UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FLÁVIA GODOY IANO

**Efeito da ingestão crônica do fluoreto sobre o
sistema oxidante/antioxidante de ratos**

BAURU
2012

FLÁVIA GODOY IANO

**Efeito da ingestão crônica do fluoreto sobre o
sistema oxidante/antioxidante de ratos**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

**BAURU
2012**

la6e Iano, Flávia Godoy
 Efeito da ingestão crônica do fluoreto sobre o
 sistema oxidante/antioxidante de ratos / Flávia
 Godoy Iano. – Bauru, 2012.
 166 p. : il. ; 31cm.

 Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
 de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
 Buzalaf

A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data: 24/02/2012

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 001/2007
Data: 20/03/2007

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Claudia, pela dedicação, carinho, por tudo que me ensinou, pelo apoio constante para a minha formação, e por seu amor incondicional.

Ao meu marido, Rodrigo, sua cumplicidade e colaboração me ajuda a superar todos os obstáculos. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Agradeço primeiramente Deus por me acompanhar a trilhar este longo caminho.

Agradeço aos meus pais que me deram a vida. A minha mãe Claudia, que me ensinou a viver a vida com dignidade, que muitas vezes renunciou os seus sonhos para que pudesse realizar os meus. Agradeço a minha família por todo apoio e dedicação, a minha avó Onira meu irmão Fábio e minhas tias Nícia e Graziela.

Ao meu marido Rodrigo Cardoso de Oliveira por toda a compreensão, apoio, amor incondicional e por toda a paciência nesse período da minha vida.

Aos meus sogros Lourival e Dolores que me adotaram como filha. E aos meus cunhados Rogério e Marcela pelo carinho e incentivo. Ao meu sobrinho Yuri.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro que foi o meu primeiro orientador na minha formação científica, pelos seus ensinamentos e pela oportunidade.

À Profa. Marília Afonso Rabelo Buzalaf pelo exemplo de determinação, liderança, apoio, orientação, incentivo. Obrigada pela

confiança em acreditar na minha capacidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdecir F. Ximenes por colocar a disposição o seu laboratório, por todos os seus ensinamentos e por estar sempre disposto a ajudar.

À Profa. Ethel Novelli pela colaboração inestimável na elaboração e desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários da Bioquímica Thelma, Ovídio, Larissa e Aline que me ajudaram nos momentos em que eu precisei para desenvolver este trabalho.

Aos funcionários do Biotério da FOB-USP: Luiz Carlos, Erasmo, Elias e Richard que sempre ajudam com as nossas pesquisas.

À secretária do departamento Vera Lúcia que está sempre disposta a ajudar.

À Danielle, Patrícia e Tânia, técnicas da Histologia, obrigada pela colaboração.

À Maria Cecília pela grande colaboração na realização deste trabalho, além da amizade e incentivo por todo este período.

À Mileni Fernandes por todo o seu auxílio, companheirismo, carinho, amizade, pelo convívio e colaboração constante.

A Giovana por toda a colaboração.

À Camila Buzalaf por toda a colaboração e por estar sempre disposta a ajudar.

À Claudia Kobayashi pela amizade e incentivo em todos os momentos.

À Flávia Italiani pela amizade e momentos de descontração.

À minha amiga Elaine companheira de tantas jornadas, obrigada pela amizade e convivência.

A todos os professores do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP em especial: Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães, Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues, Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria, , Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, Prof. Dr. Rumio Taga, Prof. Dr. Gustavo Garlet.

Ao Prof. José Luis Millán pela sua orientação durante o tempo em que estive no Sanford Burnham Institute for Medical Research, e pelo amigos que fiz durante este período, Tina, Manisha, Seiko, Campbell, Wei, Sonoko e Britney.

A todos os antigos e novos amigos da Bioquímica (FOB-USP): Flávia Levy, Taisa Delecrode, Melina Bellini, Bruno Zarella, Lucas Almeida, Thiemi Kato, Heloisa Pereira, Lívia Comar, Senda Charone, Cíntia Maria, Juliano Pessan, Kellen Gasque, Adriana Matos, Flávia Amadeu, Alessandra Machado, Tatiana Furlani, Marcela Yanai, Lucas Shimohara, Rejane

Fukushima, Juliane Carvalho, Irene Ramires obrigada pela amizade e por tanto tempo de convívio.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 2007/03723-2, 2007/01788-0 e 2009/01996-7), pelo suporte e apoio financeiro a este projeto.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Dr. José Carlos Pereira e à vice-diretora, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Para todas as demais pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”

Luís Fernando Verissimo

“Ninguém é tão sábio que nada tenha para aprender, nem tão tolo que nada tenha pra ensinar.”

Blaise Pascal

“Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir”

Woody Allen

RESUMO

A ingestão excessiva de fluoreto por um longo período de tempo pode resultar em fluorose, que pode causar manifestações dentárias e esqueléticas. Danos metabólicos, funcionais e estruturais causados pela fluorose crônica tem sido relatados em vários tecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fluoreto administrado na água de beber, da administração de fluoreto na água de beber na defesa antioxidante de ratos. Quatro grupos de ratos wistar foram usados (n=10/grupo). Os animais receberam água de beber contendo 0 (controle), 5, 15 ou 50 ppm de fluoreto durante 60 dias. Eles foram eutanasiados e os tecidos (fígado, rins e coração) e plasma foram coletados e homogenizados. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GSH), substâncias antioxidantes totais (SAT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxido de lipídios (HL) e fluoreto foram analisadas. Dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ou Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($p < 0,05$). Nos rins, SOD, GPx, GSH e SAT diminuíram e fluoreto e HL aumentaram significativamente. No fígado, CAT e TBARS diminuíram, SOD, HL e SAT aumentaram significativamente. No coração, GPx aumentou significativamente. No plasma, SOD e HL diminuíram significativamente. Em resumo, esses resultados mostram que a administração crônica de fluoreto altera o sistema antioxidante de ratos. Nosso dados sugerem que a exposição em níveis elevados de fluoreto, a conversão do ânion superóxido em água nos rins parecem ocorrer principalmente através da SOD e CAT, com baixa participação do sistema glutathione, diferindo do que parece ocorrer no fígado.

Palavras-chave: Fluoreto. Antioxidantes. Fígado. Rim. Coração

ABSTRACT

Effect of chronic fluoride intake in the oxidant/antioxidant system of rats

Excessive fluoride intake over a long period of time could result in fluorosis, which can lead to dental and skeletal manifestations. Metabolic, functional and structural damages caused by chronic fluorosis have been reported in many tissues. The aim of this study was to evaluate the effect of fluoride, administered in drinking water, in the antioxidant defense of rats. Four groups of *Wistar* rats were included (n=10/group). The animals received drinking water containing 0 (control), 5, 15 or 50 ppm of fluoride during 60 days. They were euthanized and the tissues (liver, kidney and heart) and plasma were collected and homogenized. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH), antioxidants, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), lipid hydroperoxide (LH), and fluoride were analyzed. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test or Kruskal-Wallis and Dunn's tests ($p < 0.05$). In the kidney SOD, GPx, GSH and SAT decreased and fluoride and LH increased significantly. In the liver, CAT and TBARS decreased and fluoride, SOD, LH and SAT increased significantly. In the heart, GPx increased significantly. In the plasma, SOD and LH decreased significantly. In summary, these results show that chronic fluoride administration alters the antioxidant system of the rats. Our data suggest that upon exposure to high levels of fluoride, the conversion of the superoxide anion to water in the kidney seems to occur mainly through the SOD and CAT, with a low participation of the glutathione system, differing from what seems to occur in the liver.

Key words: Fluoride. Antioxidants. Liver. Kidney. Heart.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema adaptado de GRÜNING e RALSER, 2011.....	33
Figura 2 -	Amostras dos tecidos coletados: fígado, rins e coração.....	56
Figura 3 -	As amostras de rim, fígado, coração e plasma foram analisadas pela técnica de difusão facilitadas por HMDS. A: Placa de petri com a tampa previamente furada, contendo 1 ml de amostra (tecido após homogenização com água deionizada). B: Foi completado o volume para 2 ml com água deionizada na placa e na parte interna da tampa foram adicionados 50 µl de NaOH 0,05 M. C. As placas foram fechadas e adicionados 2 ml de HMDS pelo orifício na tampa e depois feito vedamento com vaselina, estando as placas prontas para o processo de difusão do fluoreto. D: Leitura das amostras utilizando eletrodo íon específico (Orion 9409) e eletrodo calomelano.....	59
Figura 4 -	Peso corporal médio dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	76
Figura 5 -	Peso médio dos rins direito e esquerdo dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	76
Figura 6 -	Peso médio do fígado dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	77
Figura 7 -	Peso médio do coração dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	77
Figura 8 -	Concentração média de fluoreto nas amostras de plasma (µg/ml) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	79
Figura 9 -	Concentração média de fluoreto nas amostras de rim (µg/g) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças	

	estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	79
Figura 10-	Concentração média de fluoreto nas amostras de fígado ($\mu\text{g/g}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	80
Figura 11-	Concentração média de fluoreto nas amostras de coração ($\mu\text{g/g}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	80
Figura 12-	Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de rim ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	82
Figura 13-	Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de fígado ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	82
Figura 14-	Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de coração ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	83
Figura 15-	Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de plasma ($\mu\text{mol/ml}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	83
Figura 16-	Concentração média de TBARS nas amostras de rim ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	85

Figura 17-	Concentração média de TBARS nas amostras de fígado ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	85
Figura 18-	Concentração média de TBARS nas amostras de coração ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	86
Figura 19-	Concentração média de TBARS nas amostras de plasma ($\mu\text{mol/ml}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	86
Figura 20-	Concentração média de ALP nas amostras de soro (U/l) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	87
Figura 21-	Concentração média de SAT nas amostras de rim (mmol/g tecido) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	89
Figura 22-	Concentração média de SAT nas amostras de fígado (mmol/g tecido) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	89
Figura 23-	Concentração média de SAT nas amostras de plasma (mmol/ml) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).....	90
Figura 24-	Concentração média de GSH nas amostras de rim (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	92

Figura 25-	Concentração média de GSH nas amostras de fígado (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	92
Figura 26-	Concentração média de GSH nas amostras de coração (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	93
Figura 27-	Concentração média de GSH nas amostras de plasma (nmol/ml) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	93
Figura 28-	Concentração média de GPx nas amostras de rim ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	95
Figura 29-	Concentração média de GPx nas amostras de fígado ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	95
Figura 30-	Concentração média de GPx nas amostras de coração ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	96
Figura 31-	Concentração média de GPx nas amostras de plasma ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	96
Figura 32-	Concentração média de SOD nas amostras de rim ($\text{U}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	98

- Figura 33- Concentração média de SOD nas amostras de fígado (U/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 98
- Figura 34- Concentração média de SOD nas amostras de coração (U/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)..... 99
- Figura 35- Concentração média de CAT nas amostras de rim ($\mu\text{mol/min*mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)..... 101
- Figura 36- Concentração média de CAT nas amostras de fígado ($\mu\text{mol/min*mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 101
- Figura 37- Concentração média de CAT nas amostras de coração ($\mu\text{mol/min*mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)..... 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas (g/100g) utilizadas no ensaio biológico.....	54
Tabela 2 - Composição da mistura salina.....	54
Tabela 3 - Composição da mistura vitamínica.....	55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
%	Porcentagem
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{29} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Molibdato de amônio
$[\text{F}^-]$	Concentração de fluoreto
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALP	Fosfatase alcalina
BHT	Butil etil tolueno
CaCO_3	Carbonato de cálcio
CaHPO_4	Fosfato monoácido de cálcio
CAT	Catalase
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
CuSO_4	Sulfato cúprico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5' ditiobis (2 nitrobenzóico)
ECSOD	Superóxido dismutase extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 4 (\text{H}_2\text{O})$	Citrato férrico
G	Força centrífuga
g	Grama
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
GRH	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S transferase

h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HF	Ácido fluorídrico
HL	Hidroperóxido de lipídio
HMDS	Hexametildisiloxano
K ₂ HPO ₄	Fosfato monoácido de potássio
KI	Iodeto de potássio
l	Litro
L [•]	Radical lipídico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LH	Ácido graxo polinsaturado
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/l	Milimol por litro
Mn	Manganês
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganês
mV	Milivolt
Na ₂ SeO ₃	Selenito de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitro tetrazólio
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio molecular

$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido/ ânion superóxido
$^{\circ}C$	Graus centígrados
$HO^{\cdot}$	Radical hidroxila
OH^{-}	Ânion hidroxila
OPT	orto- ftálico
pH	Potencial de hidrogênio
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
ppm	parte por milhão
$RO^{\cdot}$	Radical alcóxila
$ROO^{\cdot}$	Radical peróxila
rpm	Rotação por minuto
SAT	Substâncias antioxidantes totais
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
U/mg	Unidade por miligrama
UI/ml	Unidade por mililitro
UV	Radiação ultravioleta
Zn	Zinco
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco
$\Delta abs/min$	Variação de absorbância por minuto
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia alfa 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Espécies reativas	29
2.2	Peroxidação lipídica	33
2.3	Antioxidantes	36
2.3.1	Superóxido Dismutase (SOD)	36
2.3.2	Catalase (CAT)	37
2.3.3	Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRH) e glutathione reduzida (GSH)	38
2.3.4	Ácido ascórbico	39
2.3.5	Vitamina E (α -tocoferol)	40
2.4	Flúor	41
2.5	Efeitos do fluoreto no sistema oxidante/antioxidante	44
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Tratamento dos animais e obtenção das amostras	53
4.2	Dosagem de Fluoreto	57
4.2.1	Plasma	57
4.2.2	Rim	58
4.2.3	Fígado	59
4.2.4	Coração	60
4.2.5	Validação da análise	60
4.3	Preparo das amostras	62
4.4	Dosagem de hidroperóxidos de lipídio (HL)	63
4.5	TBARS (Lipoperoxidação)	64
4.6	Dosagem de Fosfatase Alcalina (ALP) no soro	64
4.7	Substâncias Antioxidantes Totais (SAT)	65
4.8	Atividade da glutathione reduzida (GSH)	66
4.9	Atividade da glutathione peroxidase (GPx)	67
4.10	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	68
4.11	Atividade da Catalase (CAT)	70

4.12	Análise estatística	71
5	RESULTADOS	73
5.1	Peso dos animais e das amostras coletadas	75
5.2	Fluoreto	78
5.3	Dosagem de HL	81
5.4	Dosagem de TBARS	84
5.5	Dosagem de ALP	87
5.6	Dosagem de SAT	88
5.7	Dosagem de GSH	91
5.8	Dosagem de GPx	94
5.9	Dosagem de SOD	97
5.10	Dosagem de CAT	100
6	DISCUSSÃO	103
6.1	Plasma	105
6.2	Fígado	108
6.3	Coração	110
6.4	Rins	110
7	CONCLUSÕES	115
8	REFERÊNCIAS	119
9	ANEXOS	141

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Após a observação de que comunidades com água naturalmente fluoretada tinham menor incidência de cárie dentária, muitos países desenvolvidos iniciaram programas de fluoretação artificial da água, onde o fluoreto é adicionado à água de abastecimento (LUDLOW et al., 2007).

As principais dúvidas relacionadas ao uso do fluoreto dizem respeito a seus efeitos sistêmicos (em outros tecidos diferentes dos tecidos bucais), o que implica na necessidade do conhecimento de uma dose segura que possa ser ingerida sem problemas. Esses dados são relevantes, uma vez que o fluoreto é adicionado na água de abastecimento de muitas cidades brasileiras e nos produtos odontológicos (principalmente dentifrícios) no Brasil e em outros países (BURT, 1992; MASCARENHAS, 2000; BUZALAF et al., 2001, 2002, 2004).

A excessiva ingestão de fluoreto por um longo período de tempo pode resultar na fluorose, caracterizada por manchas nos dentes e manifestações esqueléticas como deformidades, osteoporose, esclerose óssea. A fluorose endêmica é observada mundialmente, ocorrendo em todos os continentes e afetando milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

É conhecido que o fluoreto causa diversos efeitos celulares dependendo do tempo, concentração utilizada e tipo celular. Os efeitos tóxicos do fluoreto nas células consistem principalmente na interação com enzimas. Na maioria dos casos, este elemento age como inibidor enzimático, mas ocasionalmente os íons fluoreto podem estimular a atividade das enzimas (ADAMEK et al., 2005). Em níveis micromolares, é considerado um agente anabólico porque promove proliferação celular, enquanto que, em concentrações milimolares inibe várias enzimas, incluindo fosfatases, *in vivo* e *in vitro* (MENDOZA-SCHULZ et al., 2009).

Danos metabólicos, estruturais e funcionais causados pela fluorose crônica têm sido relatados em diversos tecidos. Pesquisas sugerem que o fluoreto inibe a secreção e/ou síntese de proteínas e influencia distintas vias de sinalização envolvidas na proliferação e apoptose. (KARUBE et al., 2009; ZHANG et al., 2007, 2008).

Gutiérrez-Salinas e Morales-González (2006) relataram que a ingestão de água contendo 50 ppm de fluoreto de sódio (NaF) por ratos induziu a produção de estresse oxidativo na mucosa oral, caracterizado pelo aumento de níveis de malondialdeído (MDA), bem como alterações nas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Alguns tipos celulares especialmente sensíveis ao fluoreto são as células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), podendo levar ao desenvolvimento de fluorose esquelética em humanos. Hoje é reconhecido que o fluoreto também afeta células em tecidos moles, como células renais, endoteliais, das gônadas e neuronais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Em relação aos efeitos da exposição excessiva ao fluoreto, o processo de estresse oxidativo tem sido observado em vários tipos celulares *in vitro* e também em tecidos moles *in vivo*, como fígado, rim, cérebro, pulmão e testículos, tanto em animais quanto em indivíduos que vivem em áreas de fluorose endêmica. Acredita-se que o fluoreto iniba a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx) (GARCIA-MONTALVO et al., 2009; IZQUIERDO-VEGA et al., 2008; NOBES; HALL, 1995). Além disso, o fluoreto pode alterar os níveis de glutathione (ZHANG et al, 2007; GHOSH et al., 2008, MITTAL; FLORA, 2006; SHIVARAJASHANKARA et al., 2001), muitas vezes resultando na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em nível mitocondrial, levando ao dano de componentes celulares.

