UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

EFEITOS DO CHUMBO NA FORMAÇÃO DO ESMALTE FLUORÓTICO EM RATOS

GISELLE DE ANGELO SOUZA LEITE

Ribeirão Preto
2009

GISELLE DE ANGELO SOUZA LEITE

**EFEITOS DO CHUMBO NA FORMAÇÃO DO
ESMALTE FLUORÓTICO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em odontologia – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto

2009

Leite, Giselle de Angelo Souza Leite

Efeitos do Chumbo na formação do esmalte fluorotico em ratos.
Ribeirão Preto, 2009.

67p.: 4il, 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa: Odontopediatria.

Orientadora: Gerlach, Raquel Fernanda

1. Flúor. 2. Chumbo. 3. Fluorose. 4. Incisivos de ratos.
5. Poluição ambiental

GISELLE DE ANGELO SOUZA LEITE

**EFEITOS DO CHUMBO NA FORMAÇÃO DO
ESMALTE FLUORÓTICO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em odontologia – Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À **DEUS**. Obrigada por ter me guiado e ter me enchido de esperanças para chegar ao fim.

"Deus não nos exige que tenhamos sucesso, ele só exige que você tente. "

(Madre Teresa de Calcutá)

Aos meus pais **Maura de Angelo Leite** e **Ademir de Souza Leite** por terem sempre trabalhado muito e abdicado de uma vida mais confortável para eu poder estudar. Obrigada pelo amor, carinho, admiração e por terem me ensinado o valor dos estudos.

À minha irmã **Juliana de Angelo Souza Leite** pelo apoio, carinho e admiração que sente por mim.

À toda minha **família** que sempre me admiraram e me deram força e carinho.

Ao amor da minha vida **Beto Carbonaro**, que tanto me incentivou e ficou ao meu lado nos bons e maus momentos. Certamente, sem seu apoio, carinho, dedicação e compreensão nada seria possível.

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família".

(Leon Tolstoi)

AGRADECIMENTOS

À Minha Orientadora

Profª Drª **Raquel Fernanda Gerlach** pela oportunidade de fazer o mestrado, trabalhar em seu laboratório e conviver com excelentes profissionais que estavam à minha volta. Pelo exemplo de dedicação ao trabalho, honestidade e amor à ciência.

*“Se me perguntares que é que desejo, eu Te responderei:
Sabedoria,
para que não seja um homem seco e de uma só visão,
e possa conservar a poesia ao meu lado
sem a ciência a abafar.
E, se me perguntares que é que desejo por acréscimo, digo:
Te que desejo sabedoria
porque com Tua sabedoria tudo poderei responder,
e meus membros multiplicarão
e eu serei numerosos, depois!...”*

*Poesia Completa
(Jorge Lima)*

Aos Amigos

“Amigos são a família que Deus nos permite escolher”.

Ana Carolina Meng Sanguino, Andreza do Prado Najm e Camila Peres de Sousa, minhas eternas amigas que sempre entenderam minha ausência e com as quais pude compartilhar os momentos de aflição.

Odélio Messias de Sousa e Sidney da Costa Peres Sousa, que foram a minha família em Ribeirão Preto desde a época em que eu prestava vestibular.

Marina Xavier Pisani pela amizade reforçada neste período que moramos, estudamos e crescemos juntas.

Gisele Faria, Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Rizoli, Rodrigo Galo e Jaciara Miranda Gomes da Silva pelos valiosos momentos que passamos juntos, pelas conversas de apoio e incentivo, pelo convívio na clínica e no dia-a-dia. A amizade construída com vocês eu levarei para o resto de minha Vida.

Aos Amigos do Laboratório

Anna Laura Bechara Jacob Ferreira, Andréa Marcaccini, Andrezza Rodrigues, Carla Speroni Ceron, Carolina de Souza Guerra, Élen Rizzi, Glauce da Costa de Almeida, Izabel Maria Porto, Karina Grecca, Michele Castro, Raquel Carros, Regina Saiani, Soraia Cheier Dib Gonçalves e a todos os alunos do laboratório pelo convívio, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, competência e amizade.

Aos Amigos da Pós-Graduação

“Em um mundo que se fez deserto, temos sede de encontrar companheiros”.

(Antoine de Saint Exupéry)

Edécio Garcia Júnior, Lourdes Yanissely Garcia Olmedo, Remberto Marcelo Argandoña Valdez, Rodrigo Machado da Silva, Vanessa da Rocha Bernardini Maldonado e todos os amigos de outras áreas de concentração tanto do mestrado quanto do doutorado que compartilharam comigo as disciplinas e que conviveram comigo neste período tão importante de minha vida. Cada um traz uma lembrança que guardo no meu coração!

Ana Paula Ramos Bernardes da Silva, Olivia Santos de Oliveira Verardo e Marcela Perdiza pelas risadas nos momentos difíceis, pelo convívio, companheirismo e acima de tudo pela amizade construída. Adoro vocês!

Cristina Bueno Brandão pela competência e exemplo de determinação.

Taiana de Melo Dias e Marta Maria Martins Giamatei Contente pela amizade iniciado na graduação e reforçado agora no mestrado. Vocês estão no meu coração!

Rosângela Moraes Marques Sawan e Maurício Sawan por terem sido mais do que amigos, uma família! Rô, você foi mais do que uma colega de pós-graduação e sabe o quanto é importante na minha vida. Que Deus lhe dê em dobro todo carinho, atenção, companheirismo e energias positivas que você me deu. Continue sempre rezando por mim!

Aos Professores

Ao Profº Drº **Paulo Nelson Filho** pela orientação científica desde a graduação, pelas ótimas aulas ministradas com muita didática e competência e que me ensinaram a amar a Odontopediatria e o ensino. Obrigada também por ter aceitado fazer parte da banca nesta tese.

À Profª Drª **Maria Cristina Borsatto** por ser um exemplo de profissional e ser humano iluminado! Obrigada pela amizade, carinho e incentivo constantes.

À Profª Drª **Alexandra Mussolino de Queiróz** pelas aulas sobre pacientes especiais que eu nunca vou esquecer e pela amizade.

À Profª Drª **Kranya Victoria Díaz-Serrano** pelo seu idealismo, entusiasmo, carinho e atenção nos momentos difíceis.

À Profª Drª **Raquel Assed Bezerra da Silva** pela amizade e atenção nos momentos necessários.

À Profª Drª **Maria da Conceição Pereira Saraiva** pela atenção sempre disponível.

À Profª Drª **Aldevina Campos de Freitas** por ser, para mim, um exemplo de amor à profissão e aos seus pacientes.

Ao Profº Drº **Jaime Cury** da Unicamp por dividir comigo seu conhecimento em flúor e toda sua experiência na ciência, este período irá contribuir muito na minha formação.

À Profª Drª **Léa Assed Bezerra da Silva** pela oportunidade de fazer o mestrado e atenção nos momentos que eu precisava.

À Profª Drª **Christie Ramos Andrade Leite Panissi** pelo auxílio nos meus experimentos, carinho, atenção e exemplo de dedicação aos estudos.

Ao Profº Drº **Frederico Barbosa de Sousa** da Universidade Federal da Paraíba, por ter tanto me ajudado em um momento crucial do meu trabalho. Pela análise de birrefringência do esmalte, pelas idéias, disponibilidade, atenção e paciência. Obrigada também por fazer parte da minha banca nesta tese de mestrado.

Ao Profº Drº **Fernando Barbosa Júnior** por ter me recebido em seu laboratório e junto aos seus alunos me auxiliado nas dosagens de chumbo.

Ao Profº Drº **Arthur Belém Novaes Júnior** por ter me recebido com muito carinho e atenção em seu laboratório.

Aos Funcionários

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Vera Ribeiro do Nascimento, Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Leli Placciti, Carmo Eurípedes Terra Barreto, Cleber Barbosa Rita e José Aparecido Neves do Nascimento**, pelo auxílio administrativo e clínico prestado.

Aos funcionários do Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto–USP, **Benedita Viana Rodrigues, Renata A. Fernandes Rodrigues e Nadir das Dores Gardin** pelo carinho, atenção e auxílio nos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Maicon, Nilce de Oliveira Wolga, Nadir Martins Fernandes, Mauro Ferreira da Silva e Dimitrius Leonardo Pitol** pela paciência, atenção e ajuda nos trabalhos.

Aos funcionários do Biotério **Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Antônio Massaro e Fábio Marcelo Corrêa** pela prontidão que sempre me atenderam, pela amizade e pelo apoio técnico no tratamento dos ratinhos.

Ao fotógrafo **Hermano Teixeira Machado** pelo auxílio na desgastante tomada das fotografias, pelas conversas sinceras e pela amizade construída.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo, **Isabel Cristina Galina Sola e Regiane Cristina Moi Sacilloto** por estar sempre à disposição para resolver os assuntos administrativos, sempre com muita paciência e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, **Waldemiro Corrêa** pelo auxílio nas dosagens de flúor.

