com o aumento da idade. No entanto, a diferença só foi estatisticamente significativa para o subgrupo de 15 ppm ($t = 2,444$, $p = 0,026$).

TABELA 7 - Concentração média de flúor ($\pm$ DP) na superfície do fêmur (μ g/g) de ratos e profundidade da camada de osso removida (μ m) em função da idade e da concentração de flúor na água de beber

<i>[F] na água de beber (ppm)</i>		<i>0</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>50</i>
90 dias	[F]	564 $\pm$ 122aA	961 $\pm$ 357abA	1415 $\pm$ 546bcA	3194 $\pm$ 502cA
	camada	(20,03 $\pm$ 9,18)	(17,10 $\pm$ 11,76)	(17,11 $\pm$ 8,63)	(18,07 $\pm$ 8,01)
365 dias	[F]	675 $\pm$ 120aA	1298 $\pm$ 426abA	2140 $\pm$ 681bcB	3870 $\pm$ 843cA
	camada	(25,56 $\pm$ 5,08)	(23,24 $\pm$ 12,16)	(28,64 $\pm$ 5,28)	(14,48 $\pm$ 9,87)

Valores na mesma linha seguidos por letras minúsculas diferentes possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores na mesma coluna com letra maiúscula diferente indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os valores entre parênteses indicam a profundidade da camada de osso removida

FIGURA 2 - Média da concentração de flúor na superfície do fêmur ($\mu\text{g/g}$) de ratos de 90 e 365 dias nas diferentes concentrações de flúor na água de beber

A TABELA 8 e a FIGURA 3 mostram a concentração média de flúor no fêmur de ratos em função da idade e da concentração de flúor na água de beber. Para ambos os grupos, houve um aumento significativo na concentração de flúor com o aumento na concentração de flúor na água, ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas revelou diferença estatisticamente significativa no grupo de 90 dias para o subgrupo controle em relação aos de 15 e 50 ppm ($p < 0,001$) para o subgrupo 5 ppm em relação aos de 15 e 50 ppm ($p < 0,001$) e entre os subgrupos de 15 e 50 ppm ($p < 0,001$). No grupo de 365 dias houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos controle em relação aos de 5 ($p < 0,05$), 15 ($p < 0,001$) e 50 ppm ($p < 0,001$), e entre os subgrupos de 5 e 50 ppm ($p < 0,01$) e de 15 e 50 ppm ($p < 0,01$). Com relação à idade, houve um aumento na concentração de flúor no fêmur com o aumento da idade em todos os subgrupos com diferença estatisticamente significativa.

TABELA 8 - Concentração média de flúor ($\pm$ DP) no fêmur ($\mu\text{g/g}$) de ratos em função da idade e da concentração de flúor na água de beber

<i>[F] na água de beber (ppm)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>50</i>
90 dias	207 $\pm$ 21aA	481 $\pm$ 76aA	1217 $\pm$ 188bA	2735 $\pm$ 355cA
365 dias	694 $\pm$ 152aB	1376 $\pm$ 583bB	1732 $\pm$ 564bB	4494 $\pm$ 343cB

Valores na mesma linha seguidos por letra minúscula diferente possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores na mesma coluna com letra maiúscula diferente indicam diferença estatística

FIGURA 3 - Média da concentração de flúor no fêmur ($\mu\text{g/g}$) de ratos de 90 e 365 dias nas diferentes concentrações de flúor na água de beber

As FIGURAS 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e a TABELA 9 mostram as correlações entre as concentrações de flúor presentes no plasma, na superfície do fêmur e no fêmur nos grupos de 90 e 365 dias. Houve correlação positiva entre a concentração de flúor no plasma e superfície do fêmur para os ratos de 90 dias ($r=0,89$) e 365 dias ($r=0,87$), entre a concentração de flúor presente no plasma e no fêmur para os ratos de 90 dias ($r=0,91$) e 365 dias ($r=0,82$) e entre a concentração de flúor presente no fêmur e na superfície do fêmur para os ratos de 90 dias ($r=0,92$) e 365 dias ($r=0,84$).

FIGURA 4 - Correlação entre a concentração de flúor presente no plasma e na superfície do fêmur, para o grupo de 90 dias.

FIGURA 5 - Correlação entre a concentração de flúor presente no plasma e na superfície do fêmur, para o grupo de 365 dias.

FIGURA 6 - Correlação entre a concentração de flúor presente no plasma e no fêmur, para o grupo de 90 dias.

FIGURA 7 - Correlação entre a concentração de flúor presente no plasma e no fêmur, para o grupo de 365 dias.

FIGURA 8 - Correlação entre a concentração de flúor presente no fêmur e na superfície do fêmur, para o grupo de 90 dias.

FIGURA 9 - Correlação entre a concentração de flúor presente no fêmur e na superfície do fêmur, para o grupo de 365 dias.

TABELA 9 - Correlação entre a concentração de flúor (ppm) no plasma, fêmur e na superfície do fêmur em ratos de 90 e 365 dias

<i>Idade (dias)</i>	<i>y</i>	<i>x</i>	<i>r (p)</i>	<i>Equação</i>
90	Fêmur	Plasma	0,91 (p<0,0001)	y = -52,31 + 18334,79.x
365	Fêmur	Plasma	0,82 (p<0,0001)	y = -102,78 + 33491,77.x
90	Superfície fêmur	Plasma	0,89 (p<0,0001)	y = 272,82 + 19176,52.x
365	Superfície fêmur	Plasma	0,87 (p<0,0001)	y = -22,14 + 31441,61.x
90	Superfície fêmur	Fêmur	0,92 (p<0,0001)	y = 386,76 + 0,99.x
365	Superfície fêmur	Fêmur	0,84 (p<0,0001)	y = 520,22 + 0,73.x

5.4 Análise Morfométrica

5.4.1 Densidade de volume

Os resultados obtidos de densidade de volume (%) dos componentes envolvidos no processo de reabsorção da matriz óssea desmineralizada e na formação óssea durante a osteogênese ectópica em músculo de ratos de 90 dias e 365 dias, encontram-se apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Com relação à matriz óssea desmineralizada (MOD), no grupo de 90 dias, houve uma diminuição da sua porcentagem para o

subgrupo de 5 ppm, e um aumento progressivo para os demais grupos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($F=12,6$ e $p<0,0001$), mas esta diferença só foi significativa para o subgrupo controle, comparado com o de 50 ppm, 5 e 50 ppm, e 5 e 15 ppm ($p<0,05$). Embora tenha havido uma redução na porcentagem de MOD no subgrupo de 5 ppm esta não foi estatisticamente significativa. No grupo de 365 dias, embora tenha havido um aumento na porcentagem de MOD para os grupos experimentais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($F=2,02$ e $p=0,1423$).