As mitocôndrias ocupam o centro dos danos intracelulares causados por diferentes estresses, incluindo o fluoreto (ANURADHA et al., 2001). O fluoreto altera a atividade de muitas células ricas em mitocôndrias, tais como as dos rins humanos, e do fígado e pâncreas de ratos (CITTANOVA et al., 1996, DABROWSKA et al., 2004). Entretanto, informações acerca dos mecanismos envolvidos nos danos causados pelo fluoreto nas mitocôndrias ainda são escassas.

Em adição, apesar dos vários relatos na literatura sobre a toxicidade do fluoreto, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por esse efeito. Alguns estudos têm demonstrado que mesmo em concentrações na ordem de micromolar o fluoreto induz a apoptose de células de várias linhagens, bem como induz alteração da resposta imunológica (ANURADHA et al., 2001; REFSNES et al., 2002, 2003a,b). No entanto, os mecanismos moleculares dessas ações ainda não estão completamente esclarecidos.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies reativas

As espécies reativas representam átomos ou moléculas que podem ou não apresentar elétrons desemparelhados. Já o termo radicais livres é empregado genericamente para descrever uma variedade de átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados. Esses elétrons desemparelhados conferem reatividade aos radicais livres. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ROLO et al., 2012). Dentre as espécies reativas, podemos citar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs). Temos como exemplos de EROs: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido orgânico (ROOH), e de ERNs: óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), dióxido de nitrogênio (NO_2), ânion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As EROs são produzidas continuamente em organismos vivos, devido à respiração aeróbia e estímulos extracelulares, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em organismos aeróbios, o oxigênio molecular (O_2) é utilizado como aceptor final de elétrons, durante a fosforilação oxidativa, onde é reduzido a água (H_2O). Esta via metabólica é responsável pela manutenção do equilíbrio energético nesses seres. A redução incompleta do oxigênio pela mitocôndria durante a fosforilação oxidativa, na cadeia de transporte de elétrons, pode gerar espécies reativas, tais como: superóxido (O_2^-), H_2O_2 e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (Eq. 1). Em tecidos sob condições normais, menos de 1% do oxigênio aceptor final se torna uma espécie reativa (TURRENS, 2003; BUETTNER, 2011). Outra via metabólica que

pode gerar espécies reativas é a β -oxidação de ácidos graxos (RHEE et al., 2010; MORGAN et al., 2011).

Equação 1: Processo de redução do oxigênio molecular em água. (Imlay, 2008)

Estas espécies também podem ser geradas por hipóxia, isquemia-reperfusão ou ainda no processo de ciclo redox, por exemplo, durante a oxidação de quinonas (CROSS, 1987).

Aeróbios produzem espécies reativa em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante, quando ocorre um desequilíbrio, alguns danos podem ser causados por espécies reativas. Em outras palavras, a defesa antioxidante controla os níveis de espécies reativas ao invés de eliminá-las (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, quando a quantidade de espécies reativas é muito maior que a quantidade de antioxidantes disponíveis, é dito que se tem um estado de estresse oxidativo, ou seja, ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs/ERNs e a defesa antioxidante. Devemos lembrar que uma pequena porcentagem de EROs é encontrada em processos fisiológicos, como sistema de defesa de macrófagos e também na ativação de vias de sinalização intracelular, consequentemente controlando a expressão de alguns genes (USHIO-FUKAI; URAO, 2009; KIM et al., 2011; BUETTNER, 2011; VURUSANER et al., 2012) e regulando, inclusive, sinalização autócrina e parácrina (ZANGAR et al., 2011).

Em princípio, o estresse oxidativo pode ser resultado de:

A- Diminuição de antioxidantes, causados por diminuição dos níveis das defesas antioxidantes por mutações, diminuição na ingestão de antioxidantes e outros constituintes essenciais (cobre, zinco, magnésio).

B- Aumento da produção de espécies reativas, causado por exposição elevada a O₂, presença de toxinas que produzem espécies reativas, excessiva ativação do sistema que produz espécies reativas (inapropriada ativação de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas).

As espécies reativas podem atacar uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata onde um radical reage com um composto gerando novos radicais. Os alvos celulares podem ser proteínas, lipídios e DNA, estando relacionados ao sítio de formação destes radicais. Um alvo clássico são os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas. O processo de oxidação resultante do ataque de EROs sobre a membrana chama-se lipoperoxidação (KEHER, 1993).

Erros em proteínas, danos na membrana, falhas de reparo, bem como genes determinantes da longevidade poderiam direta ou indiretamente ser afetados pelo estresse oxidativo, situação esta onde ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa oxidante (FREEMAN; CRAPO, 1982).

As EROs são essenciais para sinalização química e função imune e, como consequência, são continuamente produzidas no organismo (DROGE, 2002). Na maior parte das reações fisiológicas, a produção de radicais livres é controlada. Entretanto, a produção excessiva desses compostos, sua exposição a oxidantes externos ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante podem resultar em dano no DNA, lipídios e proteínas, caracterizando o chamado estresse oxidativo (NISHEJIAMA et al., 1998).

Uma vez que as membranas celulares são constituídas basicamente por lipídios e proteínas, os radicais livres podem causar peroxidação dos lipídios insaturados das membranas, podendo levar à perda de função e à morte celular. A produção elevada de lipoperóxidos, associada à redução na atividade de enzimas antioxidantes, tem sido relacionada a diversos mecanismos celulares que podem acarretar câncer, doenças cardíacas, inflamação, envelhecimento, diabetes, dano renal, enfisema pulmonar e artrite reumatóide (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Apenas para reforçar a ideia da importância dos efeitos dos EROs e como o tema tem expandido atualmente, um trabalho recente de Anastasiou e colaboradores (2011) publicado na revista Science e posteriormente comentado por Grüning e Ralser (2011) na revista Nature no mesmo mês (Dezembro), apresentou uma teoria que células de câncer de pulmão optariam por via metabólica “menos rentável” para evitar a formação de EROs. Os resultados dos autores mostram que essas células mesmo com disponibilidade adequada de oxigênio promovem uma inibição da piruvato quinase, impedindo a formação do piruvato e sua utilização na mitocôndria e, por último, o processo de fosforilação oxidativa (principal via de formação das EROs). Seria uma maneira de inibir a formação de EROS, que foi “batizado” no artigo de Grüning e Ralser (2011) como “Sacrifício para a Sobrevivência” como mostra o esquema abaixo (figura 1).

Figura 1. Esquema adaptado de GRÜNING e RALSER, 2011

2.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados (TAPPEL, 1973).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia que pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação, de acordo com a equação 1 (Eq. 2).

Equação 2. Fases da peroxidação lipídica

A reação acima se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo $\text{HO}^\bullet$ (radical hidroxila) ou pelo $\text{LO}^\bullet$ (radical alcóxila), com consequente formação do $\text{L}^\bullet$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $\text{L}^\bullet$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $\text{LOO}^\bullet$ (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o $\text{L}^\bullet$ na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($\text{L}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até que ocorra a autodestruição.

Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são: perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, formação de produtos citotóxicos e até a morte celular (HERSHKO, 1989).

Os danos na permeabilidade das membranas podem resultar em uma perda da seletividade de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA; WILHEM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BABER; HARRIS, 1994).

O aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica está envolvido na patogênese de muitas doenças com etiologia conhecida e

desconhecida, assim como com a toxicidade de muitos compostos (SHIVARAJASHANKARA et al., 2001).

Diferentes trabalhos relacionam o desenvolvimento de condições patológicas, como diabetes, problemas renais, enfisema pulmonar, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares com a produção elevada de lipoperóxidos e alterações na atividade de enzimas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ABUJA; ALBERTINI, 2001; DOI et al., 2001; CECONI et al., 2003).

A administração oral de altas doses de HL a animais causa algumas injúrias, como dano cardíaco em ratos e danos no sistema imunológico de camundongos. Em geral, entretanto, a toxicidade é baixa. No entanto, a toxicidade pode algumas vezes ser devida não aos HLs por si sós, mas a radicais carbonila formados por sua decomposição no estômago (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A dosagem de TBARS é um dos métodos mais antigos e frequentemente utilizados para medir a peroxidação. Pequenas quantidades de MDA livre são formadas na peroxidação da maioria dos sistemas de membrana, especialmente microsossomos. O MDA reage no teste de TBA (ácido tiobarbitúrico) para gerar um produto com cor, que é um complexo $(TBA)_2$ -MDA, que em solução ácida absorve luz a 532 nm. A adição de um antioxidante BHT (butil etil tolueno) ao meio de reação, é importante para suprimir a decomposição de peróxidos de lipídios durante o estágio de aquecimento na presença de ácidos da reação, que poderia levar à geração de MDA que não estava originalmente presente na amostra (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.3 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

As células são capazes de se defender contra os efeitos deletérios das espécies reativas por mecanismos de defesa antioxidante. Em organismos aeróbios saudáveis, os níveis de EROs estão em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante. (SIE, 1991). Esse desequilíbrio pode ser causado por diferentes fatores, dentre eles:

- A- Diminuição da defesa antioxidante causada por mutações nas enzimas de defesa;
- B- Diminuição da ingestão de vitaminas e outros constituintes na dieta;
- C- Aumento da produção de EROs causada por fatores ambientais como, por exemplo, fumo, radiação (ultravioleta, raios X etc.);
- D- Excesso de atividade física;
- E- Ingestão de gorduras;
- F- Consumo de álcool;
- G- Estresse físico e mental;
- H- Inflamações e infecções, entre outros (ATHAR, 2002).

As defesas antioxidantes podem ser classificadas como enzimáticas (SOD, GPx, CAT). Além destes, temos os antioxidantes não enzimáticos como vitamina C e E. Na sequência serão descritos alguns antioxidantes.

2.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi descoberta em 1969 por Fridovich e Mccord e catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2 . Está presente sob duas formas:

CuZn-SOD, a qual está localizada no citosol e tem em seu sítio catalítico um átomo de cobre e de zinco ou Mn-SOD, que é mitocondrial e apresenta um átomo de manganês em seu sítio ativo. Em geral, a SOD está presente quase que exclusivamente no meio intracelular, apresentando pequenas concentrações no plasma e fluido espinhal, sendo que estas formas recebem a designação de SOD extracelular (“ECSOD”) (FUJII, 2005). Essa isoforma (ECSOD) tem sido descrita com importância na regulação da expressão de algumas moléculas como a VEGF e HIF-1 α entre outras (KIM et al., 2011), participando na regulação de algumas vias.

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de ânions superóxido (O_2^-) e a atividade da Mn-SOD é de grande importância na regulação dos níveis de O_2^- mitocondrial (CHEN; THOMAS; KEANEY, 2003). Os radicais superóxido gerados no metabolismo mitocondrial são, pela ação da SOD, convertidos em H_2O_2 (Eq. 3) sendo posteriormente transformados em H_2O pela ação da catalase e/ou do sistema glutathiona.

2.3.2 Catalase (CAT)

A CAT está presente em todos os órgãos e, em mamíferos, está concentrada principalmente no fígado (CHANCE et al., 1979). Trata-se de uma hemoproteína, que funciona como catalisador da decomposição do H_2O_2 , ou seja, age removendo o H_2O_2 gerado, pela redução de 2 elétrons do O_2 (Eq. 4). Esta enzima se apresenta ligada em organelas denominadas peroxissomos e age sobre o H_2O_2 , não apresentando atividade para hidroperóxidos orgânicos (WASSMANN, 2004).

2.3.3 Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRH) e glutathione reduzida (GSH)

A GSH desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, entre eles, a síntese de proteínas e de DNA, como cofator de várias enzimas, na proteção celular contra agentes ionizantes e compostos exógenos e, principalmente, contra as espécies reativas. A glutathione celular e a intracelular estão normalmente presentes na forma reduzida (GSH), estando a forma oxidada, GSSG, presente em menos de 5% dos casos (KAYNAR et al., 2005).

Dessa forma, a glutathione pode ser considerada fundamental no metabolismo do H_2O_2 , peróxidos orgânicos, bem como espécies reativas, pois age como doadora de elétrons nas reações catalisadas pela GPx, (Eq. 5 e 6) (KAYNAR et al., 2005).

Assim, ela protege as células dos danos causados pelas espécies reativas. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH a GSSG (SHAN et al., 1990).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (HEBBEL, 1986) A recuperação da GSH é feita pela enzima GRH, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de GRH é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FRISCHER, 1987). A GRH é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato

reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (ROSS, 1991). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GRH (SHAN; AW; JONES, 1990).

2.3.4 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, mais conhecido como vitamina C, é um importante antioxidante presente no plasma (FREI; ENGLAND; AMES, 1989) e age nos tecidos envolvendo as EROs na fase aquosa. No cérebro, o ácido ascórbico tem um duplo efeito (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1985).

Participa de várias reações enzimáticas, como cofator de muitas enzimas. Contudo, sua atuação como antioxidante é devida à habilidade de atuar como um agente redutor, destacando desta forma uma de suas mais importantes propriedades, que é a de ser oxidado a ácido dehidroascórbico (JEDLINSKA-KRAKOWSKA et al., 2006).

O ascorbato pode reagir rapidamente com O_2^- e com o $HO^\cdot$ e ainda pode agir como supressor de oxigênio singlete (forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular). O ácido ascórbico quando administrado isoladamente também atua contra os danos induzidos pela radiação UV, capturando as espécies reativas geradas. Em pH fisiológico, a vitamina C está presente na forma de ânion ascorbato, sendo que esta forma apresenta menor penetração em comparação à sua forma esterificada (palmitato de ascorbila), que é mais lipossolúvel (JEDLINSKA-KRAKOWSKA et al., 2006).

Por outro lado, a vitamina C, assim como o α -tocoferol, pode atuar como pró-oxidante, pois, por ser um forte agente redutor, além de capturar espécies

reativas, pode também reduzir metais de transição, facilitando a formação dessas espécies (JEDLINSKA-KRAKOWSKA et al., 2006).

2.3.5 Vitamina E (α -tocoferol)

É um antioxidante lipossolúvel que, devido às suas características hidrofóbicas, tende a se concentrar nas membranas. Possui importante atuação na primeira linha de defesa antioxidante, contra danos às membranas celulares. Esta proteção se deve à reação com oxigênio singlete e com hidroxila. Entretanto, sua maior ação antioxidante reside na sua eficiente propriedade de suprimir radicais peroxila ($\text{ROO}^\cdot$) das porções lipídicas de membranas biológicas interrompendo, assim, a reação em cadeia da lipoperoxidação (CHATTOPADHYAY; BANDYOPADHYAY, 2006).

Inúmeros são os trabalhos relatando que o α -tocoferol pode atenuar o estresse oxidativo, principalmente por proteger membranas contra a lipoperoxidação. Por este fato, é uma vitamina amplamente utilizada tanto como suplemento oral, como em produtos de uso tópico, para a prevenção de doenças. Além da biotransformação que pode ocorrer durante a digestão, outros fatores, como a composição da dieta, podem interferir na biodisponibilidade dos suplementos administrados por via oral. A vitamina E, por ser uma molécula lipossolúvel, necessita de ingestão concomitante de gordura para que seja absorvida, e assim possa atuar na pele. Vários produtos fotoprotetores ou para aplicação após exposição ao sol contêm o α -tocoferol, ou seu éster, como princípio ativo coadjuvante, por inibir não somente a lipoperoxidação como também a formação de dímeros de timina e a imunossupressão (CHATTOPADHYAY; BANDYOPADHYAY, 2006).

A administração de antioxidantes em combinação parece ser uma estratégia de tratamento mais efetiva. Este sinergismo pode ser muito bem exemplificado pelo uso concomitante das vitaminas C e E. Em estudos com voluntários, foi verificado que a vitamina E apresenta maiores efeitos benéficos quando administrada em conjunto com a vitamina C, pelo fato de ambas atuarem sinergicamente, sendo que a vitamina C pode reciclar o radical tocoferila. A combinação dessas vitaminas pode aumentar, em grande parte dos casos, a atividade antioxidante total (CHATTOPADHYAY; BANDYOPADHYAY, 2006).

2.4 Flúor

O flúor é um elemento gasoso, amarelo claro e pertence ao grupo dos halogênios (VII) da tabela periódica; é o elemento mais reativo e eletronegativo, sendo que, foi isolado em 1886 por Moissan (VIEL; FLAHAUT, 1986). O íon fluoreto é um derivado do elemento flúor, que não é encontrado livre na natureza.

O fluoreto é comprovadamente um agente terapêutico contra a cárie dentária (GUHA-CROWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE, 1996, WONG et al., 2011). Estando também relacionado à dinâmica da formação óssea, quando administrado em doses adequadas, sendo que estão sendo feitos estudos sobre o seu uso no combate à osteoporose (MELLO; GOMIDE, 2005).