À FAPESP

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo pela bolsa de estudos e auxílio financeiro durante o projeto que foram de fundamental importância para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste sonho!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

(Chico Xavier)

RESUMO

Leite, GAS. **Efeitos do chumbo na formação do esmalte fluorótico em ratos.** [dissertação] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; 2009.

A co-exposição ao chumbo e ao flúor pode alterar o grau de fluorose dental, uma vez que ambos se depositam nos tecidos dentais. Ratos Wistar foram separados em 4 grupos: controle e 3 grupos que recebiam água contendo 100ppm de flúor (F), 30ppm de chumbo (Pb), ou 100ppm de F mais 30ppm de Pb desde a gestação. Análise do esmalte e determinação das dosagens de F no esmalte, dentina e osso foram realizadas nos animais com 81 dias. Defeitos nos incisivos dos ratos foram usados como escores em um índice que discriminou lesões na superfície como bandas, ilhas e cavidades. Não houve diferenças nas concentrações de F nos tecidos calcificados entre os grupos F e F+Pb. Os grupos controle e chumbo apresentaram esmalte normal. O grupo F+Pb apresentou defeitos de esmalte mais severos quando comparados com o grupo F ($P < 0.001$). Este estudo mostrou que o Pb exacerbou a fluorose dental em roedores, sugerindo que a co-exposição ao Pb pode explicar as diferenças na prevalência de fluorose.

Palavras-chave: flúor, chumbo, fluorose, incisivos de ratos, poluição ambiental.

ABSTRACT

Leite, GAS. **Effects of lead in the formation of fluorotic enamel in rats.** [dissertation] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2009.

Co-exposure to lead and fluoride may alter the degree of dental fluorosis, since both accumulate in calcified tissues. Wistar rats were allocated in four groups: control, and 3 groups that received water containing 100 ppm of fluoride (F), 30 ppm of lead (Pb), or 100 ppm of F and 30 ppm of Pb (F+Pb) since gestational age. Enamel analysis and F determinations in enamel, dentine, and bone were performed in 81-day-old animals. Incisor defects were scored using an index that discriminated surface lesions as bands, islets, and pits. There were no differences in the F concentration in calcified tissues between the F and F+Pb groups. The control and the Pb groups presented normal enamel. The F+Pb group presented more severe enamel defects compared with the F group ($P<0.001$). This study shows that Pb exacerbates dental fluorosis in rodents, suggesting that co-exposure to Pb may explain differences in fluorosis prevalence.

KEY WORDS: fluoride, lead, fluorosis, rat incisor, environmental pollution.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Índice de Fluorose para Roedores.....	34
Figura 2: Índice de Fluorose – Resultados	40
Figura 3: Microscopia de Polarização	42
Figura 4: Microscopia de Polarização – Cavidade.....	42
Tabela 1. Média da concentração de flúor ($\mu\text{g/g}$) em tecidos calcificados	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O FLÚOR	16
1.1.1 Histórico sobre a Fluorose Dental	17
1.1.2 A Fluorose Dental.....	18
1.2. O CHUMBO.....	21
1.2.1 Histórico	21
1.2.2 Cinética e Toxicologia do Chumbo	23
1.2.3 Ação do chumbo nos dentes	26
1.3 A CO-EXPOSIÇÃO AO FLÚOR E AO CHUMBO.....	27
2. PROPOSIÇÃO	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS.....	32
3.2 ANÁLISE DO DENTE E ÍNDICE DE FLUOROSE.....	32
3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE POLARIZAÇÃO	35
3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDOS CALCIFICADOS	36
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO E FLÚOR.....	37
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS.....	40
4.1 ÍNDICE DE FLUOROSE.....	40
4.2 POLARIZAÇÃO	41
4.3 DOSAGEM DE FLÚOR.....	43
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS.....	53
8. ANEXO.....	66

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O FLÚOR

O flúor (F) é o elemento mais eletronegativo do grupo dos halógenos e possui uma grande capacidade de reagir com outros elementos da cadeia periódica, formando compostos orgânicos e inorgânicos. O íon flúor tem a propriedade de se combinar reversivelmente com íons de hidrogênio para formar um ácido fraco, o HF; tem a capacidade de ser um potente inibidor de enzimas, de ter uma velocidade de eliminação dos organismos muitas vezes mais rápida que a dos demais halógenos, tem afinidade por tecidos calcificados, capacidade de estimular a formação de tecido ósseo e a sua grande característica que é a de inibir e também de reverter o processo de formação de lesão de cárie (Featherstone *et al.*, 1990).

Os benefícios do flúor na prevenção e controle das lesões de cárie são muito reconhecidos e valorizados. Estudos mostram que, além dos dentifrícios, a água de abastecimento público fluoretada tem contribuído para a redução da prevalência da doença cárie (Lima e Cury, 2001). No entanto, com a intensificação do uso em diferentes formas, há maior chance de ocorrer ingestão de doses acima da recomendada durante a formação dental e conseqüentemente maior risco de fluorose dental, transformando-se em uma preocupação de saúde pública (Aoba, 1994; Fejerskov *et al.*, 1994; Cangussu *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005).

Por isso, é importante se conhecer tanto os efeitos preventivos do flúor quanto seus efeitos tóxicos, para que sua utilização racional não seja comprometida. Seu efeito local não gera nenhum problema, ao contrário do seu efeito sistêmico. Porém a maioria de aplicação de sua forma local pode acabar em ingestão sistêmica e absorção pelo organismo. Dois tipos de efeitos tóxicos atribuídos ao fluoreto têm sido relatados: toxicidade aguda e crônica. A toxicidade aguda refere-se à ingestão de grande quantidade de fluoreto de uma só vez e pode causar desde irritação do trato gastro-intestinal até a morte. A toxicidade crônica refere-se à ingestão freqüente em pequenas doses, porém acima dos limites aceitáveis, resultando em fluorose nos dentes que estão em formação durante aquele período (Tenuta e Cury, 2005).

A ação sistêmica do fluoreto inclui irritação da mucosa gástrica, diminuição da concentração de cálcio no sangue (alterando diversos processos metabólicos), queda da pressão, acidose respiratória, depressão respiratória, arritmia cardíaca, coma e morte. A dose letal varia muito de indivíduo para indivíduo. A dose que causa algum efeito tóxico é chamada dose provavelmente tóxica (DPT). A DPT é de 5,0 mg de fluoreto por kg de peso, sendo que uma ingestão acima desse valor pode causar desde sintomas leves, como náuseas, até a morte do indivíduo (Shulman e Wells, 1997; Tenuta e Cury, 2005).

O metabolismo do flúor depende de sua ingestão, sendo que independente da quantidade de flúor que é colocada na cavidade bucal, uma porção reage quimicamente com as estruturas dentárias, outra parte é ingerida e outra pequena parte é absorvida diretamente através da mucosa bucal e passa para a corrente sanguínea. A absorção do flúor se dá no estômago e está diretamente relacionada à acidez do mesmo, ao conteúdo e a rapidez do esvaziamento gástrico para o intestino delgado (Whitford, 1996). Além do pH, a quantidade e composição dos alimentos presentes no estômago no momento da ingestão de alguma fonte de flúor, têm grande influência na absorção deste. A dieta rica em cálcio e magnésio está associada a uma baixa absorção do flúor, pois podem desencadear uma reação química formando compostos insolúveis pobremente absorvíveis (Fejerskov *et al.*, 1994).

1.1.1 Histórico sobre a Fluorose Dental

No ano de 1901 em Nápoles na Itália, um médico chamado Eager verificou modificações no esmalte dentário de moradores de uma região geograficamente rica em vulcões, onde a água de consumo apresentava uma alta concentração de húmus vulcânico. A população apresentava manchas escuras no esmalte dentário descritas como “Dente de Chiaie” (Eager, 1902).

Já em 1911, Mckay observou que era relativamente freqüente a ocorrência de um determinado grau de opacidade no esmalte dentário entre os moradores de Colorado Springs, nos EUA, e por isso foi descrita como “Mancha amarronzada do Colorado”. Estas manchas eram apenas observadas em adultos que nasceram em Colorado ou se mudaram para lá ainda bebês (Burt, 1996; Fejerskov *et al.*, 1996).

Mckay e Black, em 1916, não conseguiram estabelecer correlação entre a ocorrência destas “Manchas do Colorado” com a idade, sexo, raça, doenças infecciosas ou fatores socioeconômicos e nutricionais da população local. Porém, puderam concluir que existia uma correlação direta entre o defeito estrutural do esmalte e a presença de alguma substância na água de abastecimento público já que, a população residente na área urbana que bebia a água de Colorado Springs desde bebês (época de formação dentária) possuía manchas nos dentes e moradores da área rural não. Outra relação importante foi que, crianças da área urbana apresentavam menor índice de lesões cariosas (Fejerskov *et al.*, 1996). Black e McKay utilizaram o termo “*mottled enamel*” (esmalte mosqueado) para se referir ao esmalte com defeitos estruturais e manchados. Mais tarde, em 1928 McKay sugeriu que a substância presente na água responsável pelo manchamento dos dentes, também seria capaz de reduzir a prevalência de lesões de cárie (Burt, 1996; Fejerskov *et al.*, 1996).