Quando analisado o tecido ósseo neoformado não houve diferença estatisticamente significativa no grupo de 90 dias embora tenha havido um ligeiro aumento para o subgrupo de 5 ppm ($F=3,16$ e $p=0,0438$). No grupo de 365 dias não houve diferença estatisticamente significativa ($F=3,21$ e $p=0,0439$) embora tenha havido diminuição no subgrupo de 5 ppm.

O tecido mielóide no grupo de 90 dias apresentou diferença estatisticamente significativa ($F=8,84$ e $p=0,0004$) entre os subgrupos de 5 e 50 ppm e de 5 e 15 ppm, havendo uma maior formação de tecido mielóide no grupo de 5 ppm, embora não tenha havido significância em relação ao controle. Para o grupo de 365 dias, embora tenha havido uma diminuição nos grupos experimentais em relação ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($F=3,12$ e $p=0,048$).

Com relação ao tecido conjuntivo não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos tanto no grupo de 90 dias ($F=1,17$ e $p=0,3434$) quanto no de 365 dias ($F=1,02$ e $p=0,4016$).

TABELA 10- Densidade de volume (%) dos componentes envolvidos no processo de reabsorção da matriz óssea desmineralizada e na formação óssea durante a osteogênese ectópica em músculo de ratos no grupo de 90 dias, nas diferentes concentrações de flúor

SUBGRUPO	<i>Matriz óssea desmineralizada (MOD)</i>	<i>Tecido ósseo neoformado</i>	<i>Tecido mielóide</i>	<i>Tecido conjuntivo</i>
Controle	33,62± 8,67ab	15,52 ± 2,93a	26,12± 9,74ab	24,61 ± 3,98a
5 ppm	24,35 ± 7,06a	17,05 ± 3,91a	38,32±10,08b	20,25 ± 5,36a
15 ppm	44,01± 10,96bd	12,27 ± 7,43a	20,12 ± 8,67a	23,57 ± 5,66a
50 ppm	49,88± 6,00cd	10,31 ± 3,63a	15,24 ± 5,32a	24,15 ± 4,74a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa (p>0,05).

TABELA 11- Densidade de volume (%) dos componentes envolvidos no processo de reabsorção da matriz óssea alogênica e na formação óssea durante a osteogênese ectópica em músculo de ratos no grupo de 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor

SUBGRUPO	<i>Matriz óssea desmineralizada (MOD)</i>	<i>Tecido ósseo neoformado</i>	<i>Tecido mielóide</i>	<i>Tecido conjuntivo</i>
Controle	41,33 ± 7,30a	13,56 ± 3,93a	26,20 ± 9,26a	18,88 ± 7,88a
5ppm	53,42± 14,36a	5,18 ± 4,68a	11,82± 11,57a	29,56± 12,62a
15ppm	55,82± 13,57a	9,50 ± 5,42a	13,61 ± 7,58a	21,08 ± 9,52a
50ppm	50,17 ± 6,79a	11,76 ± 4,31a	20,21 ± 9,08a	17,84 ± 4,78a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa (p>0,05).

FIGURA 10 - Densidade de volume (%) da matriz óssea, tecido ósseo, tecido mielóide e tecido conjuntivo após 28 dias de implantação do bloco de matriz óssea alogênica entre as fâscias musculares de ratos de 90 dias e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor.

As TABELAS 12, 13, 14 e 15 comparam os resultados obtidos de densidade de volume (%) de cada componente envolvido no processo de reabsorção da matriz óssea desmineralizada e na formação óssea, entre os grupos de 90 e 365 dias.

Com relação à matriz óssea desmineralizada (MOD) houve um aumento estatisticamente significativo com o aumento da idade no subgrupo de 5 ppm ($F=22,4$ e $p=0,0006$). Nos demais subgrupos, com exceção ao de 50 ppm houve uma tendência para aumentar com a idade.

Quando o tecido ósseo neoformado foi comparado entre as diferentes idades encontrou-se diferença estatisticamente significativa no subgrupo de 5 ppm ($F=22,6$ e $p=0,0006$). Nos demais subgrupos, com exceção ao de 50 ppm houve uma tendência para diminuir com a idade.

No tecido mielóide também houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 90 e 365 dias, no subgrupo de 5 ppm ($F=19,2$ e $p=0,0011$).

Com relação ao tecido conjuntivo houve diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo de 50 ppm nos demais subgrupos teve uma tendência a diminuir com a idade com exceção do subgrupo de 5 ppm.

TABELA 12 - Densidade de volume (%) da matriz óssea desmineralizada nos grupos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor

<i>GRUPO</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
90 dias	33,62± 8,67a	24,35 ± 7,06a	44,01± 10,96a	49,88± 6,00a
365 dias	41,33 ± 7,30a	53,42± 14,36b	55,82± 13,57a	50,17 ± 6,79a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

FIGURA 11 - Densidade de volume (%) da matriz óssea desmineralizada após 28 dias de implantação entre as fâscias musculares de ratos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor.

TABELA 13 – Densidade de volume (%) do tecido ósseo neoformado nos grupos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor

<i>GRUPO</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
90 dias	15,52 ± 2,93a	17,05 ± 3,91a	12,27 ± 7,43a	10,31 ± 3,63a
365 dias	13,56 ± 3,93a	5,18 ± 4,68 b	9,50 ± 5,42a	11,76 ± 4,31a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significante (p>0,05).

FIGURA 12 - Densidade de volume (%) do tecido ósseo neoformado após 28 dias de implantação do bloco de matriz óssea alogênica entre as fâscias musculares de ratos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor.

TABELA 14 – Densidade de volume (%) do tecido mielóide nos grupos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor

<i>GRUPO</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
90 dias	26,12± 9,74a	38,32±10,08a	20,12 ± 8,67a	15,24 ± 5,32a
365 dias	26,20 ± 9,26a	11,82± 11,57b	13,61 ± 7,58a	20,21 ± 9,08a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

FIGURA 13 - Densidade de volume (%) do tecido mielóide após 28 dias de implantação do bloco de matriz óssea alogênica entre as fâscias musculares de ratos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor.

TABELA 15 – Densidade de volume (%) do tecido conjuntivo nos grupos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor

<i>GRUPO</i>	<i>Controle</i>	<i>5 ppm</i>	<i>15 ppm</i>	<i>50 ppm</i>
90 dias	24,61 ± 3,98a	20,25 ± 5,36a	23,57 ± 5,66a	24,15 ± 4,74a
365 dias	18,88 ± 7,88a	29,56±12,62a	21,08 ± 9,52a	17,84 ± 4,78b

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significante ($p>0,05$).

FIGURA 14 - Densidade de volume (%) do tecido conjuntivo após 28 dias de implantação do bloco de matriz óssea alogênica entre as fâscias musculares de ratos de 90 e 365 dias, nas diferentes concentrações de flúor.