Após a administração do fluoreto, este, em meio ácido (estômago), é convertido a ácido fluorídrico (HF) que é facilmente absorvido, uma vez que as células tem uma alta permeabilidade ao HF. Cerca de 40% do fluoreto ingerido é absorvido pelo estômago (WHITFORD, et al. 1994), o restante será absorvido pelo intestino, onde a absorção independe do pH. Após a absorção o nível plasmático de

fluoreto atinge o seu pico em 30-45 minutos após a sua ingestão. Uma parte desse fluoreto circulante será incorporado aos tecidos mineralizados (dentes e ossos) e uma parte será distribuída aos tecidos moles. O fluoreto não incorporado será excretado pela urina (WITFORD, 1996; BUZALAF; WHITFORD, 2011; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010).

Apesar de seus efeitos terapêuticos, quando consumido de maneira inadequada (tanto por administração crônica quanto aguda), o fluoreto pode causar reações indesejáveis. Seus efeitos variam desde fluorose dentária, distúrbios gástricos reversíveis, fluorose esquelética no caso de administração crônica, podendo levar ao óbito no caso de intoxicação aguda (WHITFORD, 1996).

Em estudos em animais e humanos envolvendo a utilização de doses excessivas de fluoreto (agudas ou crônicas) foram relatados danos gastrointestinais (WHITFORD, 1996; SHASHI, 1999). Em concordância, habitantes de áreas endêmicas de fluorose podem apresentar sintomas gástricos incluindo falta de apetite, náusea, dor abdominal, flatulência, constipação e diarreia intermitente (SUSHEELA; BHATNAGAR, 1993).

Já a exposição de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) ao fluoreto pode levar ao desenvolvimento de fluorose esquelética. (National Research Council (NRC), 2006), patologia especialmente prevalente em partes da China, Índia e África, afetando milhões de pessoas no mundo (MALDE et al., 2003; CHOUBISA et al., 2001; YANG et al., 2003).

A fluorose esquelética frequentemente resulta em osteoclerose com dificuldades significativas a longo prazo, incluindo redução de mobilidade lombar e pescoço, dores nas extremidades inferiores, causando incapacitação de movimentos. (KLEEREKOPER, 1996; KRISHNAMACHARI, 1986). Para se ter uma

ideia da extensão desse assunto, estima-se que 62 milhões de pessoas em 17 diferentes estados da Índia são afetados pelas fluoroses dental e esquelética (SUSHEELA, 1999). Há relato de que a fluorose esquelética pode ser revertida com a remoção da exposição ao fluoreto, apesar de esta reversão poder levar décadas. Em adição, os pacientes devem ser monitorados em relação à nefrolitíase (KURLAND et al., 2007).

Além destes efeitos, Mullenix e colaboradores (1995) relatam que o acúmulo de fluoreto no hipocampo e no cérebro causa degeneração dos neurônios, diminuição do metabolismo aeróbico.

Whitford (1996) relata que o fluoreto interfere nas principais vias metabólicas do sistema biológico, funcionando como um potente inibidor de muitas enzimas. Somente uma pequena quantidade pode ser tolerada por qualquer célula viva, podendo causar várias alterações bioquímicas. Algumas manifestações tóxicas do fluoreto incluem seus efeitos no fígado (SARALAKUMARI et al., 1988; CARLSON et al., 1996; SHANTHAKUMARI et al., 2004), glândula tireóide (OGILVIE, 1953), estômago (MULLER et al., 1992) e rins (SUKETA; TERUI, 1980; PARTANEN, 2002; KARAOZ, 2004; SHANTHAKUMARI et al., 2004). Doses excessivas de fluoreto levam à alteração da expressão proteica em vários tipos de tecidos, como rins (XU et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2009), fígado (PEREIRA, 2011) e cérebro (GE et al., 2011), sendo as proteínas relacionadas ao metabolismo as mais afetadas.

Alguns trabalhos mostram uma associação entre toxicidade crônica de fluoreto e aumento do estresse oxidativo em humanos e animais. Karaoz e colaboradores (2004) realizaram um trabalho com animais de primeira e segunda geração mostrando que o fluoreto (30 mg/l) foi capaz de promover uma degeneração hidrópica em células epiteliais e uma dilatação moderada nos túbulos proximais e

distais dos rins. Essa degeneração provocou um encolhimento dos glomérulos e uma congestão vascular. A análise histológica também mostrou hemorragia em áreas intersticiais especialmente nas junções corticomedular e em áreas peritubulares e perivasculares. Também foi observado o aumento da peroxidação lipídica no tecido renal, resultando no aumento nos níveis de TBARS. Alterações sugestivas de angiogênese e congestão de vasos nos rins de ratos tratados com altas concentrações de fluoreto (50 ppm) também foram descritas por Kobayashi e colaboradores (2009). Além dos trabalhos já citados anteriormente, Blaszczyk et al. (2008) demonstraram um efeito do fluoreto sobre o sistema antioxidante em rins de ratos. Esses autores registraram uma redução da atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx, etc) em rins de ratos tratados com fluoreto quando comparados ao grupo controle.

Em um estudo *in vivo* avaliando células da mucosa oral de ratos e hepatócitos foi demonstrado o efeito do fluoreto em promover o estresse oxidativo, dano no DNA e indução de apoptose nessas células (HE; CHEN, 2006).

2.5 Efeitos do fluoreto no sistema oxidante/antioxidante

Há na literatura alguns trabalhos enfocando os efeitos da administração de fluoreto em diferentes componentes do sistema antioxidante. Shanthakumari e colaboradores et al. (2004) observaram um aumento na concentração de TBARS e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e GPx no fígado e rins nos grupos de ratos tratados com 25 ppm de fluoreto durante 8 e 16 semanas. Na análise histopatológica, os rins apresentaram discreta necrose nos túbulos e feixes vasculares dos glomérulos. Os

autores concluíram que a ingestão de água contendo altos níveis de fluoreto pode levar ao aumento da geração de radicais livres, o que pode levar a danos teciduais e outras complicações secundárias.

Evidências têm sugerido que as EROs podem ser importantes fatores relacionados à disfunção cardíaca, já que o miocárdio contém grande quantidade de mitocôndrias e possui elevada taxa de consumo de oxigênio. Isto indica maior susceptibilidade do músculo cardíaco ao estresse oxidativo e a importância do metabolismo energético cardíaco na produção de radicais livres (FERRARI et al., 1998; NOVELLI et al., 2002). Neste sentido, Ruiz-Gutierrez et al (1990) observaram elevadas concentrações de lipoperóxidos em pacientes com dano cardíaco. Tem-se ainda recentemente sugerido que o estresse oxidativo poderia apresentar importante papel na hipertrofia do miocárdio e no aparecimento da insuficiência cardíaca (POLIDORI et al., 2004). A relação entre estresse oxidativo e dislipidemias também tem sido evidenciada, já que a modificação oxidativa da LDL, formando LDL-ox, constitui ponto chave na sequência de eventos que levam à aterosclerose (MAOR et al., 1997; VERGNANI et al., 2000; OREM et al., 2002). A LDL-ox é mais aterogênica que as partículas normais de LDL, estando diretamente envolvida na formação de células esponjosas (OREM et al., 2002) e na apoptose (O'CONNOR; GENEST, 2001). A literatura tem relatado uma associação entre a ingestão excessiva de fluoreto e aumento de peroxidação lipídica e níveis de MDA (SHIVARAJASHANKARA et al., 2001; KARAOZ et al., 2004; SHANTHAKUMARI et al., 2004).

Błaszczuk e colaboradores (2008) relataram alterações no sistema antioxidante de ratos em decorrência da administração de NaF. Em comparação com o controle, os animais do grupo tratado com NaF tiveram um aumento de 100% na concentração de MDA no rim, demonstrando a intensificação da peroxidação

lipídica. O mesmo grupo teve uma diminuição de 27% da atividade da SOD, 34% da atividade da Mn-SOD, 63% da atividade da GPx e da GST e 30% da atividade da CAT, sendo que em todos os casos a diferença foi significativa em relação ao grupo controle.

Estudos *in vitro* com diferentes tipos celulares, e também *in vivo* em tecidos moles, como, fígado, rim, cérebro, pulmão e testículos em animais relatam que a exposição ao fluoreto causa estresse oxidativo em indivíduos que residem em áreas com fluorose endêmica. O fluoreto inibe enzimas antioxidantes como SOD, GPx e CAT (GARCÍA-MONTALVO et al., 2009; IZQUIERDO-VEGA et al., 2008; NOBES et al., 1995). Pode ainda alterar os níveis de GSH, frequentemente resultando na produção excessiva de EROs na mitocôndria (ZHANG et al., 2007; GHOSH et al., 2008; MITTAL; FLORA, 2006; SHIVARAJASHANKARA et al., 2001), levando a danos em compostos celulares.

Deste modo, como se pode observar pelo exposto, há alguns trabalhos na literatura envolvendo os danos oxidativos causados pelo fluoreto, mas os mesmos focam apenas em um ou dois tipos de tecidos. Em adição, as metodologias empregadas nos diferentes trabalhos são bastante distintas, dificultando a compreensão dos resultados. Além disso, em muitos casos, as doses de fluoreto empregadas são muito altas, e, portanto, de pouca significância clínica.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi avaliar o efeito do fluoreto administrado na água de beber sobre o sistema oxidante/antioxidante de ratos.

Os objetivos específicos foram quantificar, nos grupos controle e tratados com diferentes concentrações de fluoreto:

- 1 A concentração de fluoreto no plasma, rim, fígado e coração;
- 2 A concentração de HL e TBARS no plasma, fígado, rim e coração;
- 3 A concentração de ALP no soro sanguíneo;
- 4 A concentração de SAT no plasma, fígado e rim;
- 5 A concentração de GSH e a atividade de GPx no plasma, fígado, rim e coração;
- 6 A atividade da SOD e CAT no rim, fígado e coração.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tratamento dos animais e obtenção das amostras

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, (Proc. 001/2007). (ANEXO 1) Para este experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos obtidos do Biotério Central da FOB-USP. Estes animais (n=40), após o desmame, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais cada, os quais permaneceram em caixas plásticas (5 animais por caixa), durante 60 dias, no Biotério Central da FOB-USP, que possui temperatura e luminosidade controladas (25°C e 12 h de claro/escuro, respectivamente).

Durante todo o tempo experimental, os animais receberam ração e água *ad libitum*. As tabelas 1, 2 e 3 mostram a composição da ração AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993), a qual foi fornecida aos animais por conter baixo teor de fluoreto (menos que 3 µg/g), já que estudos prévios demonstraram que as rações comerciais têm teores de fluoreto superiores a 20 µg/g (BUZALAF *et al.*, 2004, 2005). A água fornecida aos diferentes grupos tinha concentrações distintas de fluoreto (na forma de NaF), a saber: 5, 15 ou 50 ppm (correspondendo a 5, 15 ou 50 mg/l, respectivamente), além de um grupo controle, ao qual foi fornecida apenas água deionizada. Essas doses de fluoreto foram escolhidas porque elas equivalem a doses aproximadas de 1, 3 ou 10 ppm de fluoreto na água de beber para humanos (DUNIPACE *et al.*, 1995). Essas doses correspondem a concentração de fluoreto que é tipicamente adicionada na água fluoretada artificialmente, concentrações

encontrada em água naturalmente fluoretada em regiões endêmicas de fluorose dental e esquelética, respectivamente (World Health Organization, 2006).

Tabela 1. Composição das dietas (g/100g) utilizadas no ensaio biológico.

COMPONENTES	g/100g
Caseína (*)	20,00
Óleo de soja	7,00
Mistura salina	3,50
Mistura vitamínica	1,00
Amido de milho	39,75
Dextrina	13,20
Sacarose	10,00
Celulose	5,00
Cistina	0,30
Colina	0,25

(*) % de proteína = % N x 6,25.

Tabela 2. Composição da mistura salina.

COMPONENTES	%
Molibdato de amônio - $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{29} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,0030
Carbonato de cálcio - CaCO_3	29,2900
Fosfato monoácido de cálcio - CaHPO_4	0,4300
Sulfato cúprico - CuSO_4^{+3}	0,1560
Citrato férrico - $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 4 (\text{H}_2\text{O})$	0,6200
Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,9800
Sulfato de manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1210
Iodeto de potássio - KI	0,0005
Fosfato monoácido de potássio - K_2HPO_4	34,3100
Cloreto de sódio - NaCl	25,0600
Selenito de sódio - Na_2SeO_3	0,0020
Cloreto de zinco - ZnCl_2	0,0200

Tabela 3. Composição da mistura vitamínica.

COMPONENTES	mg (*)
Vitamina A	90
Vitamina D	10
Biotina	2
Vitamina E	500
Vitamina K	225
Vitamina B6	100
Vitamina B12	0,13
Inositol	500
Niacina	450
Riboflavina	100
Cloridrato de tiamina	100
Ácido Fólico	9
Pantotenato de Cálcio	300
Ácido p-aminobenzóico	500
Cloridrato de colina	7.500,00
Ácido ascórbico	4.500,00
Dextrose para 100 g	85.113,87

(*) Exceto para vitaminas A e D, que estão em unidades internacionais.

Após o período experimental, foi verificado o peso corporal dos animais e em seguida eles foram eutanasiados através de decaptação (Insight Equipamentos, Guilhotina para decaptação - EB 271), sendo então coletadas amostras de sangue, além dos seguintes órgãos: rins, fígado e coração (figura 2).

Figura 2: Amostras dos tecidos coletados: fígado, rins e coração.

O sangue foi coletado em tubos de ensaio, com auxílio de funil e dividido em duas porções, sendo que uma foi transferida para tubos plásticos (tipo Eppendorf), homogenizada e posteriormente centrifugada a 12300 g por 10 minutos (Jouan A14) para obtenção do soro. Posteriormente, o soro foi armazenado -20°C para a análise de fosfatase alcalina. Para a obtenção do plasma, foi utilizada uma seringa plástica heparinizada (uma gota de Heparina contendo 5.000 UI/ml), homogenizado e o sangue foi transferido para tubos plásticos (tipo Eppendorf), e posteriormente centrifugado a 945 g por 5 minutos (Jouan A14). Este plasma obtido foi dividido e uma parte foi armazenada -20°C para análise de fluoreto e a outra, armazenada em nitrogênio líquido para as análises de antioxidantes.

Os rins foram coletados, pesados e a cápsula removida. Os rins destinados à análise de fluoreto (direitos) foram armazenados a -20°C , e os rins destinados às análises de antioxidantes (esquerdos) foram armazenados em nitrogênio líquido.

O fígado também foi retirado, pesado e dividido em duas porções. Uma delas foi armazenada a -20°C para posteriormente ser homogenizada para as análises de fluoreto, e a porção destinada às análises de antioxidantes foi armazenada em nitrogênio líquido.

O coração foi retirado, pesado, lavado em solução salina (NaCl 0,9%). Foi então dividido em duas porções, sendo uma armazenada a -20°C para posteriormente serem feitas as análises de fluoreto; a outra porção foi armazenada em nitrogênio líquido para as análises de antioxidantes.

4.2 Dosagem de Fluoreto

4.2.1 Plasma

Para a análise do fluoreto no plasma, 200 µl de amostra foram colocados em placa de Petri e sobre elas foi adicionado o ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer fluoreto residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram mantidas abertas por 15 minutos para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 ml com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por Taves (1968), modificado por Whitford (1996). Na tampa destas placas, foram colocados 50 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M, distribuídos em 3 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foram adicionados 2 ml de uma solução de hexametildisiloxano (HMDS – Aldrich) (HMDS em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, por um período de 12 horas. Após esse período, 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. A gota, contendo todo o fluoreto foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um microeletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Procyon SA 720 . 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. Foi feita uma curva de calibração utilizando padrões contendo diferentes quantidades de fluoreto (0,0048 - 0,95 µg).

4.2.2 Rim

As amostras de rim que haviam sido coletadas e estavam armazenadas foram homogenizadas utilizando uma proporção de 200 mg de tecido para 1 ml de água deionizada, utilizando o Homogenizador Marconi, modelo MA 102. A homogenização foi conduzida por 2 minutos.

Para as análises do tecido renal, foi utilizado 1 ml de homogenado, correspondente a 200 mg de tecido. Esses volumes foram pipetados em uma placa de Petri e submetidos à difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968) conforme modificado por Whitford (1996), como descrito para o plasma. No entanto, não foi feita a pré-difusão. Foi feita uma curva de calibração utilizando padrões contendo diferentes quantidades de fluoreto (0,0048 - 0,95 µg).

Figura 3: As amostras de rim, fígado, coração e plasma foram analisadas pela técnica de difusão facilitadas por HMDS. **A:** Placa de petri com a tampa previamente furada, contendo 1 ml de amostra (tecido após homogenização com água deionizada). **B:** Foi completado o volume para 2 ml com água deionizada na placa e na parte interna da tampa foram adicionados 50 μ l de NaOH 0,05 M. **C:** As placas foram fechadas e adicionados 2 ml de HMDS pelo orifício na tampa e depois feito vedamento com vaselina, estando as placas prontas para o processo de difusão do fluoreto. **D:** Leitura das amostras utilizando eletrodo íon específico (Orion 9409) e eletrodo calomelano.

4.2.3 Fígado

No tecido hepático foi feito o mesmo procedimento como descrito para o tecido renal, alterando-se apenas a proporção utilizada de tecido:água (400 mg:ml).

Para análise de fluoreto no fígado, foi utilizado um volume da amostra (1 ml de homogenado) correspondente a 400 mg de tecido hepático. Esses volumes foram pipetados em uma placa de Petri e submetidos à difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968) conforme modificado por Whitford (1996), como descrito para o tecido renal. Foi feita uma curva de calibração utilizando padrões com diferentes quantidades de fluoreto (0,0048 - 0,95 μg).

4.2.4 Coração

O tecido cardíaco foi homogenizado em água deionizada (200 mg:ml), utilizando o Homogenizador Marconi, modelo MA 102. A homogenização foi conduzida por 2 minutos.