Petrey em 1931, descobriu acidentalmente que a água consumida em Bauxite, cidade americana em que o esmalte mosqueado se tornou endêmico, possuía 13,7 mg F⁻/L. Com isso, foram sendo reunidos os dados sobre a presença de flúor na água e foi se tornando claro que o grau de severidade das manchas dentárias era proporcional à maior quantidade de flúor na água; assim, a afecção do esmalte mosqueado passou a ser chamado de **Fluorose** (Burt, 1996; Fejerskov *et al.*, 1996).

1.1.2 A Fluorose Dental

O esmalte dentário é o tecido mais externo da coroa dos dentes, o mais mineralizado dos mamíferos e é constituído de 95% por mineral sendo este, em maior parte, a hidroxiapatita - uma apatita de alta densidade (Gerlach e Line, 2005). Enquanto outros tecidos mineralizados, como o osso e a cartilagem, consistem de aproximadamente 20-30% de seu peso composto por matéria orgânica (Mjör e Fejerskov, 1990), o esmalte maduro contém menos de 1%. Por isso, o esmalte do dente erupcionado oferece poucos indícios a respeito de como se forma (Gerlach e Line, 2005).

Durante a amelogênese, as células que produzem a matriz protéica do esmalte são metabolicamente muito ativas e a taxa e velocidade de produção de proteínas é muito alta (fase secretória da amelogênese). A amelogênese é um

processo de desenvolvimento um tanto lento que pode levar cerca de 5 anos para se completar na coroa de alguns dentes na dentição humana permanente e mais de 2/3 do tempo de formação podem ser ocupados pelo estágio de maturação (Nanci, 2008). Esta fase que ocorre por pequenos incrementos de minerais diários ao longo de muitos anos é a fase em que o esmalte inicialmente mineralizado em 30% adquire 95% de mineral em volume (Nanci, 2008). Ou seja, nesse período, pequenas alterações metabólicas ficam registradas no esmalte em formação. Um exemplo típico é a linha neonatal, cuja matriz de esmalte está sendo secretada no momento do nascimento, registrando em todos os dentes este acontecimento (Gerlach e Line, 2005). Existem inúmeros fatores locais e sistêmicos capazes de acarretar a hipoplasia de esmalte, entre eles estão as vacinas e febre alta (Casamassimo, 2005), hipovitaminoses A e D; doenças exantematosas, hipocalcemia, trauma durante o nascimento, eritroblastose fetal, infecção ou trauma local e a ingestão de substâncias químicas, principalmente fluoretos (Seow, 1991).

A fluorose dental é um distúrbio de desenvolvimento do esmalte que ocorre pela ingestão excessiva e/ou crônica de fluoreto durante seu período formativo (Pires, 2001), especificamente na fase de maturação do esmalte (Aoba e Fejerskov, 2002).

A fluorose se manifestou entre os humanos a partir do uso indiscriminado do flúor em suas várias formas de administração como tabletes, géis, bochechos e dentifrícios fluoretados; assim como a água de abastecimento público (Fejerskov *et al.*, 1994).

Estruturalmente, a fluorose é caracterizada pelo aumento de porosidade na superfície do esmalte fazendo com que o esmalte pareça opaco, embora a camada superficial (cerca de 30µm em humanos) esteja íntegra e normalmente mineralizada (Fejerskov *et al.*, 1974, 1975). Tenuta e Cury em 2005 mostraram que dependendo da quantidade ingerida as alterações podem variar além das manchas brancas, depressões e/ou erosões na superfície do esmalte, que se apresentam com coloração castanha.

Os defeitos do esmalte dental fluorótico humano se caracterizam como regiões superficiais normalmente mineralizadas ou até hipermineralizadas e regiões subsuperficiais com menor quantidade de minerais, que se assemelham as lesões de cárie iniciais. Estudos mostram mais proteínas no esmalte fluorótico do que no

esmalte de dentes controle (Everett e Miller, 1979; Riordan e Tveit, 1982; Den Besten, 1986; Wright *et al.*, 1996).

O aumento das proteínas poderia ter várias causas, entre elas à inibição das proteinases do esmalte (Den Besten e Thariani, 1992; Smith *et al.*, 1993; Limeback, 1994), a ligação mais forte entre as proteínas estruturais do esmalte com os cristais, impedindo a sua correta proteólise, entre outras hipóteses (Aoba e Fejerskov, 2002). Trabalhos *in vitro* revelam que, mesmo em concentrações muito maiores do que aquelas provavelmente presentes no fluido da matriz do esmalte formado na presença de flúor, este não inibe as proteases do esmalte (Gerlach *et al.*, 2000a). Portanto, o assunto é muito controverso e não há consenso sobre o mecanismo que resulta em fluorose dentária (Aoba e Fejerskov, 2002).

Coplan *et al.*, 2007 sugeriram recentemente que a fluorose também é um defeito do esmalte de etiologia supostamente relacionada a alterações do componente protéico, as quais possam ser uma marca para reconhecer outras doenças também possivelmente causadas por mudanças estruturais de proteínas. Alterações na conformação de proteínas no período embrionário ou em idades precoces afetam a formação de alguns órgãos e predispõem às doenças na vida adulta.

Trabalhos mostram que a fluoretação das águas estaria ligado à fratura óssea (Newbrun, 1996), câncer e o envelhecimento precoce (Silva e Ulrich, 2000).

Por isso, os estudos sobre a prevalência e incidência da fluorose são de fundamental importância para se avaliar a severidade desta doença. Vários índices classificatórios da fluorose em humanos foram feitos. O primeiro deles foi idealizado em 1935 por Dean (Dean, 1934) e por isso ficou conhecido como “Índice de Dean”. Este descreve a aparência e a severidade da fluorose em seis diferentes níveis, os quais variam de normais a severo (Guedes-Pinto, 1997). Outro é o “Índice de Thystrup e Fejerskov” que classifica esta doença crônica em nove graus de severidade (Barros *et al.*, 2002) baseados em características clínicas e histopatológicas (Thystrup e Fejerskov, 1978). E existe também o índice TSIF (Tooth Surface Index of Fluorosis) que apresenta oito categorias (Campos *et al.*, 1998).

A fluorose também tem sido descrita em animais (Richards *et al.*, 1986; Richards, 1990) e o excesso de flúor tem sido descrito principalmente em roedores devido ao contínuo crescimento dos dentes incisivos (Everett *et al.*, 2002; Lyaruu *et al.*, 2008). A fluorose dentária em cervos europeus tem sido proposta como uma

ferramenta para monitorar a variação espacial e temporal na poluição ambiental por fluoreto em uma determinada região (Kierdorf *et al.*, 1995, 1999).

Em seres humanos, a maioria dos estudos de prevalência de fluorose aponta para um maior grau de fluorose nos primeiros molares permanentes (Ismail *et al.*, 1990). O momento crítico para o desenvolvimento de fluorose é descrita nas idades entre 1 e 4 anos e autores atribuem este aumento da prevalência de fluorose nos dentes que mineralizam nesta idade principalmente ao aumento da exposição destas crianças a maiores quantidades de flúor através da ingestão de dentifrícios fluoretados (Osugi *et al.*, 1988). No entanto, esta pode não ser a única explicação, pois já há indícios de que outros fatores podem alterar a prevalência de fluorose nas populações humanas, como o uso de amoxicilina (Hong *et al.*, 2005). Neste trabalho, Hong e colaboradores (2005) mostram a relação entre a fluorose de dentes permanentes e a amoxicilina no início da infância (3-6 meses de idade) e sugerem que a exposição de antibiótico nesta faixa etária aumenta o risco de fluorose e defeitos no esmalte de dentes permanentes.

A prevalência de fluorose pode se elevar quando outros defeitos aumentam e cuja diferenciação da fluorose não é fácil. Um exemplo de um defeito deste tipo seria a hipoplasia causada por dioxina (Kuscu *et al.*, 2009), hipomineralizações de causa idiopática e hipoplasias resultantes de trauma no dente decíduo durante a fase de maturação do esmalte (Seow, 1991), todas estas lesões constantemente encontradas em crianças são de difícil diagnóstico diferencial com lesões de fluorose leves a moderadas.

1.2. O CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal tóxico, insípido, inodoro e maleável. Os minerais que se ligam mais comumente a este metal são a galena que é o sulfeto de chumbo, a cerusita que é o carbonato de chumbo branco e a anglesita que é o sulfeto de chumbo transparente (Klaassen e Curtis, 1991).

1.2.1 Histórico

Em 4000 a.C. o chumbo já era visto em maquiagens à base de cerusita que as mulheres usavam e, desde então, existem evidências de crianças que

morreram contaminadas por pó do metal, a partir do contato com suas mães (Nriagu, 1983).