5.5 Análise radiográfica do implante

Em todos os grupos houve neoformação óssea que foi diagnosticada através da observação de uma área radiopaca paralela ao fêmur do animal. Nos subgrupos controle e 5 ppm do grupo de 90 dias a área radiopaca apresentava-se mais intensa, comparada aos demais subgrupos, e em todos os animais foi possível observá-la. Nos subgrupos de 5 ppm dos ratos de 365 dias e 15 e 50 ppm dos grupos de 90 e 365 dias houve vários animais onde não foi possível observar a presença de área radiopaca através da análise radiográfica. Os resultados radiográficos foram compatíveis aos histomorfométricos.

FIGURA 15 - Implante intramuscular alogênico em ratos de 90 dias do subgrupo controle. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta-se com áreas de reabsorção e formação de tecido ósseo (TO) e mielóide (TM), o canal medular apresenta-se preenchido por tecido conjuntivo (TC) (B). Formação óssea na superfície interna e externa da MOD (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 16 - Implante intramuscular alogênico em ratos de 90 dias do subgrupo de 5 ppm F. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta muitas áreas de reabsorção com formação de tecido ósseo (TO) e mielóide (TM), o canal medular apresenta preenchido por tecido conjuntivo (TC) (B). Áreas de reabsorção com formação de tecido ósseo e mielóide por toda MOD (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 17 - Implante intramuscular alogênico em ratos de 90 dias do subgrupo 15 ppm F. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta áreas de reabsorção e formação de tecido ósseo (TO) e mielóide (TM), o canal medular apresenta preenchido por tecido conjuntivo (TC) (B). Formação óssea na periferia da MOD e de tecido mielóide (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 18 - Implante intramuscular alogênico em ratos de 90 dias do subgrupo 50 ppm F. Observa-se uma pequena área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta áreas de reabsorção e formação de tecido ósseo (TO) e mielóide (TM), porém com grandes áreas sem reabsorção. O canal medular apresenta preenchido por tecido conjuntivo (TC) (B). MOD com pouca reabsorção(C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 19 - Implante intramuscular alógeno em ratos de 365 dias do subgrupo controle. Observa-se intensa área radiopaca no local do implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta áreas de reabsorção e formação de tecido ósseo (TO) e mielóide (TM), o canal medular apresenta preenchido por tecido mielóide, tecido ósseo e tecido conjuntivo (TC) (B). Área com intensa formação de tecido mielóide e ósseo (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 20 - Implante intramuscular alogênico em ratos de 365 dias do subgrupo 5 ppm F. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta-se com poucas áreas de reabsorção e o canal medular apresenta-se preenchido por tecido conjuntivo (TC) (B). Pequena área de formação óssea (TO) na superfície interna da MOD (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 21 - Implante intramuscular alógeno em ratos de 365 dias do subgrupo 15 ppm F. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta pequenas áreas de reabsorção, o canal medular apresenta preenchido por tecido conjuntivo (TC), tecido ósseo (TO) e tecido mielóide (B). Formação óssea e mielóide na periferia da MOD (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

FIGURA 22 - Implante intramuscular alogênico em ratos 365 dias no subgrupo 50 ppm F. Observa-se área radiopaca na área de implante (A). A matriz óssea desmineralizada (MOD) apresenta poucas áreas de reabsorção o canal medular apresenta preenchido por tecido ósseo (TO), tecido mielóide (TM) e tecido conjuntivo (TC) (B). Formação de tecido ósseo e mielóide no canal medular (C). Fotomicrografias com aumento de 4X (B) e 10X (C).

6 DISCUSSÃO

Vários pesquisadores comprovaram os efeitos do flúor sobre a estrutura óssea, sendo este um agente anabólico capaz de aumentar o número de osteoblastos proporcionando assim um aumento da massa óssea (FARLEY et al., 1983; LAU; BAYLINK, 1998; DURE-SMITH, 1991; CHAE et al., 1999)^{20,39,14,10}.

O que ainda não está esclarecido é em que dose o flúor é capaz de exercer sua função sem prejudicar a estrutura óssea. Este estudo foi conduzido baseado em estudos anteriores que relatam que o flúor em doses altas é prejudicial à estrutura óssea. A utilização das concentrações de flúor de 5, 15 e 50 ppm foi proposta por DUNIPACE et al.¹³, 1995. Os autores sugerem que o flúor presente na água de beber deve ser de quatro a cinco vezes maior para ratos, quando comparados com humanos para atingir as mesmas concentrações plasmáticas. As doses utilizadas nesta pesquisa corresponderiam às concentrações de flúor de 1, 3 e 10 ppm para humanos.

Segundo EKSTRAND¹⁷, 1978 a ingestão de 2 ppm de flúor na água de beber, leva a uma concentração plasmática de 0,5 a 2,1 μM em humanos. Em 1982, ANGMAR-MANSSON; WHITFORD¹ relataram que o flúor na água em concentração de 8 ppm atinge uma concentração plasmática de 2 μM em ratos. Em estudo posterior (1984) os mesmos autores encontraram que ratos precisam ingerir 10 ppm de flúor na água de beber para atingir concentrações plasmáticas de 3 μM . O modelo proposto por DUNIPACE et al.¹³, 1995 foi baseado nestes estudos.

A utilização do modelo de osteoindução ectópica foi baseada no artigo de BROULÍK⁵ (1996). O autor, entretanto utilizou doses de flúor mais altas e um período de osteoindução de 30 dias.

Aos 28 dias, segundo MORAES; MORAES⁴⁷ (1993) já existe uma grande quantidade de formação óssea e de tecido mielóide em ratos de grupo controle com implante intramuscular.

No presente estudo não houve diferença de peso entre os animais nas diferentes concentrações de flúor, tanto para o grupo de 90 dias quanto para o de 365 dias. TURNER et al.⁷¹ (1995) também não encontraram diferença no peso dos animais tratados com as mesmas doses de flúor que utilizamos. Também não encontramos diferença na ingestão de água nas diferentes concentrações de flúor. Desta forma, as doses utilizadas não alteraram a ingestão de água e nem o peso dos animais.

DUNIPACE et al.¹³ (1995) encontraram para ratos de 90 dias concentrações plasmáticas de 0,013; 0,026; 0,076; 0,194 µg F/mL para as concentrações na água de 0, 5, 15 e 50 ppm F, respectivamente, enquanto nós encontramos 0,025; 0,037; 0,057; 0,145 µg F/mL para 0, 5 15 e 50 ppm F. Quando comparamos os subgrupos de 0 e 5 ppm F encontramos uma concentração plasmática maior no nosso estudo em relação ao de DUNIPACE et al.¹³ (1995), porém, além da dose de flúor administrada na água os ratos de nosso estudo ingeriram ração contendo 40 µg F/g de flúor total (dados não mostrados). Estudos prévios realizados em nosso laboratório (BUZALAF et al., 2002)⁷ mostram que a quantidade média de flúor solúvel em HCl M presente na ração gira em torno de 25 µg F/g. Considerando-se que os ratos ingerem em média 18,7 g de ração por dia, o consumo desta ração incrementaria a ingestão diária de flúor em 0,467 mg, ou 1,73 e 1,14 mg F/kg peso para os grupos de 90 e 365 dias, respectivamente. Levando-se em consideração as Tabelas 2 e 3, que relatam o peso médio dos animais, e as Tabelas 4 e 5 que relatam o consumo médio de água, a ingestão média diária de F através da água para os subgrupos de 5, 15 e 50 ppm F foi de 0,53,

1,61, e 5,30 mg F/kg peso para o grupo de 90 dias e de 0,34, 1,02 e 3,40 mg F/kg peso para o grupo de 365 dias, respectivamente. Deste modo, o flúor presente na ração teve um grande impacto na ingestão diária total de flúor dos animais do nosso estudo, principalmente para os grupos de 0 e 5 ppm, já que no estudo de DUNIPACE et al.¹³ (1995) a ração utilizada tinha menos que 1,2 µg F/g.