Para análise de fluoreto no coração, foi utilizado um volume de amostra (1 ml de homogenado) correspondente a 200 mg de tecido cardíaco. Esses volumes foram pipetados em uma placa de Petri e foram submetidos à difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968), conforme modificado por Whitford (1996) como descrito para o tecido renal e hepático. Foi feita uma curva de calibração utilizando padrões contendo de 0,0048 - 0,95 μg de fluoreto.

4.2.5 Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o fluoreto das amostras, eliminando interferentes, permitindo ao mesmo tempo concentrá-las, o que incrementa o limite de detecção da concentração de fluoreto pelo eletrodo íon-sensível, que é de 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Uma vez que nossas

amostras têm um volume final de 75 μl após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de fluoreto acima de 0,0015 μg . Considerando que os níveis de fluoreto plasmáticos em animais controle giram em torno de 0,038 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se 200 μl de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de fluoreto de 0,0076 μg , portanto, acima do limite de detecção do eletrodo.

As soluções padrão contendo diferentes quantidades de fluoreto (0,0095-1,9 μg) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de uma solução estoque padrão contendo 0,1 M fluoreto (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma a serem analisadas. Foi feita uma primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivolt (mV) foram convertidas para μg de fluoreto, 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 fluoreto medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ 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 0,2 M) usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a terem exatamente as mesmas concentrações de fluoreto que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras em mV mostrou que o $[\text{F}^-]$ nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Também foi feita uma sequência de padrões que receberam ácido aquecido da mesma maneira que as amostras. As leituras em mV foram similares 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.

4.3 Preparo das amostras

As amostras de rim, fígado e coração foram homogenizadas utilizando uma proporção de 1:5 (1 g de tecido para 5 ml de tampão), com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e 110 µl de BHT 1%. Para tal, foi usado o Homogenizador Marconi, modelo MA 099, por 2 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos a 6700 g. Do sobrenadante coletado, foram feitas alíquotas e mantidas a -80°C para as análises de TBARS, SAT e HL.

Os tecidos (renal, hepático e cardíaco) foram homogenizados com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 utilizando Homogenizador Marconi, modelo MA 099 por 2 minutos, sendo centrifugado a 1500 g por 10 minutos. As alíquotas do sobrenadante obtido foram armazenadas a -80°C. Os mesmos foram utilizados para as dosagens de dosagens de CAT, SOD (somente rim e coração) e GPx. Para o preparo destas amostras, a proporção tecido/tampão utilizada para o fígado e o rim foi de 1:5 (1 g tecido para 5 ml tampão), e para o coração foi de 1:2 (1 g de tecido para 2,5 ml de tampão).

4.4 Dosagem de hidroperóxidos de lipídio (HL)

Para a dosagem de HL nas amostras de fígado, rim e coração, foi utilizada a técnica de Jiang et al. (1991). Previamente, foi preparada a mistura reativa. Para tal, foi feita uma solução de metanol 90%, e à mesma foi adicionado alaranjado de xilenol 0,12 mM, BHT 445 mM, ácido sulfúrico concentrado 28 mM e sulfato ferroso amoniacal 0,28 mM. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, tendo sido preparada no dia em que foram feitas as dosagens.

O sobrenadante previamente preparado foi utilizado para as análises, além das amostras de plasma. Como as amostras eram muito concentradas, foi necessário diluí-las com tampão (fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0). Para os tecidos renal e hepático, foi feita uma diluição de 6X (5 µl de amostra e 25 µl de tampão). Já para o tecido cardíaco, a diluição foi de 2X (15 µl de amostra e 15 µl de tampão). O plasma foi diluído 60X (0,5 µl de amostra e 29,5 µl de tampão). Para as análises, em cada poço da microplaca, foram adicionados 30 µl de amostra e 270 µl da mistura reativa e deixou-se por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após esse tempo, foi feita a leitura das amostras em leitora de microplaca a 560 nm.

Os resultados foram convertidos para µmol/g tecido utilizando o coeficiente de extinção molar ($4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Para tal, foi utilizada a equação abaixo (Eq. 7):

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right) = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times l} \times \text{diluição} \quad \text{Equação 7}$$

ϵ = coeficiente de extinção molar

l = distância percorrida pela luz através da substância

4.5 TBARS (Lipoperoxidação)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram mensuradas de acordo com Buege e Aust (1978) nas amostras de rim, fígado, coração e plasma. 400 µl de sobrenadante foram incubados com 800 µl de uma solução de TBA-TCA-HCl (ácido tiobarbitúrico 0,375%, ácido tricloroacético 15%, ácido clorídrico 0,25 M), em banho fervente por 15 minutos, sendo então transferidos imediatamente para banho de gelo e mantidos por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 13400 g por 5 minutos. Na sequência, foi coletado o sobrenadante e medida a absorbância a 535 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Reino Unido). Para zerar o aparelho foi feito um branco da mesma forma que as amostras, substituindo a amostra por 400 µl de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0).

Para a determinação de TBARS foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), de acordo com a equação 8 (Eq. 8).

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right) = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times l} \times \text{diluição} \quad \text{Equação 8}$$

ϵ = coeficiente de extinção molar

l = distância percorrida pela luz através da substância

4.6 Dosagem de Fosfatase Alcalina (ALP) no soro

As amostras de soro que foram previamente coletadas foram utilizadas para as análises de ALP. Para tal, foi utilizado um kit comercial (kit fosfatases)

(Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda, Goiânia), sendo que todas as soluções utilizadas para a dosagem foram provenientes do kit.

As análises foram feitas em microplaca, sendo que, em cada poço foram adicionados 20 µl de substrato e 4,5 µl de tampão pH 10,3, e feita incubação a 37°C por 2 minutos. Depois disto, foram adicionadas as amostras (2,5 µl) e incubou-se novamente a placa a 37°C durante 10 minutos. Depois disto, foram adicionados 250 µl de NaOH 0,1 M e foi feita a leitura da absorbância a 410 nm, utilizando a leitora de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha).

Uma curva de calibração em triplicata foi feita, juntamente com as amostras, utilizando padrões de fosfatase alcalina, com diferentes concentrações (3,75-18,75 UI/l). Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Após a obtenção dos resultados em absorbância foram feitos os cálculos (Eq. 9), de acordo as instruções contidas no kit.

$$ALP \left(\frac{UI}{l} \right) = abs. \times \text{fator} \quad \text{Equação 9}$$

4.7 Substâncias Antioxidantes Totais (SAT)

Foi utilizado o kit comercial, Antioxidant Assay Kit (CS0790, Sigma) para a dosagem de antioxidantes nas amostras de rim, fígado e plasma. Em cada poço da microplaca foram adicionados 10 µl dos padrões previamente preparados ou 10 µl de amostra, 20 µl de solução de trabalho de mioglobina (mioglobina diluída 100

vezes) e 150 µl de solução de trabalho de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS com H₂O₂ 3%).

Incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois foram adicionados 100 µl de solução de parada, agitou-se e foi feita a leitura a 405 nm, utilizando a leitora de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha).

Devido à concentração das amostras de fígado e rim, foi necessário diluí-las quatro vezes, utilizando tampão de trabalho (contido no kit). Já para as amostras de plasma, não foi feita diluição.

Foi feita uma curva de calibração em duplicata, utilizando os padrões de trolox contidos no kit, com diferentes concentrações (0,015 - 0,420 mM).

Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Após a obtenção dos resultados em absorbância foram feitos os cálculos (Eq 10), de acordo as instruções contidas no kit.

$$X \text{ (mM)} = \left(\frac{\text{Abs-intercepção}}{\text{Slope}} \right) \times \text{diluição} \quad \text{Equação 10}$$

4.8 Atividade da glutathiona reduzida (GSH)

A GSH foi mensurada como descrito por Hissin e Hilf (1973). Em resumo, 50 mg de amostras de rim e coração foram homogenizadas com 750 µl de tampão fosfato 0,1 M com EDTA 5 mM e 200 µl de ácido metafosfórico a 25%, que foi utilizado como agente precipitante das proteínas. Já as amostras de fígado (50 mg)

foram homogeneizadas no moinho criogênico (Eppendorf AG 22331, Hamburgo, Alemanha) em 750 µl de tampão fosfato 0,1 M com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 5 mM e 200 µL de ácido metafosfórico a 25%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4°C, coletando o sobrenadante. Para o fígado, o sobrenadante (0,5 ml) foi diluído com 4,5 ml de tampão fosfato pH 8 (diluição de 10 vezes). Já para o plasma, rim e coração, a diluição foi de 5 vezes. Em sequência, adicionou-se 1,8 ml de tampão fosfato com EDTA a 0,1 ml do sobrenadante e 0,1 ml de OPT (orto-fitalaudeído) diluído em metanol (1 mg OPT:1 ml metanol) e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. A fluorescência (Molecular Devices, Spectra Max M2, Sunnyvale, Estados Unidos) foi determinada a 420 nm com excitação em 350 nm.

Com os resultados em unidades relativas de fluorescência (RFU), fizeram-se os cálculos utilizando a equação da reta, obtendo então os resultados em µg GSH/mg de tecido, resultado que foi posteriormente convertido para nmol/mg tecido.

4.9 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi mensurada como descrito por Flohe e Gunzler (1984) nas amostras de rim, fígado, coração e plasma.

O sobrenadante preparado previamente a partir das amostras dos diferentes tecidos, bem como as amostras de plasma foram centrifugados a 10.000 g por 30 minutos, a 4°C. O novo sobrenadante foi utilizado para as análises de GPx.

A reação foi feita utilizando 300 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, 200 µl de GSH a 2 mM, 100 µl de H₂O₂ 1 mM e 300 µl de sobrenadante, sendo incubado a 37°C por 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 500 µl de TCA 5%.

Depois, as amostras foram centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. Para cada 100 µl de sobrenadante foram adicionados 200 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 700 µl de ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzóico) DTNB (0,4 mg/ml). A absorbância foi lida a 420 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Foi feita uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de GSH (0,25 - 2 mM). Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Com os resultados em absorbância, calculou-se a concentração das amostras de acordo com a equação 11.

$$X \text{ (nmol)} = \left(\frac{\text{Abs-intercepção}}{\text{Slope}} \right) \quad \text{Equação 11}$$

Com os resultados das amostras, calculou-se o consumo de GSH. Como o tempo de reação foi de 15 minutos, divide-se o resultado por 15 para se obter o consumo/ minuto. Após dividiu-se o resultado pela concentração de proteínas e se obteve um resultado em nmol/min*mg proteínas. Pode-se utilizar os resultados em nmol/min*mg proteínas ou ainda é possível fazer a conversão para µg GSH/min*mg proteínas.

4.10 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada pela técnica modificada de Kakkar et al. (1984) para as amostras de rim e coração. O sobrenadante obtido previamente

foi novamente centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, e este novo sobrenadante foi utilizado para as análises de SOD.

A reação foi feita com 1 ml de tampão pirofosfato de sódio 0,052 mM (pH 7,0), 100 µl de meta sulfato de fenazina a 186 µM, 300 µl de azul de nitro-tetrazólio (NBT) a 300 µM e 200 µl do sobrenadante, sob agitação. A reação foi iniciada pela adição de 400 µl de NADH a 780 µM e após 5 minutos a reação foi paralisada pela adição de 1 ml de ácido acético glacial. A intensidade de cor foi lida a 560 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Já para as amostras de fígado, a atividade foi mensurada utilizando a técnica de Beauchamp e Fridovich (1971). Para essa análise, as amostras de fígado foram trituradas em moinho criogênico (6770 Freezer/Mill, SPEX CERTIPREP, Stanmore, UK). Este equipamento permite que as amostras sejam homogenizadas utilizando nitrogênio líquido, sem que as mesmas se descongelassem. Após a homogenização, para cada 50 mg de tecido hepático foi adicionado 1 ml de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,8) e então foi feita centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Como as amostras estavam muito concentradas, foram diluídas 100 vezes utilizando o mesmo tampão.

Para a realização da dosagem, em uma cubeta foram adicionados 960 µl de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,8), 10 µl de xantina 5 mM, 10 µl de NBT 10 mM, 10 µl de amostra, 10 µl de EDTA 10 mM e 5 µl de xantina oxidase diluída 20 vezes (em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM, pH 7,8). Então, foi feita a leitura da absorbância a 550 nm a cada minuto durante 3 minutos a 25°C, para determinar o $\Delta\text{abs}/\text{min}$.

Após as análises, foram feitos os cálculos matemáticos abaixo descritos (Eq. 12 e 13) para se determinar a quantidade de SOD presente nas amostras.

$$\text{SOD \% inibição} = \frac{(\Delta\text{abs/min B}) - (\Delta\text{abs/min A})}{\Delta\text{abs/min B}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

A= amostra

B= controle sem material biológico (tampão no lugar da amostra)

Sendo que 1 unidade é a quantidade de enzima que causa 50% de inibição da reação.

O resultado obtido acima (SOD % de inibição) é utilizado na fórmula abaixo descrita para se determinar a quantidade de SOD em unidades.

$$\text{SOD U} = \left(\frac{\% \text{ inibição} / 50}{\text{Volume A}} \right) \times \text{diluição} \quad \text{Equação 13}$$

O resultado obtido (em unidades de SOD) é dividido pela concentração de proteínas, de forma a se obter o resultado final em unidades de SOD por mg de proteína (U/mg).

4.11 Atividade da Catalase (CAT)

A dosagem de CAT foi feita nas amostras de rim, fígado e coração, utilizando a técnica de Sinha (1972). Foi necessário diluir os sobrenadantes obtidos anteriormente para as dosagens de CAT. As amostras de fígado foram diluídas 50 vezes e as de rim e de coração, 10 vezes, utilizando tampão fosfato para essas diluições.

Assim, 100 µl do sobrenadante foram incubados com 500 µl de H₂O₂ 0,27 mM a 37°C por 90 segundos. Depois foi adicionado dicromato de potássio 5% em

ácido acético glacial (1:3), e as amostras foram incubadas por 15 minutos em banho fervente. Ao final do tempo foi lida a absorbância a 570 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Foi feita uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de H_2O_2 (0,17-2,7 mM). Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Com os resultados (absorbância) obtidos utilizou-se a equação abaixo (Eq 14) para se calcular a concentração de CAT nas amostras.

$$X \text{ (mM)} = \left(\frac{\text{Abs-intercepção}}{\text{Slope}} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Com os resultados em mM foram feitos os cálculos para se saber a concentração em 60 segundos, já que a reação foi feita em 90 segundos. O resultado então foi dividido pela concentração de proteínas calculadas previamente para se ter um resultado em $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteínas.

4.12 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Instat versão 3.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, EUA). Inicialmente foi checada a normalidade (teste de Kolmogorov and Smirnov) e a homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados.

Para os resultados do peso corporal, peso dos rins, peso do fígado, peso do coração, concentração de fluoreto no plasma e no coração, concentração de ALP no soro, concentração de HL nas amostras de rim, fígado e coração, SAT no fígado

e no rim, SOD no fígado e no coração, GSH no fígado, rim, plasma e no coração, TBARS no rim, coração e plasma, CAT no rim e coração, GPx no coração, sendo estes critérios satisfeitos, os dados foram avaliados por ANOVA e o teste de Tukey foi usado como *post hoc* para a ANOVA.

Já para os resultados de concentração de fluoreto no fígado e no rim, GPx no fígado e rim HL no plasma e CAT no fígado, os dados tiveram distribuição normal, mas não houve homogeneidade de desvios-padrão, sendo então analisados por ANOVA, após transformação logarítmica. O teste de Tukey foi usado como *post hoc* para a ANOVA.

Para as análises de TBARS no fígado, SOD no rim, SAT no plasma e GPx no plasma os dados não se apresentaram homogêneos, mesmo após transformação e foram então analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais e das amostras coletadas

Os valores médios e desvio padrão do peso corporal dos animais estão representados na figura 4. O peso médio das amostras de rins, fígado e coração para todos os grupos experimentais são apresentados nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

Com relação ao peso dos animais, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (ANOVA), referentes aos dados de peso dos animais ($F=2,391$, $p=0,087$), ao peso do coração ($F=0,4763$, $p=0,7010$), ao peso do rim direito ($F=0,5388$, $p=0,6591$) e ao peso do rim esquerdo ($F=0,6730$, $p=0,5749$). O peso corporal dos animais de todos os grupos, em geral, oscilou entre 268-293 g. O peso do coração, nos grupos estudados, foi de aproximadamente 1,2 g. Quanto ao peso dos rins, tanto direito como esquerdo, os valores foram similares para os grupos estudados, variando entre 0,99 e 1,18 g. Já em relação ao peso do fígado, foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $F=4,936$, $p=0,0064$) e o teste de Tukey revelou que embora se tenha observado um aumento no peso do fígado dos grupos tratados em relação ao controle (7,33 g), essa diferença só foi significativa entre o grupo controle e o grupo de 15 ppm (8,43 g) de fluoreto.