Os Faraós e reis assírios escreviam mensagens em pedaços de chumbo e ancestrais chineses escreviam em bambu com tinta de chumbo branco (Xenophon, 1968).

Hipócrates em 500 a.C. relatou cólicas severas em trabalhadores de extração de metais. Em 200 a.C. estima-se que 75% do chumbo de Roma era subproduto da mineralização da prata e em 50 a.C. a demanda da República era muito grande e praticamente todo metal conseguido era consumido. Este metal passou a fazer parte de encanamentos, soldas e pela sua alta densidade, passou a ser utilizada pelos gregos para se confeccionar projetéis (Paterson, 1988).

Na Europa, os vinicultores empregavam o chumbo na produção de vinho. Com a experiência eles descobriram que o chumbo poderia retardar a fermentação. Os vinhos, quando armazenados na presença deste metal, duravam mais tempo e possuíam um gosto mais suave (Nriagu, 1968).

Historiadores de arte estão examinando biografias de pintores para evidenciar que a tendência de associar “genialidade, loucura e melancolia” pode ser consolidada no amplo uso de pigmentos contendo chumbo através dos séculos. Em 1713, o médico Bernardino Ramazzini publicou suas suspeitas que Corregio e Rafael foram igualmente vítimas da contaminação pelo chumbo (Nicander, 1966).

O chumbo também era usado em outras substâncias como na pintura de cerâmicas e utensílios esmaltados com compostos de chumbo para preparação de alimentos (Nriagu, 1968).

A comprovação de que baixas doses de chumbo são tóxicas foi demorada e uma das razões era o uso de métodos pré-analíticos inadequados que levavam a resultados erroneamente altos em quaisquer amostras que se testasse. Quem descobriu este problema foi um geoquímico chamado Patterson que desenvolvia trabalhos com isótopos de chumbo para determinar a idade da terra. Ele definiu a idade da terra em 1956 e também observou que os problemas analíticos que enfrentava eram devido à contaminação dos ambientes habitados por concentrações altas de chumbo (Flegal, 1998). Começou então pesquisas com água do mar e sedimentos marinhos, que indicaram que a água da superfície continha concentrações 10 vezes mais altas de chumbo do que os sedimentos e que esta era de origem recente, do período industrial (Flegal, 1998). Patterson utilizou os

registros de geleiras para aferir o grau e os períodos de aumento na contaminação da crosta terrestre por chumbo causada pela atividade humana. O primeiro aumento apreciável de chumbo na crosta terrestre data deste período, tendo havido um segundo aumento marcante de chumbo que data da época da Revolução Industrial e o terceiro aumento bem maior a partir de 1940 (Patterson, 1965). Este último, é devido à expansão da frota de veículos que utilizava gasolina contendo chumbo como aditivo (o chumbo tetraetila). Apesar destas informações geoquímicas sobre a contaminação antropogênica da crosta terrestre terem surgido na década de 60 e de se saber dos efeitos da intoxicação aguda por chumbo desde a antiguidade, só em 1979 foi publicado o primeiro estudo comprovando os efeitos adversos da exposição de crianças a baixas doses de chumbo sobre o QI e o desempenho escolar (Needleman *et al.*, 1979).

1.2.2 Cinética e Toxicologia do Chumbo

A absorção do chumbo pelo organismo humano acontece por meio da inalação de partículas de metal, por via digestiva e/ou absorção dérmica de produtos orgânicos do chumbo tetraetila e acetato de chumbo (Goyer e Clarkson, 2001). Uma vez absorvido pelo trato gastrintestinal ou vias aéreas superiores, o chumbo entra na corrente sanguínea e cerca de 95% se liga aos eritrócitos e pode se depositar nos tecidos moles ou duros (Rabinowitz, 1991).

Inúmeros estudos têm fornecido evidências de que a mobilização de chumbo nos ossos para o sangue é intensificada durante os períodos de maior liberação óssea, tais como crescimento rápido na infância, gravidez, lactação, menopausa, desequilíbrios hormonais, entre outros (Smith *et al.*, 1996).

Enquanto adultos absorvem de 10 a 15% do chumbo ingerido, e armazenam 5% do que é absorvido, as crianças absorvem cerca de 41,5% e retêm cerca de 38,1% (Ziegler *et al.*, 1978). Em condições sistêmicas alteradas de ferro, cálcio e zinco, a absorção é aumentada (Wright *et al.*, 1998, 1999, 2003; Bradman *et al.*, 2001). Uma vez no organismo, a porção do chumbo que é absorvida depende de sua forma física, química, tamanho da partícula e solubilidade do componente específico (Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR, 1999). Uma vez absorvido no sangue, a meia vida do chumbo fica em torno de 35 dias (Rabinowitz, 1976).

Embora agências de saúde e de controle ambiental recomendem um limite máximo de exposição ao chumbo, estes limites não significam que níveis mais baixos seriam seguros para a saúde humana. Por exemplo, a Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho tem como valor de referência de normalidade (VR) o nível sanguíneo de chumbo de 40µg/dL, e como Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) o nível de 60µg/dL (Manuais de Legislação Atlas, 1997). Estes níveis estão bem acima daquele estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1986) de 20µg/dL como limite máximo para a população adulta. No caso de crianças, que são mais susceptíveis aos efeitos do chumbo, este limite é de 10µg/dL. Trabalhos mostram que níveis de 2,5 ug/ml já causam diminuição no QI (Lanphear *et al.*, 2000). Mesmo os limites atualmente recomendados pela OMS são considerados altos, pois existem evidências de que não há limites para os efeitos deletérios da contaminação do chumbo (Coplan *et al.*, 2007). Portanto, hoje se aceita que qualquer contaminação por chumbo afete em maior ou menor grau a saúde humana.

A exposição ao chumbo pode significar risco de morte e dentre os seus efeitos conhecidos na saúde estão incluídos problemas no metabolismo da vitamina D, nefropatias e hipertensão (Haavikko *et al.*, 1984; Needleman e Bellinger, 1991; Goyer e Clarkson, 2001). Os efeitos deletérios do chumbo também são observados no sistema nervoso central, hematológico, reprodutivo, renal, imunológico e cardiovascular, além dos tecidos ósseos (Cicuttini *et al.*, 1994).

Em crianças, os efeitos deletérios das intoxicações crônicas são mais expressivos do que nos adultos. Para um mesmo nível de chumbo no sangue, os efeitos deletérios são mais severos em crianças, pois o chumbo interfere em órgãos e sistemas ainda em desenvolvimento (Needleman e Bellinger, 1991; Cicuttini *et al.*, 1994; Wigg, 2001). Quando a ação crônica do chumbo age sobre o sistema nervoso central leva a prejuízos no desenvolvimento neurofisiológico e neurocomportamental das crianças, hiperatividade, diminuição do aprendizado, das funções cognitivas e ainda, diminuição da audição (Needleman *et al.*, 1979; Frank *et al.*, 1990). Interferindo sobre o metabolismo ósseo, o chumbo resulta em baixa estatura e reduzida circunferência craniana (Schwartz *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1995).

Além de efeitos mais severos, as crianças são também mais suscetíveis à intoxicação por chumbo do que os adultos devido à maior absorção

gastrointestinal (Ziegler *et al.*, 1978). A vulnerabilidade à contaminação pelo chumbo tem início desde a vida intra-uterina. Durante a gestação o metabolismo ósseo da mãe se modifica em consequência das alterações hormonais e depósitos de chumbo em tecidos ósseos são liberados na corrente sanguínea, afetando a saúde do feto via placenta. Este processo continua durante a lactação e a criança pode ser contaminada por chumbo através do leite materno (Silbergeld, 1986; Hernandez-Avila *et al.*, 1996). Além disso, há evidências de que o chumbo se concentra no leite materno e este, pode ter o nível de chumbo muito alto em regiões contaminadas (Hallen *et al.*, 1995).

Finalmente, nos primeiros anos de vida, o hábito de levar a mão e objetos à boca aumenta o risco de exposição no caso de contaminação ambiental; assim como o contato com as vestes contaminadas dos pais (ou adultos) que trabalham com o metal (Calabrese *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1997; Albalak *et al.*, 2003).

O chumbo se assemelha ao cálcio, sendo depositado em tecidos mineralizados (ossos e dentes) ou excretado pelo sistema urinário (Simons, 1986; Rabinowitz, 1991). A grande afinidade do chumbo por tecidos mineralizados faz com que mais de 90% deste metal circulante na corrente sanguínea seja depositado nos tecidos ósseos (Barry, 1975; Hu *et al.*, 1998). Desta forma, o osso passa a funcionar como um reservatório de chumbo. Uma vez que os tecidos ósseos estão em constante remodelação, quando a concentração de chumbo no sangue diminui (quando a exposição atual cessa ou diminui), o chumbo armazenado no osso retorna à corrente sanguínea. Já nos tecidos dentários, como não existe remodelamento, o chumbo fica aprisionado, sendo, portanto, um registro da história da exposição ao metal (Gulson *et al.*, 1996).