A concentração de flúor no plasma dos grupos de 90 dias e de 365 dias não teve diferença estatisticamente significativa para a mesma concentração de F na água, exceto para o grupo controle (TABELA 6). Estes dados entram em contraste com os de PARKINS et al.⁵¹, 1974 e HANHIJARVI²⁶, 1981, que encontraram correlação positiva entre os níveis de flúor no plasma e a idade em estudos realizados em humanos. Este aumento na concentração plasmática de F com a idade em humanos pode ser explicado pela distribuição de estado estacionário ("steady-state") para o F entre o fluido extracelular e a camada de hidratação dos cristalitos ósseos (WHITFORD⁸³, 1996). A camada de hidratação dos cristalitos é contínua, ou pelo menos disponível, aos fluidos extracelulares. Presumivelmente, o F neste "pool" é rapidamente passível de trocas, podendo, deste modo, sofrer migração em qualquer uma das direções, dependendo das concentrações relativas no fluido extracelular e na camada de hidratação (WHITFORD, 1996)⁸³. Assim, havendo um aumento na concentração de F no osso com a idade, devido à contínua incorporação de F ao longo da vida, espera-se que haja um aumento também na concentração de F no plasma. Os nossos achados, entretanto, vão de encontro aos de DUNIPACE et al.¹³ (1995), que não encontraram diferença na concentração de flúor no plasma em ratos de diferentes idades. Talvez a diferença no padrão de remodelação óssea entre ratos e humanos possa explicar esta

diferença. Outro fato a ser considerado é que o “pool” passível de trocas está localizado na superfície óssea, e para a mesma, embora tenha havido uma tendência de aumento na concentração de F com a idade no nosso estudo, o mesmo só foi significativo para a concentração de 15 ppm F.

Com relação à concentração de flúor presente no fêmur, tanto para a superfície, quanto para o osso total, houve uma relação linear significativa em relação à concentração plasmática de flúor, em ambas as idades (FIGURAS 4 a 7). Esta correlação positiva também ocorre para ratos submetidos à exposição aguda ao flúor (BUZALAF et al., 2004)⁸, corrobora a distribuição de estado estacionário (“steady-state”) para o flúor entre o fluido extracelular e a camada de hidratação dos cristaltos ósseos, conforme descrito acima. Assim, o plasma pode ser considerado um biomarcador da concentração óssea de flúor em ratos jovens e velhos. Esta afirmação provavelmente deve ser válida para humanos, mas são necessários mais estudos para que se possa afirmar isto com certeza. ERICSSON; GYDELL; HAMMARSKJOLD¹⁸ (1973) relataram haver correlação entre a concentração de flúor no plasma com a dos ossos em pesquisa realizada em humanos. Porém HELLSTROM²⁸ (1976) encontraram correlação negativa entre a quantidade de flúor no plasma e nos ossos em um estudo realizado em crianças.

Também houve uma correlação significativa entre a concentração de flúor presente na superfície do fêmur e no fêmur (FIGURAS 8 e 9). Isto era esperado, devido ao padrão de ingestão crônica de flúor pelos animais. Tem sido proposto que a incorporação de flúor pelo osso ocorre em estágios (NEUMAN; NEUMAN, 1958)⁴⁹. O primeiro envolve a migração do flúor para a camada de hidratação dos cristaltos ósseos, que é contínua, ou pelo menos disponível para o fluido extracelular. O flúor neste “pool”,

como foi anteriormente descrito pode ser rapidamente trocado, podendo sofrer migração em qualquer direção, dependendo das concentrações relativas no fluido extracelular e camada de hidratação (WHITFORD, 1989)⁸¹. Estágios posteriores envolvem a associação do flúor com ou sua incorporação à fluorhidroxiapatita e finalmente à estrutura da hidroxiapatita. A apatita fluoretada retorna aos fluidos corporais circulantes como resultado do processo de reabsorção óssea a longo termo.

A concentração de flúor presente no fêmur apresentou um aumento com a dose e com a idade. Estes dados estão de acordo com DUNIPACE, et al.¹³ 1995, e indicam que o flúor continua se acumulando nos ossos com o tempo (HEFTI; MARTHALER, 1981)²⁷. No entanto, DUNIPACE et al.¹³ (1995) relataram que para os animais tratados com 50 ppm de F, o conteúdo de flúor nos tecidos mineralizados atingia um plateau após 6 meses de tratamento, sugerindo que os reservatórios para deposição de flúor estavam se tornando saturados. Além disto, os ossos de ratos não sofrem remodelação, de forma que a incorporação de flúor ocorre predominantemente durante o crescimento (TURNER et al., 1995)⁷¹.

No presente estudo, a morfologia óssea, bem como sua resistência não foram avaliados, mas TURNER et al.⁷¹ (1995) relataram que a resistência do fêmur não foi significantemente reduzida em ratos tratados por 3 ou 6 meses com 0, 5, 15 ou 50 ppm F. Entranto, a resistência foi significantemente reduzida em ratos tratados por 12 ou 18 meses com 50 ppm F. Extrapolação a partir de equações de regressão permitiram se estimar que os ratos mais velhos perderiam 36% da resistência femural se o conteúdo de flúor fosse aumentado de 1 a 10000 ppm, enquanto que os ratos mais jovens perderiam apenas 15%. Assim, a diminuição da resistência do tecido ósseo parece ser devida aos efeitos combinados da ingestão de flúor e

idade e não está associada com uma diminuição na densidade óssea ou defeitos de mineralização. A ingestão de flúor estava associada com pequenos aumentos no volume de osso trabecular e espessura das trabéculas, mas estes efeitos não foram demonstrados consistentemente. Assim, o mecanismo pelo qual grandes quantidades de flúor afetam a resistência óssea mais severamente em animais mais velhos permanece desconhecido.