Figura 4. Peso corporal médio dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 5. Peso médio dos rins direito e esquerdo dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 6. Peso médio do fígado dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. Peso médio do coração dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.2 Fluoreto

As concentrações de fluoreto obtidas para as amostras de plasma são apresentadas na figura 8. Foi observada diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $F=45,081$, $p<0,0001$) e o teste de Tukey revelou que apenas o grupo de 50 ppm de fluoreto apresentou concentrações significativamente maiores ($0,094 \mu\text{g/ml}$) em relação aos demais grupos ($0,032$, $0,027$ e $0,043 \mu\text{g/ml}$ para os grupos controle, 5 ppm e 15 ppm, respectivamente), sendo que estes não diferiram significativamente entre si. Para os rins, foi observado um efeito dose-resposta, sendo que os valores aumentaram de $0,045$ até $0,245 \mu\text{g/g}$ de acordo com o aumento da concentração de fluoreto na água de beber, com diferença significativa em todos os grupos ($F=102,63$, $p<0,0001$) (figura 9). Em relação ao fígado, também houve diferenças significativas entre os grupos ($F=13,540$, $p<0,0001$). O maior valor encontrado foi para o grupo de 50 ppm de fluoreto ($0,023 \mu\text{g/g}$), que diferiu significativamente dos demais grupos ($0,009$, $0,010$ e $0,014 \mu\text{g/g}$ para os grupos controle, 5 ppm e 15 ppm, respectivamente) (fígado 10). O menor valor foi observado para o grupo controle, que diferiu significativamente de todos os grupos, com exceção do grupo de 5 ppm de fluoreto. Já para o coração, cujos resultados são apresentados na figura 11, não houve diferenças significativas entre os grupos ($F=1,996$, $p=0,1343$), embora os valores apresentados para os grupos de 15 ($0,021 \mu\text{g/g}$) e 50 ppm ($0,023 \mu\text{g/g}$) de fluoreto tenham sido ligeiramente maiores que aqueles encontrados para os grupos controle ($0,017 \mu\text{g/g}$) e de 5 ppm ($0,011 \mu\text{g/g}$).

Figura 8 . Concentração média de fluoreto nas amostras de plasma (µg/ml) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 9. Concentração média de fluoreto nas amostras de rim (µg/g) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 10. Concentração média de fluoreto nas amostras de fígado (µg/g) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 11. Concentração média de fluoreto nas amostras de coração (µg/g) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.3 Dosagem de HL

Os valores da concentração de HL no rim estão resumidos na figura 12. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi detectada (ANOVA, $F=4,783$, $p=0,0075$). Todos os grupos experimentais apresentaram um aumento na concentração quando comparados ao controle ($0,704 \mu\text{mol/g}$ de tecido), mas esta diferença só foi significativa para o grupo de 15 ppm de fluoreto ($1,229 \mu\text{mol/g}$ de tecido).

Para o fígado, foi detectada diferença significativa entre os grupos ($F=4,198$, $p=0,0130$). Assim como para o rim, também houve um aumento da concentração nos grupos tratados em relação ao controle, embora a diferença tenha sido significativa apenas entre o grupo controle ($1,358 \mu\text{mol/g}$ de tecido) e os grupos de 5 e 50 ppm de fluoreto ($2,425$ e $2,449 \mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente) (figura 13).

Em contrapartida, no coração os resultados, apresentados na figura 14, foram similares para todos os grupos (aproximadamente $0,9 \mu\text{mol/g}$ de tecido), não havendo diferenças significativas ($F=1,245$, $p=0,3103$).

A análise das amostras de plasma evidenciou diferenças significativas (ANOVA, $F=7,354$, $p=0,001$). Houve uma diminuição significativa em todos os grupos tratados com fluoreto em relação ao controle, sendo que o menor valor obtido foi para o grupo de 15 ppm de fluoreto ($0,209 \mu\text{mol/g}$ de tecido), cerca de 80% menor que o grupo controle ($1,013 \mu\text{mol/g}$ de tecido) (figura 15).

Figura 12. Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de rim ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 13. Concentração média de hidroperóxido de lipídio nas amostras de fígado ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 14. Concentração média de hidropéroxido de lipídio nas amostras de coração ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 15. Concentração média de hidropéroxido de lipídio nas amostras de plasma ($\mu\text{mol/ml}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).

5.4 Dosagem de TBARS

As concentrações obtidas para as amostras de rim (figura 16) e coração (figura 18) foram bastante semelhantes em todos os grupos, não tendo havido diferença significativa entre os mesmos ($F=2,314$, $p=0,0952$ e $F=1,554$, $p=0,221$, respectivamente). Os valores para as amostras de rim oscilaram entre 0,064 e 0,077 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, enquanto no coração ficaram na faixa entre 0,065 e 0,079 $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

Por outro lado, na dosagem no fígado foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($KW=7,916$, $p=0,0478$), sendo que os grupos tratados com fluoreto apresentaram valores menores quando comparados ao controle (0,067 $\mu\text{mol/g}$ de tecido), mas essa diferença só foi significante para o grupo de 15 ppm de fluoreto (0,047 $\mu\text{mol/g}$ de tecido) (figura 17).

Nos resultados para as amostras de plasma não houve diferença estatisticamente significativa ($F=0,9968$, $p=0,4120$), embora os grupos de 5 e 50 ppm de fluoreto (0,34 e 0,28 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente) tenham tido uma ligeira diminuição em relação aos demais grupos (figura 19).

Figura 16. Concentração média de TBARS nas amostras de rim ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 17. Concentração média de TBARS nas amostras de fígado ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 18. Concentração média de TBARS nas amostras de coração ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 19. Concentração média de TBARS nas amostras de plasma ($\mu\text{mol/ml}$) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

5.5 Dosagem de ALP

Os resultados obtidos na dosagem de ALP no soro mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle (ANOVA, $F = 14,783$, $p < 0,0001$). Houve uma redução na concentração de ALP nos grupos de 5 e 50 ppm de fluoreto (3,03 e 4,34 UI/l, respectivamente) em relação ao controle (4,82 UI/l), assim como um aumento significativo do grupo de 15 ppm (6,34 UI/l) em relação aos demais grupos (Figura 20).

Figura 20. Concentração média de ALP nas amostras de soro (UI/l) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.6 Dosagem de SAT

Notou-se diferença estatisticamente significativa entre os resultados de SAT nas amostras de rim dos grupos experimentais ($F=15,423$, $p<0,0001$), sendo que um efeito dose-resposta inverso foi observado (figura 21). Houve uma diminuição significativa em todos os grupos experimentais quando comparados com o controle (2,23 mmol/g tecido).

Em relação aos resultados para as amostras de fígado, houve diferença significativa entre os grupos ($F=162,23$, $p<0,0001$). As concentrações para os grupos de 15 e 50 ppm de fluoreto foram similares (2,52 e 2,37 mmol/g tecido, respectivamente), mas significantemente maiores em relação ao controle (1,32 mmol/g tecido) e ao grupo de 5 ppm (1,25 mmol/g tecido) (figura 22).

Para as amostras de plasma, todos os valores foram semelhantes (50 ppm- 0,37 mmol/g tecido) não tendo diferenças significativas entre os grupos. ($KW=2,796$, $p=0,4242$) (figura 23).

Figura 21. Concentração média de SAT nas amostras de rim (mmol/g tecido) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 22. Concentração média de SAT nas amostras de fígado (mmol/g tecido) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 23. Concentração média de SAT nas amostras de plasma (mmol/ml) dos animais em relação as diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

5.7 Dosagem de GSH

Para as amostras de rim, houve diferença significativa entre os grupos ($F=3,843$, $p=0,0177$), tendo sido observada uma redução na concentração de GSH nos grupos tratados com fluoreto em relação ao controle, embora esta diferença só tenha sido significativa entre o grupo controle (3,29 nmol/mg tecido) e o tratado com alta concentração de fluoreto (50 ppm, 2,34 nmol/mg tecido) (figura 24).

As amostras de fígado (figura 25) e coração (figura 26) apresentaram o mesmo perfil de concentração de GSH, havendo um pequeno aumento nos grupos tratados (fígado: 14,04 e 19,54 nmol/mg tecido para os grupos controle e 50 ppm, respectivamente; coração: 8,66 e 12,08 nmol/mg para os grupos controle e 50 ppm, respectivamente. Entretanto, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos, para ambos os órgãos ($F=1,269$, $p=0,2996$ e $F=0,4567$, $p=0,7151$ para fígado e coração, respectivamente).

As amostras de plasma (figura 27) mostraram um perfil inverso ao apresentado para as amostras de fígado e coração. Houve uma diminuição para os grupos tratados quando comparados ao controle, embora a diferença não tenha sido significativa. ($F=0,8923$, $p=0,4547$).

Figura 24. Concentração média de GSH nas amostras de rim (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 25. Concentração média de GSH nas amostras de fígado (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 26. Concentração média de GSH nas amostras de coração (nmol/mg tecido) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 27. Concentração média de GSH nas amostras de plasma (nmol/ml) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.8 Dosagem de GPx

A análise das amostras de rim mostrou diferença significativa entre os grupos ($F= 12,231$, $p<0,0001$). Os grupos tratados com fluoreto apresentaram diferenças significativas entre si e o grupo controle ($0,31 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) só diferiu do grupo de 50 ppm de fluoreto, sendo que este apresentou a menor atividade de GPx ($0,17 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) (figura 28).

Para análise do fígado (figura 29), houve um ligeiro aumento em todos os grupos tratados (aproximadamente $0,112 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) quando comparados com o controle ($0,093 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($F=0,8131$, $p=0,4964$).

Na figura 30 são reunidos os resultados para as amostras de coração, onde houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $F=7,398$, $p=0,0006$). Notou-se que o maior valor foi para o grupo de 15 ppm ($0,319 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) de fluoreto diferindo significativamente dos grupos controle ($0,139 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) e de 5 ppm ($0,203 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) de fluoreto.

Já para as amostras de plasma, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($KW=5,661$, $p=0,1293$), sendo os valores dos grupos em torno de $0,025 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína (figura 31).

Figura 28. Concentração média de GPx nas amostras de rim (µg/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 29. Concentração média de GPx nas amostras de fígado (µg/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 30. Concentração média de GPx nas amostras de coração (µg/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 31. Concentração média de GPx nas amostras de plasma (µg/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.9 Dosagem de SOD

Na análise do rim houve diferença significativa entre os grupos (KW=15,956, $p=0,0012$). O grupo de 50 ppm de fluoreto (0,41 U/min*mg proteína) apresentou uma diminuição de aproximadamente 50% em relação aos demais grupos (em torno de 0,8 U/min*mg proteína), embora essa diferença só foi estatisticamente significativa para os grupos controle e de 5 ppm de fluoreto (figura 32).

Nos resultados da análise do fígado, apresentados na figura 33, foi identificada uma diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $F=7,516$, $p=0,0006$). A maior concentração de SOD foi observada para o grupo de 15 ppm (25,17 U/min*mg proteína), que diferiu significativamente dos grupos controle (19,76 U/min*mg proteína) e 5 ppm (16,82 U/min*mg proteína), mas não do grupo de 50 ppm (21,4 U/min*mg proteína) de fluoreto.

Já para o coração (figura 34), não houve diferença estatística entre os grupos ($F=2,148$, $p=0,1123$), tendo os valores médios oscilado entre 1,45 e 2,03 U/min*mg proteína.

Figura 32. Concentração média de SOD nas amostras de rim (U/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 33. Concentração média de SOD nas amostras de fígado (U/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 34. Concentração média de SOD nas amostras de coração (U/min*mg proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5.10 Dosagem de CAT

Para as amostras de rim (figura 35), os resultados foram muito similares (aproximadamente 3,4 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteínas) e nenhuma diferença significativa foi notada (ANOVA, $F=0,9800$, $p=0,4157$). O mesmo foi observado para as amostras de coração, ($F=2,150$, $p=0,1192$), embora tenha havido uma diminuição da concentração de 50% para as amostras de 15 ppm (0,314 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteínas) de fluoreto em relação aos outros grupos (0,622, 0,452 e 0,68 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteínas para os grupos controle, 5 ppm e 50 ppm, respectivamente) (figura 37).

Em contraposição, nas amostras do fígado, houve uma diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $F=19,442$, $p<0,0001$). Houve uma diminuição em todos os grupos experimentais (9,04, 6,74 e 7,3 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteínas para os grupos 5 ppm; 15 ppm e 50 ppm, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (11,37 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteínas). O grupo de 15 ppm de fluoreto apresentou o menor valor, com diferença estatisticamente significativa para os grupos controle e de 5 ppm, mas não diferiu do grupo de 50 ppm (figura 36).

Figura 35. Concentração média de CAT nas amostras de rim ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 36. Concentração média de CAT nas amostras de fígado ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 37. Concentração média de CAT nas amostras de coração ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) dos animais em relação às diferentes concentrações de fluoreto administradas a partir da água de beber. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O fluoreto tem sido amplamente utilizado como um agente terapêutico para a cárie dentária devido à sua capacidade de diminuir o processo de desmineralização e acelerar a remineralização (BUZALAF et al., 2011). Dentre os métodos de utilização do fluoreto no controle da cárie, a fluoretação da água de abastecimento público e a escovação com dentifrícios fluoretados são os mais comumente empregados (BURT, 1992; PENDRYS et. al., 1997; LEVY et al., 1995; MASCARENHAS, 2000; BUZALAF et al., 2001; SAMPAIO; LEVY, 2011; PESSAN et al., 2011). Entretanto, a ingestão excessiva de fluoreto pode causar efeitos colaterais, sendo que a fluorose dentária é o mais comum (DENBESTEN; LI, 2011). Isto implica que a ingestão de fluoreto precisa ser controlada. (BUZALAF; LEVY, 2011).

Depois da ingestão do fluoreto, este íon é absorvido principalmente pelo trato gastro intestinal, atingindo o sistema circulatório (BUZALAF; WHITFORD, 2011). O plasma é um importante indicador da ingestão de fluoreto, tanto em exposição aguda (WHITFORD, 1996; BUZALAF et al., 2004, 2005) como crônica (WHITFORD, 1996; CARVALHO et al., 2006, 2008, 2009; LEITE et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2010).

6.1 Plasma

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura, uma vez que houve um aumento da concentração de fluoreto no plasma com o aumento da concentração de fluoreto na água de beber dos ratos (LEITE et al., 2008;

CARVALHO et al., 2006, 2008, 2009; KOBAYASHI et al, 2010). Isto acontece porque o plasma representa o compartimento central a partir do qual o fluoreto é distribuído para todo o organismo e excretado principalmente pela urina (BUZALAF; WHITFORD, 2011). Neste estudo, o grupo tratado com 5 ppm de fluoreto apresentou concentrações plasmáticas deste íon semelhantes ao controle. Isto foi observado em estudos passados do nosso grupo que utilizaram o mesmo protocolo de tratamento (CARVALHO et al., 2006, 2008; LEITE et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2010) e pode ser parcialmente explicado pela incorporação do fluoreto em tecidos mineralizados (EKSTRAND et al., 1977).

Já em relação aos resultados obtidos para as dosagens de GPx, GSH, SAT e TBARS, não foi possível detectar nenhuma diferença entre os grupos tratados com fluoreto, diferente do que foi encontrado por Morales-González e colaboradores (2010), uma vez que, houve um aumento de SOD, CAT, GPx além de MDA em eritrócitos de animais tratados por 8 semanas com 50 ppm de fluoreto. Resultados semelhantes aos encontrados por Shivarajashanka et al. (2001), que também viram um aumento de MDA, GSH, GPx e SOD em eritrócitos de ratos tratados por 4 meses com 100 ppm de fluoreto, provavelmente porque estes trabalhos foram feitos em eritrócitos. Os fluidos extracelulares, como plasma, fluido seminal, cerebrospinal, geralmente contêm pouca ou nenhuma atividade de CAT. Às vezes, traços podem ser detectados por terem extravasado de células, por exemplo, durante a centrifugação do sangue para obtenção do plasma, situação em que pode ocorrer uma leve hemólise (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os níveis de GSH, GPx e SOD também são geralmente baixos nos fluidos extracelulares. A concentração de GSH no plasma em ratos, por exemplo, pode variar de 20 a 30 μM , mas este não pode ser utilizado como um valor padrão, uma vez que diferentes fatores podem

influenciar a concentração, como idade e gênero do animal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em relação à concentração de HL, houve uma redução nos grupos tratados em relação ao controle, sendo que para o grupo de 15 ppm esta redução foi estatisticamente significativa. Também para a fosfatase alcalina não houve alterações no grupo tratado com a dose mais alta de fluoreto, enquanto uma diminuição foi observada no grupo tratado com 5 ppm de fluoreto e um aumento no grupo tratado com 15 ppm de fluoreto. É possível que a dose mais alta de fluoreto tenha levado a alterações metabólicas mais pronunciadas em curto prazo, visando a evitar a toxicidade, de forma que após 60 dias o organismo já havia conseguido restabelecer o equilíbrio, enquanto que doses menores podem ter levado a alterações mais brandas porém persistentes, ainda observáveis após 60 dias de tratamento (DĄBROWSKA et al. 2006, SATOH et al. 2005). Entretanto, estudos adicionais são necessários para se testar esta hipótese. A fosfatase alcalina tem sido relatada como uma enzima alvo da intoxicação por fluoreto. Alta atividade desta enzima no plasma reflete uma formação anormal de osso estimulado pela atividade de osteoblastos (BHARTI et al., 2007; SINGH; SWARUP, 1994), o que é consistente com trabalhos que revelam efeito anabólico do fluoreto no tecido ósseo (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010). Entretanto, o aumento da concentração de fosfatase alcalina também pode ser um indicativo de alterações no funcionamento hepático, já que a atividade da referida enzima é usada como meio de diagnóstico em humanos para alterações no fígado (LIMDI; HYDE, 2003). Deve ser ressaltado que as diferenças encontradas nos ratos do presente estudo, a princípio poderiam não ser indicativo de danos hepáticos nem de desordens ósseas, pois foi utilizado um kit comercial e, segundo o fabricante, para que as alterações na

concentração possam ser um indicativo de uma desordem hepática, os valores obtidos deveriam ser 10 vezes superiores ao maior valor de referência indicado no kit (valores de referência: 13-45 UI/l). Já para problemas ósseos, essa concentração deveria ser entre 10-25 vezes maior que o maior valor de referência, o que não foi o caso.