O chumbo é um metal muito estudado por causa da prevalência deste íon no osso devido a sua toxicidade e a possibilidade de intervir no desenvolvimento de tecidos animais e humanos. O chumbo exerce toxicidade sistêmica durante a exposição aguda ou quando o osso libera este na circulação, alterando a função cognitiva nas crianças e aumentando a pressão arterial nos adultos. O chumbo exerce efeito tóxico direto no osso e está associado com anormalidades de desenvolvimento (Silbergeld, 1991).

1.2.3 Ação do chumbo nos dentes

O esmalte talvez seja o melhor registro da história das células formadoras de um tecido, pois a maior parte dele não sofre alterações depois de sua formação. Isso não ocorre com a matriz extracelular de tecidos moles nem com a matriz extracelular de tecidos mineralizados como o osso, que sofre remodelação constante (Gerlach e Line, 2005). O esmalte é um tecido de origem epitelial que se caracteriza pela deposição de uma matriz protéica, cuja degradação por proteases é um passo chave para a perfeita mineralização (Smith, 1998). Uma das hipóteses mais citadas para explicar a fluorose dentária, é que o flúor inibiria as proteases do esmalte (Den Besten e Thariani, 1992, Smith *et al.*, 1993, Limeback, 1994), mas há outros trabalhos que não mostram essa inibição *in vitro* (Gerlach *et al.*, 2000a). O chumbo, por outro lado, inibe as proteases do esmalte mesmo em concentrações de 110 μM (Gerlach *et al.*, 2000b), mas não causa qualquer tipo de alteração no esmalte de ratos visível na boca, embora cause um aparente aumento do conteúdo protéico em estágios precoces da amelogênese (Gerlach *et al.*, 2002). Esse aumento do conteúdo protéico desaparece, talvez por um mecanismo compensatório, já que foi registrada a diminuição na velocidade de erupção (no modelo do incisivo de rato), que parece explicar o achado de normalidade do esmalte encontrado na cavidade bucal desses animais expostos tanto a baixas quanto a altas concentrações de chumbo (Gerlach *et al.*, 2000c). Em dentes humanos, não foi demonstrada qualquer alteração do esmalte dentário formado em regiões contaminadas por chumbo (Youravong *et al.*, 2005), embora alguns trabalhos mais antigos sugiram que hipoplasias de esmalte possam estar associadas com a exposição a níveis aumentados de chumbo (Lawson *et al.*, 1971).

O chumbo pode influenciar o desenvolvimento dos dentes por substituir o cálcio e fazer com isso um esmalte menos resistente ao ataque ácido (Simmons, 1986). A observação feita por Lawson e colaboradores em 1971, mostrou que hipoplasia de esmalte foi observada em crianças expostas a níveis aumentados de chumbo. Injeção intravenosa de acetato de chumbo em ratos produz uma resposta na dentina formação espaços interglobulares contínuos e hipomineralizados (Appleton, 1991), provavelmente devido a um efeito nos odontoblastos e perda de cálcio intercelular.

Os biomarcadores indicam a exposição individual ao chumbo e sua concentração pode refletir a história de exposição passada ou recente. Inúmeros

biomarcadores para chumbo já foram citados na literatura, dentre os quais, sangue, plasma, osso, saliva, cabelo, unha, urina, fezes, dentes, porém cada um deles tem validade variável e revela uma situação específica (Barbosa *et al.*, 2005).

A incorporação de chumbo na hidroxiapatita da dentina acontece como reflexo dos níveis de chumbo no sangue durante a mineralização (Rabnowitz *et al.*, 1993). Mesmo depois da erupção dental, a dentina continua sendo depositada, porém em ritmo mais lento. Assim ela é um indicador da exposição ao chumbo durante toda a vida do indivíduo. A análise de dentes decíduos esfoliados pode fornecer dados importantes sobre a história de contaminação por chumbo desde a vida intra-uterina (Rabnowitz *et al.*, 1993).

Needleman e colaboradores em 1979 analisaram a toxicidade do chumbo em crianças pré-escolares usando o dente como marcador, correlacionando o efeito tóxico do chumbo com prejuízos no desenvolvimento neurofisiológico e neurocomportamental das crianças, hiperatividade, diminuição do aprendizado e das funções do sistema cognitivo.

Trabalhos recentes mostraram uma alta associação entre o aumento de níveis de chumbo no sangue de pré-escolares e o aumento nas taxas de criminalidade em muitos países. Portanto, é preocupante a exposição ao chumbo pelo organismo, mesmo a “baixas” doses (Nevin, 2007).

1.3 A CO-EXPOSIÇÃO AO FLÚOR E AO CHUMBO

A exposição ao flúor durante a fase de maturação da amelogenese leva à formação de defeitos no esmalte conhecidos como fluorose dentária. Além das alterações celulares, também outros tipos de registro podem ser encontrados no esmalte, como a presença de metais pesados que foram incorporados ao esmalte por estarem presentes no organismo durante o período de formação dos dentes (Gerlach e Line, 2005).

O fluoreto de silício, o fluorsilicato de sódio e o ácido fluorsilícico são usados em 90% na fluoretação de água nos EUA (Mass *et al.*, 2007). A concentração de chumbo no sangue dobra em crianças de comunidades que possuem fluoretação de água com fluoreto de silício em relação à concentração de chumbo de crianças de comunidades de água não fluoretada. O fluoreto de silício está associado à severa corrosão dos canos de abastecimento de água e leva ao

aumento da concentração de chumbo na água das torneiras (Coplan *et al.*, 2007). O aumento do chumbo no sangue de crianças residentes em casas construídas antes da década de 50 e que bebiam água fluoretada também foi demonstrado (Macek *et al.*, 2006).

Crianças de 12 a 36 meses de idade têm maiores chances de terem picos de exposição ao chumbo, pois este é o momento em que estas crianças levam a mão e todos os objetos à boca (Binns *et al.*, 2007), coincidindo com a época de maior ingestão de flúor e manifestação da fluorose (Osuji *et al.*, 1988).

Os benefícios da fluoretação da água para prevenir lesões de cáries são inquestionáveis. No entanto, nos últimos anos, as preocupações foram levantadas em relação à associação de flúor e chumbo na água potável (Masters *et al.*, 2000). Particularmente, as crianças que vivem em comunidades que relataram ter H_2SiF_6 (ácido fluorsilícico) como agente da fluoretação da água potável têm a maior concentração de chumbo no sangue total (Masters *et al.*, 2000). O flúor e o chumbo são substâncias chamadas de “bone-seeking agents”, ou seja, caracterizadas pela alta afinidade pelo osso (Stepensky *et al.*, 2003). E esta associação poderia afetar mutuamente absorção ou metabolismo, resultando em alterações nas concentrações de chumbo ou de flúor nos tecidos. Evidências recentes mostram que os animais co-expostos ao chumbo e flúor apresentaram 2,2 vezes mais chumbo no osso e 3 vezes mais chumbo no tecidos dentários em comparação com a exposição apenas ao chumbo, sem alterações na concentração de flúor nos tecidos calcificados (Sawan *et al.*, submetido).

O chumbo também foi indicado por atrasar a amelogênese em roedores, embora o aspecto físico final do esmalte esteja normal (Gerlach *et al.*, 2002). Uma vez que a fluorose dentária resulta do efeito do flúor sobre o esmalte formado, temos hipótese de que o chumbo pode alterar a fluorose dentária em roedores, mesmo que na ausência de alterações na concentração de flúor em tecidos de animais co-expostos ao chumbo e flúor. Assim, é preciso testar em um modelo animal controlado, quais os efeitos de flúor e chumbo isoladamente, ou em associação, nos dentes.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

Verificar os efeitos do chumbo na formação do esmalte fluorótico em ratos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar em lupa (40x), quantificar e comparar o esmalte superficial de incisivos de ratos controle, ratos expostos a 100 ppm de flúor (quantidade que causa fluorose em roedores), ratos expostos a 100 ppm de flúor e 30 ppm de chumbo e ratos expostos a 30 ppm de chumbo.
- Observar e descrever o esmalte formado nos 4 grupos de animais em cortes transversais de 100 μ m vistos em microscopia de polarização.
- Quantificar e analisar as concentrações de flúor.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade de São Paulo / Campus de Ribeirão Preto (Protocolo 07.1.346.53.3).

Os animais foram obtidos a partir da colônia do biotério central da Universidade de São Paulo / Campus de Ribeirão Preto. Vinte e oito ratos Wistar jovens adultos (24 fêmeas e 4 machos) pesando 190-210g foram utilizados neste estudo. As ratas fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos de 6 fêmeas e um macho de acordo com a dieta pré estabelecida para acasalarem. O grupo *Controle* recebeu água potável, o grupo *F* (flúor) recebeu água potável com 100 ppm de ácido fluorsilícico (H_2SiF_6), o grupo *Pb* (chumbo) recebeu água potável com 30 ppm de acetato de chumbo triidratado ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (mg/L) e finalmente, o grupo *F+Pb* (flúor+chumbo) recebeu a água potável com a associação de 100 ppm ácido fluorsilícico com 30 ppm de acetato de chumbo. Tanto a água quanto a comida foram fornecidas à vontade aos animais, e estes foram mantidos em ciclos de 12h/12h de claro e escuro.