O flúor tem efeito anabólico sobre as células ósseas, sendo que dois mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar esta ação: inibição de uma fosfotirosina proteína fosfatase osteoblástica ou ativação de proteína quinase mediada pela proteína G (LAU; BAYLINK, 1998)³⁹. Estes mecanismos são afetados por algumas propriedades únicas do flúor: a dose mitogênica é muito baixa (micromolar), específica para as células ósseas, há requerimento de fatores de crescimento, a ação mitogênica é sensível a alterações nas concentrações de fosfato no meio, e o flúor atua primariamente sobre células osteoprogenitoras e/ou osteoblastos indiferenciados (KASSEN; MOSEKILDE; ERIKSEN, 1994; BELLOWS; HEERSCHKE; AUBIN, 1990; FARLEY et al., 1990)^{35,4,19}, que sintetizam fatores de crescimento em abundância (KASSEN; MOSEKILDE; ERIKSEN, 1994; KASPERK et al., 1995)^{35,34}. Tomando-se esta última propriedade do flúor como base, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito de várias concentrações de flúor na água de beber, na indução ectópica de osso em ratos jovens e velhos. De acordo com as propriedades acima relatadas, era esperado que os efeitos anabólicos do flúor fossem mais pronunciados nos ratos mais jovens.

A análise morfométrica do grupo de 90 dias (Figura 10, Tabela 10) mostrou uma quantidade significativamente maior de matriz óssea desmineralizada (MOD) para o grupo de 50 ppm F,

quando comparado com os grupos controle e 5 ppm F. Desta forma, o flúor na concentração de 50 ppm parece estar agindo de forma negativa no processo de reabsorção da MOD. Quando a mesma não é reabsorvida, não há liberação dos morfógenos ósseos nela contidos (REDDI; ANDERSON,1976)⁵⁴, necessários para o processo de neoformação óssea. Isto resultou, no subgrupo de 50 ppm F, numa menor neoformação óssea, e uma menor formação de tecido mielóide. Isto pode significar um atraso no processo de formação e reabsorção óssea, causada pela alta ingestão de flúor. EAMES; REDDI (1979)¹⁵ em um estudo com implante no subcutâneo de ratos que ingeriram 50 ppm F na água de beber por seis semanas, relataram haver um retardo no processo de formação óssea. Conforme relatado acima, enquanto que a estimativa de ingestão diária de flúor a partir da água para este grupo seria de 5,3 mg/Kg peso, a estimativa de ingestão diária de flúor a partir da ração seria de 1,73 mg/kg peso, totalizando 7,03 mg/Kg peso. Extrapolando-se estes valores para humanos, teríamos uma dose diária de ingestão de F de 1,41 mg/Kg peso, o que, para um adulto de aproximadamente 70 Kg, daria 98,4 mg F por dia.

Já no subgrupo de 5 ppm F observou-se uma maior reabsorção da MOD, porém sem diferença estatisticamente significativa quando comparada ao subgrupo controle. Esta reabsorção maior resultou numa maior formação de tecido ósseo e de tecido mielóide. Estes resultados sugerem que nesta concentração o flúor poderia estar agindo de forma positiva, auxiliando no processo de neoformação óssea. Quando se fala na dose de 5 ppm F na água administrada aos ratos neste estudo, não se pode deixar de mencionar a quantidade de flúor ingerida através da ração. Conforme relatado acima, enquanto que a estimativa de ingestão diária de flúor a partir da água para este grupo seria de 0,53

mg/Kg peso, a estimativa de ingestão diária de flúor a partir da ração seria de 1,73 mg/Kg peso, ou seja, aproximadamente 3 vezes maior. Desta forma, para ratos desta idade, a dose anabólica de flúor em relação à neoformação óssea seria de 2,26 mg/Kg peso, o que equivaleria a uma exposição a água contendo 20 ppm F, se a ração não fosse fluoretada. Extrapolando-se estes valores para humanos, teríamos uma dose diária de ingestão de F de 0,45 mg/Kg peso, o que, para um adulto de aproximadamente 70 Kg, daria 31,5 mg F por dia.

Para o subgrupo de 15 ppm, houve um comportamento similar em relação ao subgrupo de 50 ppm, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A dose diária de flúor ingerida a partir da água para este subgrupo seria de 1,61 mg/Kg peso, e através da dieta, 1,73 mg/Kg peso, totalizando 3,34 mg/Kg peso para os ratos de 90 dias, o que equivaleria a uma exposição à água contendo 30 ppm F, se a ração não fosse fluoretada. Extrapolando-se estes valores para humanos, teríamos uma dose diária de ingestão de F de 0,67 mg/Kg peso, o que, para um adulto de aproximadamente 70 Kg, daria 46,8 mg F por dia.

Não há consenso na literatura acerca da melhor dose a ser empregada no tratamento da osteoporose em humanos. Estudos mostram uma variação de 10 a 200 mg de fluoreto de sódio por dia (RIGGS et al., 1990; KLEEREKOPER; BALENA, 1991)^{58,37}. KLEEREKOPER; BALENA³⁷, 1991 relatam ainda que em doses abaixo de 40 mg por dia não há efeito consistente do flúor, enquanto que em doses acima de 80 mg por dia, o flúor pode prejudicar a mineralização óssea. FARRERONS et al.²¹ (1997) concluíram que o fluoreto de sódio na dose de 25 mg por dia teria um efeito protetor na incidência de fraturas, enquanto que RIGGS et al.⁵⁸ (1990) relataram que o uso de 75 mg por

dia de fluoreto de sódio aumenta a densidade do osso trabecular, mas diminui a densidade de osso cortical, aumentando, assim, a fragilidade esquelética. É muito difícil e limitada uma comparação dos dados obtidos no presente estudo realizado com ratos, com a condição clínica em humanos. Neste estudo, a ingestão diária de 2,26 mg F/Kg aumentou a formação ectópica de osso em ratos jovens (o que poderia ser extrapolado para uma dose diária em torno de 30 mg F em humanos adultos), enquanto que a dose de 7,03 mg F/Kg (em torno de 100 mg para humanos adultos) retardou o processo. A dose intermediária, que levou a uma ingestão de 3,34 mg F/Kg em ratos jovens (em torno de 50 mg em humanos adultos) teve um comportamento similar à dose mais elevada, mas não estatisticamente significativa em relação ao controle. Convém ressaltar que estes dados foram obtidos para ratos jovens, que teriam um maior número de células osteoprogenitoras e/ou osteoblastos indiferenciados, que são sensíveis aos efeitos mitogênicos do flúor.

Já no grupo de 365 dias (FIGURA 10, TABELA 11) para todas as concentrações de F na água, bem como para o grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa no processo de reabsorção da MOD, quantidade de tecido ósseo e tecido mielóide formados, apesar de o grupo controle ter apresentado um comportamento ligeiramente mais favorável (menos MOD e mais tecido ósseo e mielóide). O menor efeito do flúor na indução da formação óssea para este grupo, quando comparado com o de ratos jovens, já era esperado, devido ao menor número de células osteoprogenitoras e/ou osteoblastos indiferenciados em animais velhos, bem como em consequência do metabolismo mais lento. Quando se comparam os grupos de 90 e 365 dias (TABELAS 12, 13 e 14), só houve diferença estatisticamente significativa, com uma menor quantidade de MOD e maior quantidade de tecido ósseo e

mielóide, para o subgrupo de 5 ppm F, devido ao efeito anabólico observado para os ratos jovens.