6.2 Fígado

Os níveis de fluoreto encontrados no fígado foram menores que os observados para o plasma. Isto era esperado, porque os níveis intracelulares deste íon são tipicamente 10-50% menores que os níveis plasmáticos ou no fluido intersticial. (BUZALAF; WHITFORD, 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho para as análises de GSH e GPx não se alteraram nos grupos tratados com fluoreto na água de beber. Estes resultados são diferentes dos relatados por Shivarajashankara et al. (2001), onde houve um aumento de GPx e GSH; isto poderia ser explicado pelas diferenças na dose administrada de fluoreto (100 ppm X 50 ppm no presente trabalho) e tempo experimental (4 meses X 2 meses).

Embora não se tenha visto um aumento de GSH nos grupos tratados com fluoreto, os valores obtidos para as análises no tecido hepático são as maiores concentração em relação aos demais tecidos estudados no presente trabalho, o que parece estar em concordância com a literatura, que mostra que as maiores concentrações de GSH encontradas são no fígado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Já para os resultados de CAT, no presente estudo houve uma diminuição nos grupos tratados quando comparados ao controle, dados estes semelhantes aos encontrados na literatura. Shanthakumari e colaboradores (2004), mostraram que animais tratados com 25 ppm de fluoreto por 8 ou 16 semanas tiveram a concentração de CAT reduzida em quase 50% quando comparados ao grupo controle. Entretanto, no presente trabalho, houve um aumento na atividade hepática da SOD mediante exposição ao fluoreto, embora este só tenha sido significativo para o grupo de 15 ppm de fluoreto. Estes resultados sugerem que, no fígado, mediante exposição a altas doses de fluoreto, ocorre um acúmulo de H_2O_2 , uma vez que sua formação estaria aumentada pela maior concentração de SOD, e sua decomposição diminuída, pela menor concentração da CAT.

Em relação à peroxidação lipídica, os resultados observados para o fígado foram similares aos descritos para o rim, ou seja, houve um aumento de HL nos grupos tratados com fluoreto quando comparados ao controle. Entretanto, para TBARS, diferentemente do rim, onde os níveis não sofreram alterações, no fígado houve uma diminuição nos animais tratados em relação com grupo controle. Foi relatado um aumento na concentração de MDA (um produto da fase de terminação da peroxidação lipídica) no fígado de ratos tratados com água contendo 100 ppm de fluoreto por 4 meses (SHIVARAJASHANKARA et al., 2001). Neste caso, uma dose e/ou tempo de tratamento maior pode ter esgotado as defesas antioxidantes, o que parece não ter ocorrido no presente estudo.

6.3 Coração

Contrariamente ao que foi observado no fígado e no rim, não foram detectadas diferenças na concentração de fluoreto no coração nos diferentes grupos, o mesmo tendo ocorrido com as dosagens de HP, TBARS, CAT, SOD e GSH. De fato, o coração parece ser mais resistente aos efeitos do fluoreto. Estes resultados são diferentes do que foi relatado por Basha e Sujitha (2011), que mostraram que o fluoreto aumentou os níveis de MDA e levou a uma diminuição em antioxidantes (CAT, SOD, GSH) em ratos tratados com 200 ppm de fluoreto por duas gerações. Estas diferenças poderiam ser explicadas pela alta dose administrada aos animais e pelo tempo experimental.

6.4 Rins

Os rins são os principais responsáveis pela redução plasmática da concentração de fluoreto depois da ingestão do íon. Acredita-se que cerca de 60% do fluoreto absorvido seja excretado pela urina em adultos (VILLA et al, 2010). No presente trabalho, o conjunto de dados demonstrou que os rins foram o principal alvo dos efeitos do fluoreto, em especial no grupo tratado com 50 ppm de fluoreto administrado na água de beber. Isto é condizente com um maior aumento na concentração de fluoreto no rim, cerca de 5 vezes mais (comparado o grupo controle com o grupo de 50 ppm de fluoreto) em relação aos outros órgãos (fígado, cerca de 2,5 vezes; coração, cerca de 1,5 veze e plasma. 3 vezes). Estes resultados eram esperados, uma vez que os rins são a principal rota de eliminação do fluoreto no

organismo. Assim, foi possível observar um efeito dose-resposta na concentração de fluoreto nos rins, isto é, os níveis aumentaram com o aumento da exposição ao íon.

Quanto ao perfil das dosagens de antioxidantes nos rins no presente trabalho, houve uma redução na concentração de GPx nos grupos tratados com 15 e 50 ppm de fluoreto; já para os resultados de GSH, essa redução só foi significativa para os animais que receberam altas doses de fluoreto, o mesmo tendo sido observado para a SOD. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Błaszczuk e colaboradores (2008), que também viram uma redução em 27% da SOD, 63% da GPx, 30% da CAT e um aumento da peroxidação lipídica em ratos que receberam 10 mg de fluoreto por quilograma de peso corporal por dia, durante 35 dias. Esta dose é similar à que foi ingerida pelos animais que receberam água contendo 50 ppm de fluoreto, já que é estimado que os ratos ingerem, em média, 50 mL de água por dia e apresentam, no sacrifício, cerca de 250 g de peso corporal (KOBAYASHI, 2008). Já os resultados de CAT foram semelhantes para todos os grupos. Estes achados indicam que, mediante exposição a altos níveis de fluoreto, a conversão do anion superóxido a água no rim parece ser feito principalmente pela CAT, com menor participação do sistema glutathiona. Por outro lado, a menor atividade da SOD indica um acúmulo de radical superóxido, o que pode favorecer a peroxidação lipídica.

Para HP houve um aumento da concentração no grupo que recebeu água de beber com 15 ppm de fluoreto em relação ao grupo controle. Com estes resultados, se esperava que para a concentração de TBARS também houvesse um aumento, já que HP é um produto intermediário da peroxidação lipídica e as dosagens de TBARS indicam o produto final (MDA), mas de acordo com os resultados obtidos não houve diferença entre os grupos. Uma hipótese para esses

resultados seria que a peroxidação lipídica ainda não havia chegado à sua fase de terminação e, por isso, não se pode notar um aumento de TBARS nas dosagens deste estudo.

Os dados de SOD, GPx e GSH nos rins também mostraram uma diminuição nos grupo tratado com 50 ppm de fluoreto quando comparado ao controle, enquanto no fígado e coração, apenas a CAT e a GPx apresentaram diferença entre o grupo controle e o tratado com 50 ppm de fluoreto, respectivamente. O conjunto de dados referentes aos rins, em comparação aos outros tecidos estudados, reforça a tese de que os rins são os principais responsáveis pela redução plasmática da concentração de fluoreto (VILLA et al., 2010) e, em consequência, sofrem um maior efeito desse íon.

Outro fenômeno observado foi a redução da SOD no rim no grupo de 50 ppm. Num trabalho recente, os autores descrevem um efeito inibidor da SOD extracelular (ECSOD) na expressão de VEGF e HIF-1 α (KIM et al., 2011). Vale lembrar que alguns dos efeitos dessas moléculas (VEGF e HIF-1 α) são aumento da angiogênese e congestão vascular, com o objetivo de elevar o aporte de nutrientes e sangue para algum tecido ou região (Esquema 1). A redução da SOD observada no presente trabalho poderia justificar o aumento do número de vasos observados no trabalho de Kobayashi et al. (2009), devido à descrição dos achados de Kim e colaboradores (Esquema 2).

Esquema 1: Regulação de VEGF, HIF-1α, iNOS e MMP-9 pela expressão da ECSO (Kim et al., 2011).

Esquema 2: Hipótese proposta por meio dos achados de Kim et al. (2011) e do nosso grupo (Kobayashi et al., 2009 e presente trabalho). O fluoreto teria um efeito inibitório na expressão da SOD (ECSOD-parcela da SOD total), consequentemente levando a um aumento na expressão dos fatores VEGF, HIF-1α, iNOS e MMP-9, levando ao aumento dos processos angiogênese e aporte sanguíneo.

O peso corporal dos animais tratados com fluoreto comparado ao controle não apresentou variação no presente trabalho, estando de acordo com relato da literatura em experimento onde os animais também foram tratados com 50 ppm de fluoreto (Morales-González et al., 2010).

Em síntese, a exposição de ratos ao fluoreto através da água de beber altera o sistema oxidante/antioxidante em diferentes órgãos do organismo. O achado mais relevante deste estudo foi a alteração do padrão de metabolismo oxidativo nos rins mediante exposição a altas concentrações de fluoreto. Observou-se uma redução na concentração de GPx nos grupos tratados com 15 e 50 ppm de fluoreto, quando comparados ao controle. O mesmo foi observado para os níveis de SOD e GSH, mas nestes casos apenas para o grupo de 50 ppm. Entretanto, a CAT permaneceu inalterada. Estes resultados sugerem que, mediante exposição a altas doses de fluoreto, a conversão do ânion superóxido em água nos rins é feita principalmente pela ação da CAT, com baixa participação do sistema glutathiona, diferentemente dos resultados encontrados para o fígado. Estudos adicionais deveriam ser conduzidos para verificar o significado biológico destas alterações.

Cabe ressaltar que, no grupo tratado com 5 ppm de fluoreto, poucas alterações nos parâmetros analisados foram observadas. Considerando ser esta dosagem, quando administrada na água de beber para ratos, equivalente à dosagem de 1 ppm de fluoreto administrada na água para humanos (DUNIPACE et al., 1995), estes achados reforçam a segurança da fluoretação controlada da água de abastecimento público.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

A administração de fluoreto na água de beber alterou o equilíbrio entre o sistema oxidante/antioxidante de ratos. Especificamente:

- 1) A administração de fluoreto aos ratos através da água de beber aumentou a concentração deste íon no plasma, rim e fígado, em geral de maneira dose-dependente. Entretanto, no coração, não foram observadas alterações na concentração do fluoreto, independentemente da dose administrada;
- 2) A concentração de HL no coração não se alterou, enquanto que no plasma foi diminuída e no fígado e rim, aumentada, mediante a administração de fluoreto. A concentração de TBARS não se alterou no plasma, rim e coração, mas diminuiu no fígado com a exposição ao fluoreto;
- 3) A concentração de ALP no soro sanguíneo foi alterada, tendo aumentado ou diminuído dependendo da dose administrada;
- 4) A concentração de SAT no plasma não se alterou, mas foi diminuída no rim e aumentada no fígado mediante administração de fluoreto;
- 5) A concentração de GSH não se alterou no plasma, fígado e coração, mas diminuiu no rim com a exposição ao fluoreto. Já para a GPx, a concentração manteve-se inalterada no plasma e fígado, mas foi observada uma diminuição no rim e um aumento no coração com a administração de fluoreto;

- 6) A atividade da SOD no coração não se alterou, mas foi diminuída no rim e aumentada no fígado mediante administração de fluoreto. Já a atividade da CAT permaneceu inalterada no rim e no coração, mas diminuiu no fígado com a exposição ao fluoreto.

Referências

REFERÊNCIAS

Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 2001; 306: 1-17.

Adamek E, Pawlowska-Goral K, Bober K. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin*. 2005; 51(2):69-85.

Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang JK, Shen M, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*. 2011; 334(6060):1278-83.

Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(3):367-73.

Athar M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp. Biol*. 2002; 40: 656-67.

Barber, AD, Harris, SR. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm*. 1994; 34(9): 26-35.

Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. 2010; 188(2):319-33.

Basha MPP, Sujitha NS. Chronic Fluoride Toxicity and Myocardial Damage: Toxicol Int. 2011; 18(2): 99–104.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 1971; 44(1):276-87.

Bharti VK, Gupta M, Lall D, Kapoor V. Effects of boron on haemogram and biochemical profile of urine in buffalo calves fed a high fluoride ration. Fluoride. 2007; 40:238-43.

Blaszczyk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E. Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: effects of methionine and vitamin E. Biol Trace Elem Res. 2008;121(1):51-9.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978; 52: 302-10.

Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. Anticancer Agents Med Chem. 2011; 11(4):341-6.

Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. J Dent Res. 1992; 71(5):1228-37.

Buzalaf MA, Caroselli EE, Cardoso de Oliveira R, Granjeiro JM, Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol.* 2004; 28(4):249-52.

Buzalaf MA, Caroselli EE, de Carvalho JG, de Oliveira RC, da Silva Cardoso VE, Whitford GM. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(8):810-3.

Buzalaf MA, Granjeiro JM, Damante CA, de Ornelas F. Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. *ASDC J Dent Child.* 2001; 68(1):37-41, 10.

Buzalaf MA, Granjeiro JM, Duarte JL, Taga ML. Fluoride content of infant foods in Brazil and risk of dental fluorosis. *ASDC J Dent Child.* 2002; 69(2):196-200.

Buzalaf MA, Levy SM. Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:1-19.

Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, Ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:97-114.

Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:20-36.

Carlson, JR, Suttie, JW. Pentose phosphate pathway enzymes and glucose oxidation in fluoride-fed rats. *Am. J. Physiol.* 1966; 210: 79–83.

Carvalho JG, Cestari TM, de Oliveira RC, Buzalaf MA. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008; 30(4): 287-94.

Carvalho JG, de Oliveira RC, Buzalaf MA. Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(4):238-41.

Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res.* 2009; 88(11):1054-8.

Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys.* 2003; 15;420(2):217-21

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3):527-605.

Chattopadhyay A, Bandyopadhyay D. Vitamin E in the prevention of ischemic heart disease. *Pharmacological Reports.* 2006; 58(2): 179-87.

Chen K, Thomas SR, Keaney Jr JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Rad Biol Med*. 2003; 35(2):117-32.

Choubisa SL, Choubisa L, Choubisa DK. Endemic fluorosis in Rajasthan. *Indian J Environ Health*. 2001; 43(4):177-89.

Cittanova ML, Lelongt B, Verpont MC, Geniteau-Legendre M, Wahbe F, Prie D, et al. Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology*. 1996; 84(2): 428-35.

Cross CE. Oxygen radicals and human diseases. *Ann Intern med*. 1987; 107: 526-45.

Dabrowska E, Balunowska M, Letko R, Szynaka B. Ultrastructural study of the mitochondria in the submandibular gland, the pancreas and the liver of young rats, exposed to NaF in drinking water. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2004; 49 Suppl 1:180-1.

Denbesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci*. 2011; 22:81-96.

Doi K, Sawada F, Toda G, Yamachika S, Seto S, Urata Y, et al. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res*. 2001; 34(3):251-61.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95.

Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, Warrick JM, Stookey GK. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res.* 1995; 74(1):358-68.

Ekstrand J, Ericsson Y, Rosell S. Absence of protein-bound fluoride from human and blood plasma. *Arch Oral Biol.* 1977; 22:229-32.

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bacchetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J.* 1998; 19 Suppl B: B2-B11.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver Méd Ass Brasil* 1997; 43: 61-68.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-21.

Freeman BA, Crapo JD. Byology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47:412-26.

Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(16): 6377-81.

Frischer H, Ahmad T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. *J Lab Clin Med*. 1987; 109:583-8.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biol and Endocrinology*. 2005; 2(3): 43

Garcia-Montalvo EA, Reyes-Perez H, Del Razo LM. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*. 2009; 263(2-3): 75-83.

Ge Y, Niu R, Zhang J, Wang J. Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine. *Arch Toxicol*. 2011; 85(1):27-33.

Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(8):1918-26.

Gilbert HF, Mc Lean VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1990; 63:69-172.

Grüning NM, Ralser M. Cancer: Sacrifice for survival. *Nature*. 2011; 480(7376):190-1.

Guha-Chowdhury N, Drummond BK, Smillie, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years: a longitudinal study. J. dent. Res. 1996; 75(7): 1451-7.

Gutiérrez-Salinas J, Morales-González, J.A La ingesta de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. Rev Mex Cien Farm. 2006; 37: 11-22.

Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biomed Sci. 1990; 15: 129-135.

Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed. New York: Oxford; 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurosci. 1985; 8:22-6.

He LF, Chen JG. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. World J Gastroenterol. 2006; 12(7):1144-8.

Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. J Lab Clin Med. 1986; 107: 401-4.

Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Semin Hematol 1989; 26: 277-85.

Hissin PJ, Hielf HR. A fluorometric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1973; 74:214-26.

Izquierdo-Vega JA, Sanchez-Gutierrez M, Del Razo LM. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230(3): 352-7.

Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev.* 2006; 52(2):203-9.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991; 26(10):853-6.

Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys.* 1984; 21(2):130-2.

Karaoz E, Oncu M, Gulle K, Kanter M, Gultekin F, Karaoz S, et al. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 102(1-3):199-208.

Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res.* 2009; 88(5):461-5.

Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2005; 227(2):133-9.

Keher, JP. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23:21-48.

Kim Y, Kim BH, Lee H, Jeon B, Lee YS, Kwon MJ, et al. Regulation of skin inflammation and angiogenesis by EC-SOD via HIF-1 α and NF- κ B pathways. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(11):1985-95.

Kleerekoper M. Fluoride and the skeleton. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1996; 33(2):139-61.

Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact.* 2009; 180(2):305-11.

Kobayashi CAN. Análise proteômica em urina e rim de ratos submetidos a tratamento crônico com flúor [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2008.

Krishnamachari KA. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. *Prog Food Nutr Sci.* 1986;10(3-4):279-314.

Kurland ES, Schulman RC, Zerwekh JE, Whyte MP. Recovery from skeletal fluorosis (an enigmatic, American case). 2007; 22(1):163-70.

Leite AL, Caroselli EE, Maria AG, Fernandes MS, Buzalaf MA. Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008; 30(3):209-14.

Levy SM, Kiritsy MC, Warren JJ. Sources of fluoride intake in children. *J Public Health Dent.* 1995 Winter;55(1):39-52.

Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J.* 2003;79(932):307-12.