As fêmeas foram separadas dos machos depois que ficaram grávidas e alojadas cada uma em uma gaiola separada para completar a gestação e parir os filhotes. Estes ficaram com suas mães no período de amamentação que é de 21 dias. Depois do desmame estes ratos passaram a receber a mesma água de tratamento que as mães estavam recebendo e foram mortos com 81 dias.

Nove ratas de cada grupo foram utilizadas para a coleta de amostras para este estudo. Os fêmures e os incisivos superiores e inferiores de cada animal foram coletados *post-mortem* para a análise.

3.2 ANÁLISE DO DENTE E ÍNDICE DE FLUOROSE

Incisivos superiores e inferiores de 9 animais de cada grupo foram utilizados para este estudo. Os dentes foram secos e fotografados usando uma câmera (Canon XP, 10 megapixels) e uma lente (Canon MP-E 65mm). O exame

inicial das fotografias revelou que era impossível a utilização de uma imagem digital por um programa de quantificação de áreas que iria usar as cores branco/marrom. Por isso, definiu-se um Índice de Fluorose para dentes de ratos que é descrito em detalhes na Figura 1. Este Índice de Fluorose em roedores é baseado no Índice TF (Thylstrup e Fejerskov, 1978), porém com algumas modificações. O índice proposto possui 5 escores, variando de escore 1 (esmalte normal) à escore 5 (fluorose severa, esmalte com uma pior aparência, mostrando grandes áreas brancas e cavidades). Os estádios intermediários foram classificados de escore 2 a 4. Estes escores foram descritos de acordo com aparência fluorótica dos dentes de ratos, onde estavam presentes as características típicas de bandeamento da fluorose, a formação de ilhas (que seria a união destas bandas pigmentadas) e a formação de cavidades (como mostra a figura 1, abaixo).

Figura 1. Índice de Fluorose para Roedores. Escores usados para classificar os dentes superiores e inferiores dos ratos (barra = 1cm).

Apenas o esmalte da parte irrompida de cada dente foi examinado. Nos incisivos superiores, esta área foi dividida em quatro segmentos de 3 milímetros e apenas os 2 segmentos do meio foram analisados. Nos incisivos inferiores, o esmalte foi dividido em três segmentos de 3 milímetros e também só o segmento médio foi analisado. A porção incisal foi excluída porque muitos dos dentes apresentavam no esmalte sinais de desgaste. O esmalte perto do alvéolo foi também menos representativo e não foi utilizado para análise. As amostras de cada animal foram analisadas por 2 examinadores calibrados diferentes que observaram todos os dentes em um esteriomicroscópio (Nikon Instruments Inc. NK-150), com ampliação de 10 vezes e com iluminação direta. A variabilidade inter e intraexaminadores foram estimadas pelo cálculo do Kappa. O Kappa Intraexaminador foi de 0,8 e o Kappa interexaminadores foi de 0,86.

3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE POLARIZAÇÃO

A polarização é a natureza vetorial da luz e, no caso da microscopia óptica, está relacionada à direção de vibração do vetor do campo elétrico. No microscópio de polarização, dois polarizadores em posição cruzada impedem a passagem da luz, criando um campo de visão escuro. Apenas materiais birrefringentes podem girar o vetor de vibração do campo elétrico da luz polarizada que atravessa a amostra, possibilitando sua visualização como estruturas brilhosas contra um campo escuro. Os materiais birrefringentes apresentam dois índices de refração, cada um em um eixo posicionado perpendicular ao outro. Quando o material é posicionado a 45° de qualquer um desses eixos, o brilho máximo aparece através das oculares. Dependendo da diferença entre os dois índices de refração, isto é do retardo de fase, certas cores de interferência podem ser vistas. No esmalte dental, a microscopia de polarização tem sido usada principalmente para analisar o conteúdo mineral. A birrefringência observada no esmalte é a soma da birrefringência intrínseca (relacionada à fase mineral e com sinal positivo) (Sousa *et al.*, 2006). Quanto mais negativa a birrefringência, maior o volume mineral da camada (Thenus *et al.*, 1993).

Para a análise de microscopia de polarização deste estudo foram usados três incisivos de ratos representativos de cada escore (escores de 1 a 5). Os dentes foram desgastados em lixas d'água em secções longitudinais de 100µm de

espessura de esmalte e analisados com a colaboração do Professor Frederico Barbosa de Sousa do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba.

As análises qualitativas foram realizadas utilizando microscopia de campo escuro e microscopia óptica de polarização. Os dentes já desgastados foram imersos em água destilada por 24 horas, seguido por imersão em solução de Thoulet por 48 horas com índice de refração 1,62 (preparados com água destilada, iodeto de potássio e iodeto de mercúrio). As camadas analisadas foram da superfície para o limite amelo-dentinário e todas as amostras foram fotografadas representativas e foram tomadas em uma única sessão sob condições padronizadas de iluminação e configurações usando uma câmera digital CMOS 1/2.5 (Moticam 2500, Motic, China) anexada ao microscópio polarizador (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) e uma lente objetiva de 10X. A espessura das amostras foi determinada no microscópio óptico com a amostra posicionada com a extremidade voltada para a objetiva e usou-se uma retícula graduada calibrada. As medidas de espessura foram feitas com uma exatidão de ± 2 micrômetros.

3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDOS CALCIFICADOS

Um dos fêmures de cada animal foi totalmente dissolvido em 6 mL de HNO_3 a 65%. Desta solução, foi utilizada uma alíquota para a dosagem da concentração de flúor e fósforo.

Amostras de esmalte foram obtidas utilizando uma biópsia da superfície do esmalte com ácido, um procedimento realizado em um eppendorf com 500 μL de HNO_3 em 1,8% (v / v). A face labial do terço incisal do incisivo inferior foi mantida em contato com o ácido durante 20 segundos. O eppendorf foi inclinado formando um ângulo 35° em relação ao plano horizontal, para facilitar o contato do líquido com o esmalte superficial do dente. Para a análise em dentina, um fragmento desta foi completamente dissolvido em 500 μL de HNO_3 a 50% (v / v). Da mesma forma que os demais, uma alíquota foi utilizada para a quantificação de flúor e fósforo.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO E FLÚOR

As concentrações de fósforo presentes nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925) e as alterações descritas em Gomes *et al.*, 2004 e Costa de Almeida *et al.*, 2007, cujo princípio é que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é, em seguida, reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. A determinação das concentrações de fósforo foi realizada em triplicata. As variações entre as triplicatas foram de 0,2 a 6,3%. A reação consistiu de 30µl de amostra, 220µl de água deionizada e 50µl da solução de ácido molíbdico (molibdato de amônio a 2,5% (p/v) em 4N H₂SO₄), que foram cuidadosamente agitados. Após 10 minutos, 20µl do agente redutor foram adicionados à mistura e agitados novamente. O agente redutor consiste em uma mistura em pó preparado com 1-Amino-2-Naphthol-4-ácido sulfônico, sulfito de sódio e bissulfito de sódio na proporção 1:6:6. Minutos antes de usar, é misturado em água (2,5% (w/v)).

Após 20 minutos, a absorbância foi medida a 660nm. O aparelho foi calibrado com padrões que apresentavam concentrações conhecidas de fósforo, que foram de: 1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml e 8µg/ml, utilizadas para a realização da curva de calibração.

O teor de fosfato em cada amostra de biópsia foi utilizado para calcular a quantidade de esmalte avaliada (g), pressupondo que o teor de fósforo no esmalte é igual a 17,0% (Halse e Selvig, 2007), de dentina igual a 15,97% (Tjäderhane *et al.*, 1995) e osso é igual a 13,5 (de Menezes *et al.*, 2003).