Os resultados radiográficos corroboraram as análises morfométricas.

Um problema do presente trabalho foi o fato de a ração empregada no estudo ter uma alta concentração de flúor, chegando a fornecer uma dose diária de flúor três vezes maior que aquela correspondente à água com menor concentração de flúor (5 ppm). A contaminação da ração com flúor já vem sendo descrita em outros trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (BUZALAF et al., 2002, 2004)^{7,8}. No Brasil, não há nenhuma marca comercial de ração com baixos teores de flúor. Para se evitar este viés, duas alternativas seriam possíveis: compra de uma ração purificada, de baixo teor de flúor (AIN-93) ou preparo desta ração. A primeira alternativa encareceria sobremaneira o trabalho, devido à necessidade de importação da ração, que tem um alto custo. O preparo desta ração já foi realizado anteriormente em nosso laboratório, tendo resultado numa formulação com uma concentração de flúor em torno de 3,5 µg/g. No entanto, este preparo é difícil, e o custo, apesar de menor quando comparado ao da ração importada, também é elevado para estudos de design longitudinal, como é o caso deste. Uma vez que os melhores resultados obtidos em termos de neoformação óssea ocorreram para o grupo que recebeu 5 ppm F na água, existe a possibilidade de que se houvesse sido empregada uma ração de baixo teor de flúor, poderiam ter sido observados efeitos anabólicos maiores para esta concentração de flúor na água, ou mesmo para a concentração de 15 ppm F. De qualquer forma, a relevância clínica destes resultados é limitada, na medida em que os mesmos só foram obtidos para animais jovens, e a maior necessidade do benefício dos efeitos

anabólicos do flúor em relação ao tecido ósseo se faz sentir na população mais velha, alvo da osteoporose. Desta forma, novos estudos deveriam ser conduzidos de forma a se avaliar as bases moleculares do mecanismo de ação e o uso clínico do flúor para o tratamento da osteoporose.

7 CONCLUSÕES

De acordo com o protocolo experimental do presente estudo pode-se concluir que:

- Houve um aumento significativo na concentração de flúor no plasma dos ratos em função da concentração de flúor na água de beber, tanto para os ratos jovens quanto para os ratos velhos. Também houve uma tendência para aumento na concentração plasmática de flúor em função da idade, embora só tenha havido significância para o grupo controle.
- Houve um aumento na concentração de flúor encontrada na superfície do fêmur com o aumento da concentração de flúor na água de beber, tanto para os ratos jovens quanto para os ratos velhos. Este aumento só foi estatisticamente significativo para os subgrupos de 15 e 50 ppm F em relação ao controle, e para o subgrupo de 50 ppm F em relação ao de 5 ppm F. Houve ainda uma tendência para um aumento na concentração de flúor em relação à idade, embora a diferença só tenha sido estatisticamente significativa para o subgrupo de 15 ppm F.
- Houve um aumento na concentração de flúor presente no fêmur com o aumento da concentração de flúor na água de beber. Para o subgrupo de 90 dias, só não houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao de 5 ppm F, enquanto que para o subgrupo de 365

dias só não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de 5 e 15 ppm F.

- Foi observada uma correlação significativa entre a concentração de flúor presente no plasma e a presente na superfície do fêmur, bem como entre plasma e fêmur, e superfície do fêmur e fêmur, tanto para os ratos jovens quanto para os ratos velhos.
- A análise morfométrica revelou uma maior formação óssea para os ratos jovens, que receberam 5 ppm F na água de beber, embora não tenha havido significância, enquanto houve um prejuízo significativo na formação óssea para aqueles que receberam 50 ppm F. Para os ratos velhos, não houve diferença significativa entre os subgrupos. As observações radiológicas confirmaram os achados morfométricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ANGMAR-MANSSON, B.; WHITFORD, G.M. Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat. **Caries Res**, v. 16, p.334-9, 1982.
2. ANGMAR-MANSSON, B.; WHITFORD, G.M. Enamel fluorosis related to plasma F in the rat. **Caries Res**, v.18, p.25-32, 1984.
3. BAYLINK, D. J. et al. Monofluorophosphate physiology: The effects of fluoride on bone. **Caries Res**, v.17, suppl. 1, p.56-76, 1983.
4. BELLOWS, C. G.; HEERSCHE, J. N. M.; AUBIN, J. E. The effects of fluoride on osteoblast progenitors *in vitro*. **J Bone Miner Res**, v.5 (suppl 1), p. 1S101-5, 1990.
5. BROULÍK, P.D. The effects of various fluoride concentrations on bone formation in intramuscular implants of bone matrix in mice. **Physiol Res**, n. 45, p. 449-51, 1996.
6. BURGNER, D.; BONJOUR, J.P.; CAVERZASIO, J. Fluoride increases tyrosine kinase activity in osteoblast-like cells: Regulatory role for the stimulation of cell proliferation and Pi transport across the plasm membrane. **J Bone Miner Res**, v. 10,p. 167-171, 1995.
7. BUZALAF, M.A.R et al. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. **Fluoride**, v. 9, p. 185-92, 2002.
8. BUZALAF, M.A.R. et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. **J Analyt Toxicol**, v. 28, p. 249-52, 2004.
9. CAVERZASIO, J.; PALMER, G.; BONJOUR, J. P. Fluoride: Mode of

*Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanados do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- Action. **Bone**, v.22, n. 6, p. 585-9, 1998
10. CHAE, H. J. et al. Mechanism of mitogenic effect of fluoride on fetal rat osteoblastic cells: evidence for Shc, Grb2 and p-CREB-dependent pathways. **Res Commun Mol Pathol and Pharm**, v. 105, n.3 p.185-199, 1999
 11. DANIELSON, C. et al. Hip fractures and fluoridation in Utah's elderly population. **J Am Med Assoc**, v. 268, p. 746-8, 1992.
 12. DEMOS, L. L. et al. Water fluoridation, osteoporosis, fractures – recent developments. **Austr Dent J**, v. 46, n.2, p.80-7, 2001
 13. DUNIPACE, A. J. et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **J Dent Res**, v. 74, n. 1, p. 358-68, Jan.1995.
 14. DURE-SMITH, B.A. et al. Fluoride therapy for osteoporosis: A review of dose response, duration of treatment, and skeletal sites of action. **Calcif Tissue Int**, v.49 suppl, p. S64-7, 1991.
 15. EANES, E. D.; REDDI, A.H. The effect of fluoride on bone mineral apatite. **Metab Bone Dis Rel Res**, v.2, p. 3-10, 1979.
 16. EINHORN, T.A. et al. Incorporation of sodium fluoride into cortical bone does not impair the mechanical properties of the appendicular skeleton in rats. **Calcif Tissue Int**, v.51, p.127-31, 1992.
 17. EKSTRAND, J. Relationships between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. **Caries Res**, v. 12, p.123-27, 1978.
 18. ERICSSON, Y.; GYDELL, K.; HAMMARSKJOLD, T. Blood plasma fluoride: an indicator of skeletal fluoride content. **J Int Res Commun**, v.1, p. 33, 1973.
 19. FARLEY, J. R. et al. Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells: determinants of the response *in vitro*. **J Bone Miner Res**, v.5 (suppl 1), p. S107-13, 1990.