Ludlow M, Luxton G, Mathew T. Effects of fluoridation of community water supplies for people with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(10):2763-7.

Malde MK, Zerihun L, Julshamn K, Bjorvatn K. Fluoride intake in children living in a high-fluoride area in Ethiopia - intake through beverages. *Int J Paediatr Dent.* 2003; 13(1):27-34.

Maor I, Hayek T, Coleman R, Aviram M. Plasma LDL oxidation leads to tis aggregation in the atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice. *Arter Tromb Vasc Biol* 1997; 12: 2995-3005.

Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent*. 2000;22(4):269-77.

Mello LCP, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor supelmentar. *Rev Nutr*. 2005; 18(5):593-600.

Mendoza-Schulz A, Solano-Agama C, Arreola-Mendoza L, Reyes-Marquez B, Barbier O, Del Razo LM, et al. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett*. 2009; 190(2):179-86.

Mittal M, Flora SJ. Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem Biol Interact*. 2006; 162 (2):128-39.

Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Del Carmen Chima-Galán M, Madrigal-Santillán E, Esquivel-Soto J, et al. Effect of Sodium Fluoride Ingestion on Malondialdehyde Concentration and the Activity of Antioxidant Enzymes in Rat Erythrocytes. *Int J Mol Sci*. 2010;11(6):2443-52.

Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring EGSH and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(11):1943-51.

Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 1995; 17(3): 167-77

Muller P, Schmid K, Warnecke G, Setnikar I, Simon B. Sodium fluoride-induced gastric mucosal lesions: comparison with sodium monofluorophosphate. *Z Gastroenterol*. 1992; 30(4): 252-4.

National Research Council. *Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards*. Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

Nishejama Y, Ikeda, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J*. 1998; 135: 115-120.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995; 81(1):53-62.

Novelli ELB, Fernandes AAH, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, Ribas BO. The adverse effect of a high-energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med*. 2002; 12: 287-94.

O'Connel BJ, Genest J. High-density lipoprotein and endothelial function. Circulation 2001; 104:1978-83.

Ogilvie AL. Histologic findings in the kidney, liver, pancreas, adrenal, and thyroid glands of the rat following sodium fluoride administration. J Dental Research. 1953; 32(3):386-397

Orem C, Orem A, Uydu HA, Celok S, Erdol C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. Coron Art Dis. 2002; 13:65-71.

Partanen S. Inhibition of human renal acid phosphatases by nephrotoxic micromolar concentrations of fluoride. Exp Toxicol Pathol. 2002; 54(3): 231-7

Pendrys DG, Katz RV, Morse DE. Risk factors for enamel fluorosis en a fluoridated population. Am J Epidemiol 1997;143:808-15.

Pereira HABS. Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição crônica ao flúor [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. Topical use of fluorides for caries control. Monogr Oral Sci. 2011; 22:115-32. Epub 2011 Jun 23.

Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive Heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Failure*. 2004; 10: 334-338.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.

Refsnes M, Kersten H, Schwarze PE, Lag M. Involvement of protein kinase C in fluoride-induced apoptosis in different types of lung cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973:218-20.

Refsnes M, Schwarze PE, Holme JA, Lag M. Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems. *Hum Exp Toxicol*. 2003b; 22:111-123.

Refsnes M, Schwarze PE, Holme JA, Lag M. Mechanisms in fluoride-induced interleukin-8 synthesis in human lung epithelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 2003a; 22:111-123.

Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells*. 2010; 29(6):539-49.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1):59-69.

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991:151-70.

Ruiz-Guttierrez V, Molina MT, Vázquez CM. Comparative effects of feeding different fats on fatty acid composition of major individual phospholipids of rat hearts. *Ann Nutr Metab.* 1990; 34: 350-358.

Sampaio FC, Levy SM. Systemic fluoride. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:133-45.

Saralakumari D, Varadacharyula NC, Rao RP. Effect of fluoride toxicity on growth and lipid in liver kidney, and serum in rat. *Arogya J Health;* 1988:15:24-9.

Satoh R, Kishino K, Morshed SR, Takayama F, Otsuki S, Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Yasui T, Sakagami H. Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. *Anticancer Res.* 2005; 25(3B):2085-90.

Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990;47(1):61-71.

Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology.* 2004; 204(2-3):219-28.

Shashi A. Gastric lesions in experimental fluorosis. *Asian J Microbiol Bioteth Env Sc.* 1999, 1, 171-175.

Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna BP, Hanumanth RS. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride.* 2001;34:108-13.

Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna BP, Rao SH. Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride.* 2001; 34: 108–113.

Sie H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med,* 1991; 91: 31S-8.

Singh JL, Swarup D. Fluorosis in buffaloes. *Vet Rec.* 1994; 135(11):260-1

Sinha AK. Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem.* 1972; 47(2):389-94.

Suketa Y, Terui Y. Adrenal function and changes of sodium and potassium in serum and urine in fluoride intoxicated rats. *Fluoride* 1980; 13: 4-9. Partanen, 2002.

Susheela AK, Bhatnagar M. Fluoride toxicity: a biochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Arch Toxicol.* 1993; 67(8):573-9.

Susheela, AK. Fluorosis management programme in India. *Curr. Sci.* 1999; 77: 1250–6.

Tappel, A.L. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 1973, 32, 1870-1874.

Taves DR. *Talanta.* 1968; 15(9):969-74.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552: 335–44.

Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(10):2517-33.

Vaca CE, Wilhem J, Harms-Ringdahl, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Res.* 1988; 195:137-49.

Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, et al. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production. *Circulation* 2000; 101:1261-6.

Viel C, Flahaut J, "Vie et œuvre de H. Moissan", *J. Fluorine Chem.* 1986, 33, 27-44, lecture given during the International Symposium on the Centenary of the Discovery of Fluorine, Paris, 1986.

Villa A, Anabalon M, Zohouri V, Maguire A, Franco AM, Rugg-Gunn A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res.* 2010. 44(1):60-8.

Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1):7-18.

Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 2004 Oct;44(4):381-6.

Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994; 8(1):5-14.

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996. Basel, Karger, 2nd ed.

Wong MCM, Clarkson J, Glenny A-M, Lo ECM, Marinho VCC, Tsang BWK, et al. Cochrane Reviews on the Benefits/Risks of Fluoride Toothpastes. *J Dent Res.* 2011.

World Health Organization (WHO), in: K. Bailey J, Chilton E, Dahi M, Lennon P, Jackson J, Fawell (Eds.), *Fluoride in Drinking-water*, WHO Press, Switzerland, 2006.

Xu H, Hu LS, Chang M, Jing L, Zhang XY, Li GS. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. *Toxicol Lett.* 2005; 160 (1):69-75.

Yang L, Peterson PJ, Williams WP, Wang W, Li R, Tan J. Developing environmental health indicators as policy tools for endemic fluorosis management in the People's Republic of China. *Environ Geochem Health.* 2003; 25(3):281-95

Zangar RC, Bollinger N, Weber TJ, Tan RM, Markillie LM, Karin NJ. Reactive oxygen species alter autocrine and paracrine signaling. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(11):2041-7.

Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, et al. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology.* 2007; 236(3):208-16.

Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett.* 2008; 179(1):1-5.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. **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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 001/2007

Bauru 20 de março de 2007.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Efeito da ingestão crônica de flúor sobre o sistema antioxidante de ratos”**, de autoria de Flávia Bodoy Iano, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira, em exercício
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Manuscrito preparado para submissão para Toxicological Sciences.**Effect of chronic fluoride intake in the antioxidant system of rats**

F.G. Iano^{*1}, M.C.F. Ferreira^{*2}, G.B. Quaggio^{†3}, M. S. Fernandes^{*4}, R.C. Oliveira^{*5}, V. F. Ximenes^{†6}, M.A.R. Buzalaf^{*7}

* Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, USP - University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil Al. Octávio P. Brizolla 9-75 Cep. 17012-901, Bauru-SP, Brazil

† Department of Chemistry Science School-UNESP, Bauru, SP, Brazil, Av. Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, CEP 17033-360, Bauru, SP, Brazil

¹ fgiano@uol.com.br

² titilafreitas@usp.br

³ gijokissima@msn.com

⁴ mi_biol@yahoo.com.br

⁵ rodrigocardoso@usp.br

⁶ vfximenes@fc.unesp.br

⁷ To whom correspondence should be addressed at Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, USP - University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil Al. Octávio P. Brizolla 9-75 Cep. 17012-901, Bauru-SP, Brazil, E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br phone: 55 14 32358346, fax: 55 14 32271486

Abstract

Excessive fluoride intake over a long period of time could result in fluorosis, which can lead to dental and skeletal manifestations. Metabolic, functional and structural damages caused by chronic fluorosis have been reported in many tissues. The aim of this study was to evaluate the effect of fluoride, administered in drinking water, in the antioxidant defense of rats. Four groups of *Wistar* rats were included (n=10/group). The animals received drinking water containing 0 (control), 5, 15 or 50 ppm of fluoride during 60 days. They were euthanized and the tissues (liver, kidney and heart) were collected and homogenized. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH), antioxidants, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), lipid hydroperoxide (LH), and fluoride were analyzed. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test or Kruskal-Wallis and Dunn's tests ($p < 0.05$). In the kidney SOD, GPx, GSH and SAT decreased and fluoride and LH increased significantly. In the liver, CAT and TBARS decreased and fluoride, SOD, LH and SAT increased significantly. In the heart, GPx increased significantly. In summary, these results show that chronic fluoride administration alters the antioxidant system of the rats. Our data suggest that upon exposure to high levels of fluoride, the conversion of the superoxide anion to water in the kidney seems to occur mainly through the SOD and CAT, with a low participation of the glutathione system, differing from what seems to occur in the liver.

Key words: Fluoride, antioxidants, liver, kidney, heart.

Introduction

Excessive uptake of fluoride during an extended period of time can result in fluorosis, a disease characterized mainly by an altered appearance of the teeth, such as pitting or staining of the enamel, as well as skeletal manifestations like bone deformities, osteoporosis and osteoclerosis, at higher doses. Endemic fluorosis is widely prevalent around the world and affects millions of people (World Health Organization, 2006).

Fluoride can cause several cell effects depending on the time of exposure, concentration and cell type. Toxic effects occur mainly in relation to the interaction with certain enzymes. In most cases, fluoride acts as an enzymatic inhibitor, but occasionally fluoride ions can stimulate enzymes activity (Adamek *et al.*, 2005). At micromolar levels, fluoride is considered an anabolic agent once it promotes cell proliferation. On the other hand, millimolar concentrations inhibit several enzymes, including phosphatases, both *in vivo* and *in vitro* (Mendoza-Schulz *et al.*, 2009).

Metabolic, structural and functional damages as a result of chronic fluorosis have already been noticed in different tissues, affecting renal, endothelial, gonadal and neuronal cells (National Research Council, 2006). Some studies suggest that fluoride inhibits secretion and/or synthesis of many proteins and that it interferes with distinct signal transduction pathways involved in proliferation and apoptosis, including the activation pathways of MAPK (mitogen activated protein kinase), p53, AP-1(activator protein 1) and NFK β (nuclear factor Kappa β). (Karube *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2007b, 2008).

Oxidative stress as a result of excessive fluoride exposure has been observed in several cellular types *in vitro* and in soft tissues *in vivo*. It affects the liver, spleen, brain, lungs and testicles, both in animals and humans living in endemic areas of

fluorosis. It is believed that fluoride inhibits the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) (Garcia-Montalvo *et al.*, 2009; Izquierdo-Vega *et al.*, 2008; Shanthakumari *et al.*, 2004; Shivarajashankara *et al.*, 2001). In addition, fluoride can alter glutathione levels (Ghosh *et al.*, 2008, Mittal and Flora, 2006; Shivarajashankara *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007a) causing an excessive production of ROS at the mitochondrial level in many cases, and as a consequence, some cell components can be compromised. There are some studies in the literature involving oxidative damage caused by fluoride, but they focus on only one or two types of tissues. In addition, the methodologies of investigation vary greatly, which makes the comparisons of results obtained in different tissues difficult. Furthermore, in many cases, the doses of fluoride used are extremely high with very little clinical significance. The aim of this study was to evaluate the effects of clinically significant doses of fluoride on the antioxidant systems of different tissues of rats.

Materials and Methods

Animals and treatment

The protocol of this study was approved by the appropriate review board of Bauru School of Dentistry, University of São Paulo (Proc. 001/2007). Male *Wistar* rats (21 days old) were divided into four groups of ten animals each. They were housed in polypropylene cages with *ad libitum* low-fluoride food (AIN-93) and water inside a climate-controlled room, which had a 12 h light/dark cycle. The experimental groups were treated for 60 days with three different concentrations of fluoride in the drinking water (5, 15 or 50 ppm fluoride, as sodium fluoride), while the control group received deionized water. These doses of fluoride were chosen because they would be

equivalent to doses of approximately 1, 3 or 10 ppm fluoride in the drinking water for humans (Dunipace *et al.*, 1995). These doses correspond to the fluoride concentration that is typically included in artificially fluoridated water, and fluoride concentrations naturally found in endemic regions of dental and skeletal fluorosis, respectively (World Health Organization, 2006). After the experimental time, the animals were anaesthetized with ketamine and xylazine and euthanized by decapitation. Blood samples and different tissues (liver, kidney and heart) were collected for several assays. After collection, samples were stored at -80°C until analysis.

Chemicals

HMDS hexamethyldisiloxane is from Aldrich (St Louis, USA), Fluoride (Cas # 940907) Thermo Orion (USA), butylhydroxytoluene (BHT), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), nitroblue tetrazolium (NBT), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-Phthalaldehyde (OPT), β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt (NADH), xanthine, xanthine oxidase, glutathione reduced (GSH), potassium dichromate, sodium pyrophosphate, phenazine methosulfate, meta-phosphoric acid and Antioxidant Assay Kit (Cas # CS0790) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, USA), hydrogen peroxide (H₂O₂), methanol, hydrochloric acid (HCl), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), acetic acid were purchased from Merck (Germany).

Determination of fluoride

The fluoride concentrations in the kidney, liver, heart and plasma were determined after overnight hexamethyldisiloxane (HMDS)-facilitated diffusion (Taves,

1968; Whitford, 1996) using an ion-specific electrode (Orion Research, Model 9409) and a miniature calomel electrode, (Accumet, #13-620-79) both of which were coupled to a potentiometer (Orion Research, Model EA 940, Cambridge, USA).

Sample preparation

To obtain the supernatant, the tissues (kidney, liver or heart) were homogenized with a phosphate buffer 10 mM (pH7.0) and 1% BHT for 2 min (Marconi MA 102, Brazil), and centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected and used for analysis of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) and LH (lipid hydroperoxide).

Briefly, the tissues (kidney, liver or heart) were homogenized to analyze CAT, SOD (only kidney and heart), and GPx. They were homogenized in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, centrifuged (1500 g for 10 min) and the supernatant was collected and used for the determinations.

Determination of TBARS

The products of lipid peroxidation were measured as TBARS. The method followed the procedure used by Buege and Aust (1978). The supernatant (0.4 ml) was mixed with 0.8 ml thiobarbituric acid solution (0.375% TBA, 15% TCA and 0.25% HCl), and incubated in a boiling water bath for 15 min, then in an ice water bath for 10 min and centrifuged at 13,900 g for 5 min. The absorbance of the supernatant was read at 535 nm. The spectrophotometer was blanked with 0.4 ml phosphate buffer 10 mM (pH 7.0) (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, United Kingdom). The concentration of TBARS was calculated using its molar extinction coefficient ($1.56 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Determination of LH

The lipid hydroperoxide concentration in the kidney, liver or heart was measured using the method described by Jiang *et al.* (1991), and calculated using a molar extinction coefficient of $4.3 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determination of antioxidant concentration

The concentrations of antioxidants in the kidney and liver were as obtained by the Antioxidant Assay kit (CS0790, Sigma–Aldrich (St Louis, USA)).

Determination of CAT activity

The activity of CAT in the liver, kidney and heart was assayed according to the method of Sinha (1972). 0.1 ml of supernatant was incubated with 0.5 ml of H_2O_2 (0.2 M) at $[37]^\circ\text{C}$ for 90 s. Reaction was stopped by adding 5% potassium dichromate solution (5% potassium dichromate in acetic acid 1:3). Samples were incubated in a boiling water bath for 15 min. The concentration of H_2O_2 consumed was determined by recording the absorbance at 570 nm. The activity of CAT was expressed as $[\mu]\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ protein.

Determination of SOD activity

The activity of SOD in the kidney and heart was assayed by the method of Kakkar *et al.* (1984), with slight modifications. In the liver, SOD activity was measured by the method of Beauchamp and Fridovich (1971). In the kidney and heart, the supernatants were centrifuged again at 10,000 g for 15 min and 0.2 ml of 5% tissue homogenate was added to the reaction mixture. The reaction mixture contained 1.2 ml of a sodium pyrophosphate buffer (0.052 mM, pH 7.0), 0.1 ml of phenazine

methosulfate (186 [μM]), and 0.3 ml of NBT (300 [μM]). The enzymatic reaction was initiated by adding 0.2 ml of NADH (780 [μM]) and stopped precisely after 1 min by adding 1 ml of glacial acetic acid. The concentration of the reduced NBT formed was measured by its absorbance at 560 nm. In the liver, samples (50 mg) were homogenized with 1 ml of a sodium phosphate buffer (50 mM pH 7.8) and after centrifugation (10,000 rpm for 10 min) the supernatant was collected. The reaction mixture consisted of 0.96 ml of sodium and potassium phosphate buffer (50 mM pH 7.8), 0.010 ml of xanthine (5 mM), 0.010 ml of NBT (10 mM), 0.010 ml of supernatant and 0.010 ml of EDTA (10mM). The reaction was initiated by adding 0.005 ml of xanthine oxidase (diluted 20 times) and the absorbance read at 550 nm during a 3 min period. The Δabs/min was measured and the activity of SOD calculated and expressed as U/min*mg prot.