Para a determinação do flúor, 100µL de amostra foram misturados com 900µL de água deionizada, e 100µL de TISAB II (1,0 M de tampão acetato, pH 5,0 com 1,0 M NaCl e 0,4% ácido ciclohexanodiaminetetracético). As amostras foram agitadas à temperatura ambiente, e a concentração de flúor foi determinada em um íon analisador (Orion EA-940), previamente calibrado com uma curva padrão de flúor (0,5-5,0mg/ml) preparadas nas mesmas condições que a amostra. Os resultados foram expressos como mg F/g de esmalte, dentina e osso.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações de flúor no osso, esmalte e dentina foram comparadas por ANOVA não paramétrica. Os índices de fluorose dos animais foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ÍNDICE DE FLUOROSE

Os animais do grupo controle e chumbo não mostraram sinais de fluorose nos seus dentes, assim todos os incisivos de animais destes grupos apresentaram escore 1 (Figura 2) e não apresentaram diferenças entre estes grupos. Os animais do grupo F e do grupo F+Pb apresentaram a aparência clássica de esmalte fluorótico em roedores e nenhum animal destes dois grupos apresentaram aparência de esmalte normal. No entanto, como mostrado na figura 2A, a comparação dos índices de fluorose (utilizado como detalhado na Figura 1) mostrou que os animais do grupo F+Pb tiveram um número significativamente maior de grau de fluorose em incisivos superiores ($P<0,0001$). Enquanto os animais do grupo F tiveram uma mediana de 2,0 em incisivos superiores, os animais do grupo F+Pb apresentaram uma pontuação mediana de 3,25. O mesmo aconteceu quando os resultados do grau de fluorose em incisivos inferiores foram comparados (Figura 2B). Os índices mais elevados de fluorose foram também observados nos dentes desses animais do grupo F+Pb ($P<0,0001$). Os animais do grupo F tiveram uma mediana de 2 em incisivos inferiores e os animais do grupo F+Pb apresentaram um escore mediano de 4,0 nos dentes.

Figura 2: Índice de Fluorose. O quadro acima demonstra os escores encontrados nos dentes superiores e inferiores, respectivamente.

4.2 POLARIZAÇÃO

Todas as amostras apresentaram birrefringência de esmalte positiva em água e birrefringência negativa em solução de Thoulet 1,62. O esmalte fluorótico mostrou um aumento marcante na birrefringência positiva e uma correspondente birrefringência negativa menor em Thoulet 1,62 em comparação com os grupos controle e chumbo. Assim, o melhor contraste entre as bandas brancas e pigmentadas foi conseguido em imersão em água usando o filtro vermelho 1. O esmalte do dente do grupo controle e chumbo mostraram birrefringência positiva baixa (Figura 3A e 3B). As bandas do esmalte fluorótico (bandas claras) se apresentaram com maior área de birrefringência positiva (Figura 3C). Em um grau mais avançado de fluorose foi possível identificar ilhotas caracterizadas por partes de duas bandas brancas consecutivas que se apresentam contínuas (sem separação por banda escura), com alta birrefringência positiva, adjacente a uma banda pigmentada com baixa birrefringência positiva (Figura 3D). Na foto seguinte (Figura 3E) a extensão inciso-cervical da área de alta birrefringência positiva aumenta ao longo da superfície bucal. Em um escore mais avançado, temos a presença de cavidade (Figura 3F) cuja aparência é de uma fratura em esmalte (atingindo dentina) adjacente a uma área com alta birrefringência positiva. Na figura 4 também o escore mais avançado de fluorose e a presença da cavidade é mostrada pela seta.

Figura 3: Microscopia de Polarização (barra = 100 μ m).

Figura 4: Microscopia de Polarização — Cavidade (Barra = 100 μ m, E = esmalte, D = dentina, a seta aponta para a cavidade).

4.3 DOSAGEM DE FLÚOR

Conforme mostrado na tabela 1, os animais dos grupos que receberam flúor apresentaram aumento das concentrações de flúor nos tecidos calcificados, em comparação com os grupos controle e Pb em todos os tecidos analisados ($P < 0,001$).

E não houve diferença nas concentrações de flúor nas amostras de esmalte, dentina ou osso entre os grupos F e F+Pb ($P > 0,5$ para todas as comparações).

Tabela 1. Média ($\pm$ Desvio Padrão) da concentração de flúor ($\mu\text{g/g}$) em tecidos calcificados.

Tecidos	Controle	F	F+Pb	Pb
Esmalte	1390 $\pm$ 757 ^b	3318 $\pm$ 1,507 ^a	3689 $\pm$ 1,063 ^a	1524 $\pm$ 166 ^b
Dentina	187 $\pm$ 75 ^b	1515 $\pm$ 550 ^a	1379 $\pm$ 194 ^a	223 $\pm$ 26 ^b
Osso	1116 $\pm$ 625 ^b	5367 $\pm$ 584 ^a	5157 $\pm$ 138 ^a	709 $\pm$ 87 ^b

^a $P > 0,5$ para F versus F+Pb.

^b $P < 0,001$ para comparação de F e/ou F+Pb com o grupo C e grupo Pb.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra pela primeira vez que os efeitos do flúor sobre o esmalte em formação podem ser alterados pela co-exposição dos animais ao chumbo, exacerbando a fluorose em incisivos superiores e inferiores. As observações descritas foram possíveis através do índice de fluorose em dentes de roedores propostos como uma ferramenta importante para discriminar a severidade da fluorose em roedores. A utilização deste índice permitiu detalhadas comparações entre os dois grupos baseados no grau de severidade das alterações observadas no esmalte fluorótico. Nas amostras foram definidas linhas brancas, ilhotas e sulcos como os principais resultados que caracterizaram os dentes fluoróticos e os exemplos destes diferentes defeitos são mostrados na Figura 1. Apenas os animais do grupo F+Pb exibiram escore 5, ambos em incisivos superiores e inferiores, o que indica que o grau de fluorose é realmente mais grave neste grupo de animais. O escore 5 é a única classificação em que aparecem cavidades, que são a expressão extrema de fluorose nesses animais.

Como mostrado em humanos (Thylstrup e Fejerskov, 1978), em primatas (Suga, 1989) e em veados (Kierdorf *et al.*, 1995, Kierdorf e Kierdorf, 1999) no esmalte há uma progressividade entre lesões fluoróticas leves, moderadas e severas, tanto a nível clínico quanto histopatológico.

Assim como trabalhos anteriores mostraram a caracterização das lesões fluoróticas em incisivos de ratos (Saiani *et al.*, 2009) este estudo traz mais uma prova de que o esmalte do dente de rato que está em constante crescimento tem, de fato, muitas semelhanças com o esmalte dentário humano e que pode exibir uma ampla variedade de defeitos. Esta variação morfológica no esmalte em incisivos fluoróticos de roedores não havia sido descrita anteriormente, mesmo com vários trabalhos que utilizaram diferentes concentrações de flúor administradas a ratos.

Não se sabe se as cavidades mostradas no grau mais severo de fluorose do grupo F+Pb são verdadeiras hipoplasias ou se foi resultado da perda do esmalte resultante da hipomineralização. No entanto, Kierdorf e colaboradores em 1996 mostrando a fluorose em cervos europeus residentes em ambientes contaminados de regiões da Europa caracterizaram alguns destes defeitos de esmalte que aparecem como cavidades que são verdadeiras hipoplasias e que

foram formadas em um único processo que envolveu secreção diminuída ou abandono de secreção da matriz de esmalte pelos ameloblastos (Kierdorf *et al.*, 1996). Nos seres humanos, em graves manifestações de fluorose, esses defeitos não foram descritos. Uma vez que, estas cavidades presentes em esmalte fluorótico de incisivos de ratas não haviam sido descritas até agora e que não houve aumento das concentrações de flúor nos tecidos, pode ser que a cavidade encontrada neste estudo (Figura 4) se assemelhe ao encontrado nas hipoplasias verdadeiras do esmalte dos veados da Europa e devem ser cuidadosamente estudadas em ratos e em outras espécies pra saber se estas cavidades resultam de um defeito específico provocado pelo chumbo. Os dentes descritos em alguns dos trabalhos de Kierdorf (Kierdorf *et al.*, 1996) foram obtidos de cervos (*Cervus elaphus L.*) da região da Bohemia do Norte e República Tcheca, que é uma região com áreas em que houve mineração de chumbo (Kvet, 1994). Recentemente, Kierdorf e colaboradores também mediram o chumbo no osso e dente de veados expostos ao chumbo em três regiões da Alemanha e observaram diferenças nestes tecidos, concluindo que esses animais podem ser utilizados como marcadores de contaminação ambiental (Kierdorf *et al.*, 2008).

A dose de 100 ppm de flúor foi utilizada em muitos estudos, pois foi estabelecido que esta quantidade de flúor resulta em concentrações séricas nos ratos que são aproximadamente iguais aos níveis séricos alcançados pelas pessoas que estão expostas diariamente aos 5-10 ppm de flúor na água potável de abastecimento público (Mullenix *et al.*, 1995). Estas concentrações de fluoreto não foram responsáveis pelo aumento da fluorose, já que as concentrações de flúor não se alteraram entre os grupos (como mostra a tabela 2). Assim, os defeitos mais graves observados no grupo F+Pb seriam provocados por um efeito aditivo ou sinérgico da co-exposição ao flúor e ao chumbo. Deve ser enfatizado que a exposição crônica à 30ppm de chumbo na água potável não produziu qualquer alteração no presente estudo, no entanto esta dose de chumbo é considerada baixa em muitos estudos com animais (Leasure *et al.*, 2008). Mesmo sabendo que a concentração de chumbo nos tecidos calcificados é de 2 a 3 vezes maior no grupo F+Pb (Sawan *et al.*, submetido) estas concentrações ainda não mostraram defeitos no esmalte na ausência do flúor. A administração do chumbo em concentrações de 34 e 170 ppm em ratos durante 70 dias na água potável mostrou que não houve alteração nas propriedades físicas superficiais no esmalte “maduro” dos incisivos,

porém a mineralização do esmalte foi adiada e uma maior quantidade de proteínas foram encontradas na fase secretória e por isso teve uma precoce maturação quando comparada com o grupo controle (Gerlach *et al.*, 2002).