20. FARLEY, J. R.; WERGEDAL, J. R.; BAYLINK, D. J. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. **Science**, v.222, p. 330-2, 1983.
21. FARRERONS, J. et al. Sodium fluoride treatment is a major protector against vertebral and nonvertebral fractures when compared with other common treatment of osteoporosis: a longitudinal, observational study. **Calcif Tissue Int**, v. 60, p. 250-54, 1997.
22. FISKE, C. H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem**, v. 66, p.375-400, 1925.
23. FRATZL, P. et al. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: a small-angle X-ray-scattering study. **J Bone Miner Res**, n.9, p.1541-9, 1994.
24. GRYNPAS, M. Age and disease – related changes in the mineral bone. **Calcif Tissue Int**, v. 53 (supl 1), p.S57-S64, 1993.
25. HALL, B.K. Sodium fluoride as an initiator of osteogenesis from embryonic mesenchyme *in vitro*. **Bone** , v.8, p.11-116, 1987.
26. HANHIJARVI, H.; PENTILLA, I.; PEKKARINEN, A. Human ionic plasma fluoride concentration and age in a fluoridated community. **Proc Finn Dent Soc**, v. 77, n. 4, p. 211-21, 1981.
27. HEFTI, A.; MARTHALER, T. M. Bone fluoride concentrations after 16 years of drinking water fluoridation. **Caries Res**, v.15, p. 85-9, 1981.
28. HELLSTROM, I. Studies on fluoride distribution in infant and small children. **Scan J Dent Res**, v.84, p.119-36, 1976.
29. HILLIER, S. et al. Water fluoridation and osteoporotic fracture. **Commun Dent Health**, v.13, suppl.2, p.63-8, 1996.
30. INKOVAARA, J.A. Is fluoride treatment justified today? **Calcif Tissue Int**, v.49, p. S68-9, 1991.
31. JACOBSEN, S.J. et al. The association between water fluoridation

- and hip fracture among white women and men aged 65 years and older. A national ecologic study. **Ann Epidemiol**, v.2, p. 617-26, 1992.
32. JIANG, Y. et al. Effects of low-dose long – term sodium fluoride preventive treatment on rat bone mass and biochanical properties. **Calcif Tissue Int**, v. 58, n.1, p.30-39, Jan. 1996.
 33. KANIS, J. A. Treatment of symptomatic osteoporosis with fluoride. **Am J Med**, v.95, suppl. 5A, Nov. 1993.
 34. KASPERK, C. H. et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. **J Clin Endocrinol Metab** v. 80, p. 2511-17, 1995.
 35. KASSEN, 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. **Acta Endocrinol**, v.130, p. 381-86, 1994.
 36. KHOKHER, M. A.; DANDONA, P. Fluoride stimulates [³H] thymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. **Metabolism**, v.39, n.11, p.1118-21, nov. 1990.
 37. KLEEREKOPER, M.; BALENA, R. Fluorides and osteoporosis. **Annu Rev Nutr**, v.11, p.309-24, 1991.
 38. KOOP, J. B.; ROBEY, P. G. Sodium fluoride does not increase human bone cell proliferation or protein synthesis *in vitro*. **Calcif Tissue Int**, v. 47,p. 221-29, 1990.
 39. LAU, K-H.W.; BAYLINK, D.J. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. **J Bone Miner Res**, v.13, n.11, p.1660-7, 1998.
 40. LEHMANN, R. et al. Drinking water fluoridation: bone mineral density and hip fracture incidence. **Bone**, v.22, n.3, p.273-78, 1998.
 41. LIOTÉ, F. Bioavailability of fluoride in postmenopausal women:

- comparative study between sodium fluoride and disodium monofluorophosphate-calcium carbonate. **Calcif Tissue Int**, v. 50, p. 209-13, 1992.
42. LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the armed a forces-** Institute of pathology- 38ed. New York, McGraw-Hill Book Company, p. 36-8, 1968.
 43. LUYTEN, F. P. Et al. Purification and partial amino acid séquence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. **J Biol Chem**, v. 264, n. 23, p. 13377-80, Aug. 1989.
 44. MARIE, P. J.; DE VERNEJOUL, M. C.; LOMRI, A. Stimulation of bone formation in osteoporosis patients treated with fluoride associated with increase DNA synthesis by osteoblastic cells *in vitro*. **J Bone Miner Res**, v. 7, n. 1, p. 103-13, Jan. 1990.
 45. MOHR, H.; KRAGSTRUP, J. A histomorphometric analysis of the effects of fluoride on experimental ectopic bone formation in the rat. **J Dent Res**, v.70, n.6, p. 957-60, 1991.
 46. MOLLER, P.F; GUDJONSSON, S.V. Massive fluorosis of bone and ligaments. **Acta Radiol**, v. 13, p. 269-94, 1932.
 47. MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Effects of a persistent inflammatory process on experimental heterotopic ossification. The influence of macrophages. **Brazilian J Med Res**, v.26, p. 53-66, 1993.
 48. MOSEKILDE, L.; KRAGSTRUP, J.; RICHARDS, A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. **Calcif Tissue Int**, v.40, n.6, p.318-22, 1987.
 49. NEUMAN, W.F.; NEUMAN, M.W. The chemical dynamics of bone mineral. University of Chicago Press, Chicago, 1958, p. 75-100.
 50. PAK, C.Y.C. Treatment of postmenopausal ostoporosis with slow-release sodium fluoride. **Annal Int Med**, v. 123, n.6, p. 401-8,

Sep.1995.

51. PARKINS, F. M. et al. Relationships of human plasma fluoride and bone fluoride to age. **Calcif Tissue Res**, v. 16, p. 335-38, 1974.
52. PHIPPS, K. Fluoride and bone health. **J Public Health Dent**, v.55, n.1, p.53-6, 1995.
53. PIZAULO JUNIOR, J. M. Discondria Tibial: mecanismos de Lesão e Controle. **Rev Brasileira de Ciência Avícola** , v.4, n.3, p.169-85, set, 2002.
54. REDDI, A. H.; ANDERSON, W. A. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. **J Cell Biol**, v. 69, n. 3, p. 557-72, Jun. 1976.
55. REDDI, A. H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. **Coll Res**, v.1, p.209-26, 1981.
56. REGINSTER, J.Y. et al. The effects of sodium monofluorophosphate plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. **Annal Int Med**, v.129, n.1, p. 1-8, July 1998.
57. RESCH, H. Pharmacokinetic profile of a new fluoride preparation: sustained-release monofluorophosphate. **Calcif Tissue Int**, v.54, p.7-11, 1994.
58. 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.802-9, March 1990.
59. RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289, p. 1508-14, 2000.
60. ROSEN, C. J. and BILEZIKIAN, J. P. Anabolic therapy for osteoporosis. **J Clin Endoc Metab**, v. 86, n. 3, p. 957-64, 2001.
61. RUBIN, C. D. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. **Arch Intern Med**, v.161, p. 2325-33, Oct. 2001.