Determination of glutathione peroxidase (GPx) activity

The activity of GPx in the kidney, liver and heart was measured according to the method proposed by Flohe and Gunzler (1984), as modified by Modi and Flora (2007). The supernatant was centrifuged again at 10,000 g for 30 min. The supernatant was used for the reaction, which was then initiated by adding 0.3 ml of a phosphate buffer (10 mM pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mM), 0.1 ml of H₂O₂ (1 mM) and 0.3 ml of supernatant and then incubated at 37°C in a water bath for 15 min. The reaction was stopped by adding 0.5 ml TCA (5%) and the samples were centrifuged at 1500 g for 5 min and then supernatants were collected, 0.1 ml of the supernatant was mixed with 0.2 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml). The absorbance was read at 420 nm with a spectrophotometer (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Determination of reduced glutathione (GSH)

The activity of GSH in the kidney, liver and heart was assayed by the method of Hissin and Hilf (1973), with slight modifications. The samples of the kidney and heart were mixed with phosphate-EDTA buffer (0.1 M) and meta-phosphoric acid (25%), and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. Then, 1.8 ml of a phosphate-EDTA buffer, 0.1 ml of supernatant and 0.1 ml of OPT solution (1 mg of OPT diluted in 1 ml of methanol) were incubated for 15 min. The fluorescence was determined (λ_{ex} 350 nm/ λ_{em} 420 nm) (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) and the concentration calculated using a calibration curve for the GSH and expressed as nmol/mg tissue.

Statistical analysis

All results are expressed as mean $\pm$ SD (standard derivation). For the statistical analysis, the GraphPad InStat version 3.0 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) was used. Initially the data were checked for normality (Kolmogorov and Smirnov test) and homogeneity (Bartlett test). When the criteria were satisfied, the data were analyzed by ANOVA and Tukey's tests. Otherwise, they were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's tests. In all cases, the significance level was set at 5%.

Results

There were no significant differences among the groups with regards to the mean body weight, or the weights of the kidney and heart (results not shown). As for the liver, its weight increased for the experimental groups when compared with the

control ($p=0.0064$). However only the 15 ppm fluoride group (8.43 ± 0.57 g) significantly differed from control (7.33 ± 0.85 g).

Fluoride concentrations in the liver, kidney, heart and plasma are shown in table 1. In the kidney, a dose-response effect was observed, with significant differences among all groups ($p<0.0001$). Regarding the liver, a significant difference was observed among the groups ($p<0.0001$). The highest concentration was observed for the 50 ppm fluoride group, while the lowest value was seen in the control group, which significantly differed from all groups, except for the 5 ppm fluoride group. As for the heart, no significant differences were observed among the groups ($p=0.3103$). The 15 and 50 ppm groups showed the highest concentrations. For the plasma, there was a tendency for increasing fluoride concentrations with higher doses of fluoride in the drinking water and a significant difference was seen among the groups ($p<0.0001$). However, only the 50 ppm fluoride group significantly differed from the others.

Regarding the CAT activity (Fig 1A) in the kidney, the results were very similar for all the groups and no significant differences were seen ($p=0.4157$). A similar profile was observed in the heart ($p=0.1192$). However, in this case, the 15 ppm fluoride group had the activity decreased 50% when compared to the others groups. In the liver, a significant difference was observed among the groups ($p=0.0001$). All the experimental groups had their activity decreased when compared to the control group. The lowest value was found in the 15 ppm fluoride group that significantly differed from the control and the 5 ppm fluoride groups.

Figure 1B shows the results found for the SOD activity in the kidney, liver and heart. In the kidney, a significant difference was observed among the groups ($p=0.0012$). The 50 ppm fluoride group presented the lowest value (approximately 50% decrease) and significantly differed from the control and the 5 ppm fluoride

groups. No significant differences were observed among the control, 5 ppm and 15 ppm fluoride groups. In the liver, a significant difference was observed among the groups ($p=0.0006$). The highest activity was observed for the 15 ppm fluoride group, which significantly differed from the control and 5 ppm fluoride groups. Regarding the heart, there were no significant differences among the groups ($p=0.1123$).

The GPx activity (Fig 1C) in the kidney was significantly different among the groups ($p<0.0001$). The lowest activity was observed for the 50 ppm fluoride group and the highest for the 5 ppm fluoride group. In the liver, the activity increased in all the experimental groups when compared to the control group but no significant differences detected ($p=0.4964$). Regarding the heart, there was a significant difference among the groups ($p=0.00006$). The highest activity was observed for the 15 ppm fluoride group.

As for the concentration of the GSH (Fig 1D), in the kidney a significant difference was seen among the groups ($p=0.0177$). The concentration decreased in all experimental groups when compared to the control group, but the difference was only significant in the 50 ppm fluoride group. In the liver, all experimental groups had increased GSH concentrations, with no significant differences detected ($p=0.2996$). Similar results were found for the heart ($p=0.7151$).

The results of LP in the kidney, liver and heart are shown in figure 2A. The level of LP in the kidney presented significant differences among the groups ($p=0.0075$). All experimental groups increased their concentrations when compared to the control group, but only the 15 ppm fluoride group significantly differed from the control. In the liver, a significant difference was also found among the groups. The experimental groups presented higher concentrations when compared to the control, but only the 5

and 50 ppm fluoride groups significantly differed from the control. In the heart, results were similar for all groups and no significant differences were seen ($p=0.3103$).

Concentrations of TBARS (Fig. 2B) in the kidney and heart were similar and no significant differences were detected ($p=0.0952$ and $p=0.2210$, respectively). But in the liver, significant differences were seen ($p=0.0478$). There were lower concentrations in the experimental groups when compared to the control, but the difference was significant only for the 15 ppm fluoride group.

With regard to antioxidants concentrations (table 2), in the liver significant differences were seen among the groups ($p<0.0001$). The concentrations for the 15 and 50 ppm fluoride groups were similar, but significantly higher than those found for the control and 5 ppm fluoride groups. In the kidney, significant differences were seen ($p<0.0001$). An inverse dose-response effect was observed. The activity was significantly decreased in all the experimental groups when compared to the control.

Discussion

Fluoride has been extensively used as a caries-preventive agent due to its ability to reduce demineralization and increase remineralization (Buzalaf, *et al.*, 2011). Among the methods of fluoride delivery for caries control, drinking fluoridated water and brushing with a fluoride dentifrice are the most common and widespread employed (Pessan *et al.*, 2011; Buzalaf and Levy, 2011). However, excessive fluoride intake can lead to side-effects, among which dental fluorosis is the most common (DenBesten and Li., 2011). This implies that fluoride intake must be controlled (Buzalaf and Levy, 2011).

After fluoride intake, this ion is absorbed mainly in the gastro-intestinal tract and reaches the systemic circulation (Buzalaf and Whitford, 2011). Blood plasma is an

important indicator of fluoride intake levels, both in cases of acute (Buzalaf *et al.*, 2004, 2005; Whitford 1996) and chronic exposure (Carvalho *et al.*, 2008, 2009; Kobayashi *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2008; Whitford, 1996). The results of the present study are in agreement with the literature, since an increase in plasma fluoride levels was observed as water fluoride concentrations were increased (Carvalho *et al.*, 2008, 2009; Kobayashi *et al.*, 2009). This happens because plasma represents a central compartment from which fluoride is distributed to the whole organism and excreted in the urine (Buzalaf and Whitford, 2011). In the present study, the group treated with 5 ppm fluoride displayed plasma fluoride levels similar to those found for the control. This was also observed in previous studies using the same protocol of treatment (Carvalho *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2008) and could be partially explained by the fluoride uptake in mineralized tissues (Buzalaf and Whitford, 2011).

The kidneys are the main organ responsible for the reduction of plasma fluoride levels after the intake of this ion. It is believed that roughly 60% of fluoride absorbed is excreted in the urine by healthy adults (Villa *et al.*, 2010). Since kidneys are the principal route of fluoride elimination from the organisms, in the present study, it was possible to observe a dose-responsive effect in kidney fluoride levels, i.e., the levels increased with higher exposure to fluoride. On the other hand, liver fluoride levels were lower than those found in the plasma. This could be expected, since it is known that intracellular fluoride levels are typically 10-50% lower than those found in plasma or interstitial fluid (Buzalaf and Whitford, 2011).

In contrast to what was observed for the kidneys and liver, no differences could be detected in heart fluoride levels among the groups. This is consistent with the lack of differences in the concentrations of LP, TBARS, CAT, SOD and GSH, regardless of the exposure to fluoride. In fact, this organ seems to be more resistant

to the effects of fluoride. It has been reported that while exposure to fluoride leads to alterations in different enzymes in distinct organs such as the liver, kidney and spleen, no changes are found in the heart (Strunecka *et al.*, 2007). These results are different from what was reported by Basha and Sujitha (2011), who showed that fluoride increased MDA levels and decreased CAT, SOD and GSH in second generation rats treated with 200 ppm. These differences could be explained by the higher dose of fluoride employed and/or the longer experimental time.

Regarding the substances related to lipid peroxidation, both for the kidney and liver, LH increased in the exposed groups when compared to the control, which is in agreement with the results found for the plasma fluoride levels, despite the fact that no dose-response was observed. However, for TBARS, the levels remained unchanged in the kidney, but decreased in the liver of the treated animals when compared to the control. An increase was reported in the concentration levels of MDA (a product of the termination phase of lipid peroxidation) in the liver of rats that received water containing 100 ppm fluoride for 4 months (Shivarajashankara *et al.*, 2001). In this case, the increased dosage of fluoride and/or longer time of treatment might have depleted the antioxidant defenses, which does not seem to have occurred in the present study.

For the kidney, a significant reduction was observed in the levels of antioxidants concentration in the groups treated with fluoride when compared to the control, which differs from what was seen for the liver. This could be explained by the higher fluoride concentrations found in the kidney when compared to the liver, which also could have contributed to reducing the levels of antioxidant substances.

With regards to the individual antioxidant substances in the liver, the activity of SOD significantly increased for the 15 ppm fluoride group, and the levels of CAT

significantly decreased when compared to the control. However, the activity of GPx and the GSH levels tended to be constant. The profile observed for the kidney was notably different. There was a reduction in the concentration of GPx in the groups treated with 15 and 50 ppm fluoride when compared to the control. The same pattern was observed for the levels of SOD and GSH, but only for the 50 ppm fluoride group. However, the CAT remained unaltered. These findings indicate that upon exposure to high levels of fluoride, the conversion of the superoxide anion to water in the kidney seems to occur mainly through the SOD and CAT, with a low participation of the glutathione system, differing from what seems to occur in the liver.

It is important to highlight that for little alterations in the parameters evaluated were seen for the group treated with 5 ppm fluoride, which is a dose equivalent to 1 ppm fluoride in the drinking water for humans (Dunipace *et al.*, 1995). These findings reinforce the safety of controlled water fluoridation.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant numbers 2007/03723-2, 2007/01788-0, 2009/01996-7]

References

- Adamek, E., Pawlowska-Goral, K. and Bober, K. (2005). In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin* **51**, 69-85.
- Basha, M. P. and Sujitha, N. S. Chronic fluoride toxicity and myocardial damage: antioxidant offered protection in second generation rats. *Toxicol Int* **18**, 99-104
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**, 276-87

Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**, 302-10.

Buzalaf M. A. and Levy S. M. (2011). Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* **22**, 1-19.

Buzalaf M. A. and Whitford G. M. (2011). Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* **22**, 20-36.

Buzalaf M. A., Pessan J. P., Honório H. M. and Ten Cate J. M. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* **22**, 97-114.

Buzalaf, M. A., Caroselli, E. E., Carvalho, J. G., Oliveira, R. C., Silva Cardoso, V. E. and Whitford, G. M. (2005). Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. *J Anal Toxicol* **29**, 810-3.

Buzalaf, M. A., Caroselli, E. E., Oliveira, R. C., Granjeiro, J. M. and Whitford, G. M. (2004). Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol* **28**, 249-52.

Carvalho, J. G., Cestari, T. M., Oliveira, R. C. and Buzalaf, M. A. (2008). Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **30**, 287-94,

Carvalho, J. G., Leite, A. L., Yan, D., Everett, E. T., Whitford, G. M. and Buzalaf, M. A. (2009). Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res* **88**, 1054-8

Denbesten P. and Li W. (2011). Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci* **22**, 81-96.

Dunipace, A. J., Brizendine, E. J., Zhang, W., Wilson, M. E., Miller, L. L., Katz, B. P., Warrick, J. M. and Stookey, G. K. (1995). Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res* **74**, 358-68.

Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **105**, 114-21.

Garcia-Montalvo, E. A., Reyes-Perez, H. and Del Razo, L. M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology* **263**, 75-83,

Ghosh, J., Das, J., Manna, P. and Sil, P. C. (2008). Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. *Toxicol In Vitro* **22**, 1918-26

Hissin, P.J. and Hilf, R. (1973). A fluorometric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* **74**, 214-26.

Izquierdo-Vega, J. A., Sanchez-Gutierrez, M. and Del Razo, L. M. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol* **230**, 352-7

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. and Wolff, S. P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853-6.

Kakkar, P., Das, B. and Viswanathan, P. N. (1984). A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys* **21**, 130-2.

-
- Karube, H., Nishitai, G., Inageda, K., Kurosu, H. and Matsuoka, M. (2009). NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res* **88**, 461-5
- Kobayashi, C. A., Leite, A. L., Silva, T. L., Santos, L. D., Nogueira, F. C., Oliveira, R. C., Palma, M. S., Domont, G. B. and Buzalaf, M. A. (2009). Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact* **180**, 305-11
- Leite, A. L., Caroselli, E. E., Maria, A. G., Fernandes, M. S. and Buzalaf, M. A. (2008). Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **30**, 209-14,
- Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Marquez, B., Barbier, O., Del Razo, L. M. and Mendoza-Garrido, M. E. (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett* **190**, 179-86
- Mittal, M. and Flora, S. J. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem Biol Interact* **162**, 128-39,
- Modi, M. and Flora, S. J. (2007). Combined administration of iron and monoisoamyl-DMSA in the treatment of chronic arsenic intoxication in mice. *Cell Biol Toxicol* **23**, 429-43
- National Research Council. (2006). Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards. Washington, DC: The National Academies Press.
- Pessan J. P., Toumba K. J. and Buzalaf M. A. (2011). Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci.* **22**:115-32.

Shanthakumari, D., Srinivasalu, S. and Subramanian, S. (2004). Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology* **204**, 219-28.

Shivarajashankara, Y. M., Shivashankara, A. R., Gopalakrishna, B. P. and Hanumanth, R. S. (2001). Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride* **34**, 108-13.

Sinha, A. K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem* **47**, 389-94.

Strunecka, A., Patocka, J., Blaylock, R. I. and Chinoy, J. (2007). Fluoride interactions: From Molecules to disease. *Curr Signal Transd Ther* **2**, 190-213.

Taves, D. R. (1968). Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta* **15**, 1015-23.

Villa, A., Anabalon, M., Zohouri, V., Maguire, A., Franco, A. M. and Rugg-Gunn, A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res* **44**, 60-8.

Whitford, G. M. (1996). The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* **16 Rev 2**, 1-153.

World Health Organization (WHO), in: K. Bailey J, Chilton E, Dahi M, Lennon P, Jackson J, Fawell (Eds.), *Fluoride in Drinking-water*, WHO Press, Switzerland, 2006.

Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X. and Yang, K. (2007a). Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology* **236**, 208-16.

Zhang, M., Wang, A., Xia, T. and He, P. (2008). Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett* **179**, 1-5.

Zhang, Y., Li, W., Chi, H. S., Chen, J. and Denbesten, P. K. (2007b). JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol* **26**, 633-41.

Figure 1: Activity of CAT (A), SOD (B), GPx (C) in the liver, kidney and heart of rats receiving water containing different fluoride concentrations. Levels of GSH (D) in the liver, kidney and heart of rats receiving water containing different fluoride concentrations. Data are mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$).

Figure 2: Concentration of HP (A), TBARS level (B) in the liver, kidney and heart of rats receiving water containing different fluoride concentrations. Data are mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$).

Table 1. Fluoride Concentration in the liver, kidney, heart ($\mu\text{g/g}$ tissue) and plasma ($\mu\text{g/ml}$ tissue) of rats receiving water containing different fluoride concentrations

	Control	5 ppm	15 ppm	50 ppm
Liver	0.009 ± 0.003^a	0.010 ± 0.002^{ad}	0.014 ± 0.004^{bd}	0.023 ± 0.008^c
Kidney	0.045 ± 0.012^a	0.067 ± 0.011^b	0.112 ± 0.020^c	0.245 ± 0.042^d
Heart	0.017 ± 0.012^a	0.011 ± 0.002^a	0.021 ± 0.016^a	0.023 ± 0.006^a
Plasma	0.032 ± 0.011^a	0.027 ± 0.008^a	0.043 ± 0.010^a	0.094 ± 0.019^b

Values are mean $\pm$ SD. In each line, different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$)

Table 2. Antioxidants Concentration in the liver and kidney (mmol/g) of rats receiving water containing different fluoride concentrations

	Control	5 ppm	15 ppm	50 ppm
Liver	1.32 ± 0.11^a	1.25 ± 0.12^a	2.52 ± 0.15^b	2.37 ± 0.08^b
Kidney	2.23 ± 0.34^a	1.51 ± 0.41^b	1.13 ± 0.25^b	1.03 ± 0.18^b

Values are mean $\pm$ SD. In each line, different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$)