62. SAMPATH, T. K.; MUTHUKUMARAN, N.; REDDI, A.H. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix associated, bone-inductive protein by heparin affinity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, n.20, p. 7109-13, Oct. 1987.
63. SUSAN, M. Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone (review). **Int J Mol Med**, v. 3, p.115-26, 1999.
64. TAGA, E. M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Rev Bras Implant**, v. 3, n.1, p. 59-69, 1996.
65. TAVES, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v. 15, p.969-974, 1968.
66. TEN CATE, A. R. Histologia bucal – desenvolvimento, estrutura e função. Guanabara Koogan, 5ª ed, 2001.439 p.
67. TURNER et al. The effects of fluoride on bone and implant histomorphometric. **J Bone Miner Res**, v. 4 p. 477-84, 1989.
68. TURNER, C.H.; AKHTER, M.P.; HEANEY, R.P. The effects of fluoridated water on bone strength. **J Orthop Res**, v.10, p.581-87, 1992.
69. TURNER, C. H. A mathematical model for fluoride uptake by the skeleton. **Calcif Tissue Int**, v.52, p.130-8, 1993.
70. TURNER, C.H.; DUNIPACE, A. J. On fluoride and bone strength. **Calcif Tissue Int**, v.53, p. 289-90, 1993.
71. TURNER, C.H. et al. Fluoride reduces bone strength in older rats. **J Dent Res**, v.74, n.8, p.1475-81, 1995.
72. TURNER, C. H. et al High fluoride intakes cause osteomalacia and diminished bone strength in rats with renal deficiency. **Bone**, v. 19, n.6, p. 595-601, Dec. 1996.
73. TURNER, C. et al. Fluoride treatment increase serum IGF-1, bone turnover, and bone mass, but not bone strength, in rabbits. **Calcif Tissue Int**, v.61, n.1, p.77-83, July 1997.
74. TURNER, C. H. et al. Combined effects of diets with reduced

- calcium and phosphate and increased fluoride intake on vertebral bone strength and histology in rats. **Calcif Tissue Int**, v.69, p. 51-7, 2001
75. URIST, M.R. Bone: formation by osteoinduction. **Science**, v. 150, n. 698, p. 893-99, 1965.
 76. URIST, M. R.; MIKULSKI, A.; BOYD, S. D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. **Arch Surg**, v. 110, n. 4, p. 416-28, Apr. 1975.
 77. URIST, M.R. et al. A solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proc Natl Acad Sci**, v.76, p.1828-32, 1979.
 78. URIST, M. R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. M. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, v. 220, p. 680-6, 1983.
 79. WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol**, v.26, p. 235-302, 1969.
 80. WERGEDAL, J.E.; LAU,K-H.W.; BAYLINK, D.J. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. **Clin Orthop**, v. 233, p. 274-82,1988.
 81. WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monogr Oral Sci**, v. 13, p. 1-160, 1989.
 82. 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, p.421-25, 1994.
 83. WHITFORD, G.M. The metabolism and toxicity of fluoride. Karger, Basel, 1996.
 84. WHITFORD, G. M. Fluoride Metabolism and Excretion in Children. **J Public Health Dent**, v.59, n.4, p. 224-29, 1999.
 85. WLODARSKI, K. H. Properties and origin of osteoblasts. **Clin Orthop**,

v. 252, p. 276-93, 1990.

ABSTRACT**Effects of various fluoride concentrations on ectopic bone formation in young and old rats**

This study evaluated the effects of various fluoride (F) concentrations (0, 5, 15 and 50 ppm) on ectopic bone formation in young and old rats. Eighty male Wistar rats were received as weanlings and were assigned to 4 groups (n=20/gr), which differed according to the F concentration they received in the drinking water. Groups 1, 2, 3 and 4 received water containing 0(control), 5, 15 and 50 mg F/L, respectively. When half of the rats were 90 days old, demineralized bone was implanted. The animals were killed 28 days after and implant, plasma and femur were collected. The other rats received demineralized bone matrix implants when they were 365 days old and were also killed 28 days after. The femur surface was analyzed for F with the ion-specific electrode. The femur ash and the plasma were analyzed for F with the ion specific electrode, following HMDS-facilitated diffusion. The implants were analysed by histomorphometry and radiography. Data were tested for statistically significant differences by ANOVA and Tukey's test, *t* test and linear regression ($p < 0.05$). Mean plasma F concentrations ($\mu\text{g/mL}$) for 90-day-old rats were $0.025 \pm 0.002a$, $0.037 \pm 0.007ab$, $0.057 \pm 0.011b$ and $0.145 \pm 0.029c$, femur surface F concentrations ($\mu\text{g/g}$) were $564 \pm 122a$, $961 \pm 357ab$, $1415 \pm 546bc$ and $3194 \pm 502c$ and femur F concentrations ($\mu\text{g/g}$) were $207 \pm 21a$, $481 \pm 76a$, $1217 \pm 188b$ and $2735 \pm 355c$, for groups 1, 2, 3 and 4 respectively. For 365 -day-old rats, plasma ($\mu\text{g/mL}$) F concentrations were $0.031 \pm 0.003a$, $0.045 \pm 0.010ab$, $0.063 \pm 0.016b$ and $0.118 \pm 0.026c$, femur surface F concentration ($\mu\text{g/g}$) were $675 \pm 120a$, $1298 \pm 426ab$, $2140 \pm 681bc$ and $3870 \pm 843c$ and femur F concentrations ($\mu\text{g/g}$) were $694 \pm 152a$, $1376 \pm 583b$, $1732 \pm 564b$ and $4494 \pm 343c$ respectively.

Significant positive correlations were found between plasma and femur surface ($r=0.89$; $p<0.0001$ F and $r=0.87$; $p<0.0001$), plasma and femur ($r=0.91$; $p<0.0001$ and $r=0.82$; $p<0.0001$) and femur surface and femur ($r=0.92$; $p<0.0001$ and $r=0.84$; $p<0.0001$) for 90 and 365 day old rats respectively. The morphometric analyses indicated an increase in bone formation for younger rats that received 5 ppm F in the drinking water but this was not statistically significant. The younger rats that received 50 ppm F showed a significant impairment on the bone formation. The bone formation was not significantly different among the older rats. The results suggest that lower doses of fluoride in the drinking water may have an anabolic effects on bone formation in younger rats.