O chumbo é um conhecido inibidor de enzimas e foi demonstrado que o chumbo inibe as proteinases do esmalte *in vitro* enquanto que o flúor sob as mesmas condições e em concentrações muito superiores não inibe (Gerlach *et al.*, 2000ab). Essas evidências sugerem que o chumbo e o flúor podem atuar através de diferentes mecanismos para agravar a fluorose observada neste estudo.

Além disso, o chumbo é conhecido como uma neurotoxina que afeta negativamente o desenvolvimento neuropsicológico de crianças (Needleman *et al.*, 1979), mesmo em baixas doses (Binns *et al.*, 2007). O chumbo afeta a função intelectual e o desempenho das crianças em salas de aula quando expostas à maiores quantidades de chumbo no primeiro ano de vida, independente da classe social (Needleman, 1979). Quando os dentes decíduos foram utilizados pela primeira vez para avaliar a exposição ao chumbo, tornou-se evidente que a quantidade de chumbo na dentina poderia determinar a exposição da criança a altas ou baixas quantidades de chumbo (Needleman *et al.*, 1972), e esta informação foi essencial para a classificação das crianças de acordo com a exposição ao chumbo, como nos clássicos estudos que revelaram os efeitos adversos do chumbo na inteligência infantil (Needleman *et al.*, 1979, 1990; Lanphear *et al.*, 2000; Canfield *et al.*, 2003; Bellinger, 2004; Chiodo *et al.*, 2004). Embora o aumento das concentrações de chumbo na população americana diminuiu desde a retirada do chumbo na gasolina (Warren, 2000) e a regulamentação sobre o uso de chumbo em produtos domésticos (Goyer e Clarkson, 2001), estima-se que existam milhões de crianças em risco de exposição. Além disso, foi recentemente demonstrado em um estudo com crianças que a concentração de chumbo no sangue em torno de 2,5 ug/dL reduz o QI da criança de forma significativa (Lanphear *et al.*, 2000).

O efeito de diferentes formulações de flúor (como o fluoreto de sódio e o ácido fluorsilícico) deve ser cuidadosamente investigado. Neste estudo foi usado o ácido fluorsilícico (H_2SiF_6) uma vez que, a hipótese resulta do conhecimento de que as comunidades com água fluoretada têm um risco maior para as crianças que mostram concentrações de chumbo no sangue superiores a 10µg/dL ($p<0,001$) (Coplan *et al.*, 2007). O ácido fluorsilícico, o fluorsilicato de sódio e o sílicofluoreto

são usados na fluoretação das águas de abastecimento público em 90% dos municípios nos EUA (Coplan *et al.*, 2007).

De acordo com Casamassino em 2005, a fluorose como um tipo de defeito de esmalte é difícil de explicar em pacientes individualmente, uma vez que pode ocorrer em uma mesma família, a manifestação da fluorose em um dos filhos, mas não nos irmãos; o mistério é que não se compreende perfeitamente como a fluorose ocorre. Este estudo aponta para uma nova descoberta que pode explicar parte deste mistério que envolve a fluorose. O desenvolvimento da fluorose pode ser sensível não só a influência de drogas (Hong *et al.*, 2005) ou genéticas (Everett *et al.*, 2002; Mousny *et al.*, 2008), mas também para outros compostos inorgânicos encontrados no ambiente, particularmente o chumbo. A exacerbação da fluorose dentária pelo chumbo (em dentes com elevadas concentrações de chumbo, mas não de flúor) pode ser um aspecto morfológico útil para detectar populações de risco de exposição ao chumbo.

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento na prevalência de fluorose nos EUA (Pendrys, 2000). Portanto, é necessário observar se este aumento está associado ao aumento da exposição ao chumbo no início da infância. Isto pode ser realizado, uma vez que é possível obter informações sobre a exposição pelas análises de biópsia de esmalte na superfície do dente. Esta informação demonstrada foi útil para discriminar as crianças e as zonas da cidade com maior contaminação por chumbo (de Almeida *et al.*, 2008).

E mais do que um problema cosmético ou uma indicação de muita preocupação à exposição ao excesso de flúor, a fluorose já foi apontada como uma indicação do *misfolding* de proteínas no passado (Coplan *et al.*, 2007). Den Besten e colaboradores em 1986 demonstraram que na fluorose dentária há o aumento da quantidade de proteínas no esmalte por um longo tempo. Trabalhos apontam ainda que o esmalte fluorótico possa ser uma marca histórica desde o início da vida, quando proteínas não foram adequadamente formadas (por motivos ainda não conhecidos). Isto pode não só ter acontecido no esmalte, mas também em outros órgãos (Coplan *et al.*, 2007). Este conceito é relevante, uma vez que já se demonstrou que o chumbo tem a capacidade de inibir as proteinases do esmalte (Gerlach *et al.*, 2002).

Conclui-se que o aumento da prevalência de fluorose e/ou presença de piores defeitos de esmalte podem ser encontrados quando o organismo é co-

exposto ao chumbo e a maiores concentrações de flúor. Tais preocupações necessitam de mais estudos, uma vez que o flúor é amplamente utilizado atualmente e pode apresentar risco para o desenvolvimento das crianças, quando associado com chumbo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Aumento da prevalência de fluorose e/ou presença de piores defeitos de esmalte encontrados quando o organismo é co-exposto ao chumbo e a maiores concentrações de flúor.
- Não houve diferença nas concentrações de flúor nas amostras de tecidos calcificados quando comparados os grupos F e F+Pb.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Albalak R, Noonan G, Buchanan S, Flanders WD, Gotway-Crawford C, Kim D, Jones RL, Sulaiman R, Blumenthal W, Tan RU. Blood lead levels and risk factors for lead poisoning among children in Jakarta, Indonesia. *The Sci of the Total Envir.* 301:75, 2003.

Aoba T, Fejerskov O. Dental Fluorosis: Chemistry and Biology. *Crit Rev Oral Biol Méd.* 13(2):155-170, 2002.

Aoba T. Strategies for improving the assessment of dental fluorosis: focus on chemical and biochemical aspects. *Adv Dent Res.* 8(1):66-74, 1994.

Appleton J. The effect of lead acetate on dentine formation in rat. *Arch Oral Biol.* 36:377-382, 1991.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1999.

Barbosa F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect.* 113:1669-1674, 2005.

Barros FC, Armonia PL, Tortamano N, Barros CCA, Melo OJAJ. Risco de fluorose dentária para crianças de 1 a 6 anos de idade que utilizam água de abastecimento público com 0,7 ppm F. *J Bras Clin Odontol Int.* 6(35):375-379, 2002.

Barry P. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br J Indust Med.* 32:119, 1975.

Bellinger DC. Lead. *Pediatrics* 113(4 Suppl):1016-1022, 2004.

Binns HJ, Campbell C, Brown MJ. Interpreting and managing blood lead levels of less than 10 µg/dL in children and reducing childhood exposure to lead: recommendations of the centers for disease control and prevention advisory committee on childhood lead poisoning prevention. *Pediatrics* 120:1285-1298, 2007.

Bradman A, Eskenazi B, Sutton P, Athanasoulis M, Goldman LR. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect.* 109(10):1079-1084, 2001.

- Brudevold F, Gardner DE, Smith FA. A distribution of fluoride in human enamel. *J Dent Res.* 35:420-429, 1956.
- Burt BA. Fluoride in dentistry. Copenhagen, Munksgaard. 2ªEd. Cap.15:275-290, 1996.
- Calabrese EJ, Stanek EJ, James RC, Roberts SM. Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Environ Health Perspect.* 105:1354, 1997.
- Campos DL, Farias DG, Toledo AO, Bezerra AC. Prevalência de fluorose dentária em escolares de Brasília–Distrito Federal. *Rev Odontol Univ São Paulo* 12(3):225-230, 1998.
- Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 348(16):1517-1526, 2003.
- Cangussu MC, Narvai PC, Castellanos Fernandez R, Djehizian V. Dental fluorosis in Brazil: a critical review. *Cad Saude Publica* 18(1):7-15, 2002.
- Casamassimo OS. Amoxicilin and Fluorosis. *Arch Pediatr Adolesc.* 159:195-196, 2005.
- Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol Teratol.* 26(3):359-371, 2004.
- Cicuttini FM, Fairley CK, McNeil JJ, Taylor ER. The public health problem of environmental lead exposure. *Med J Aust.* 160:173, 1994.
- Coplan MJ, Patch SC, Masters RD, Bachman MS. Confirmation of and explanations for elevated blood lead and other disorders in children exposed to water disinfection and fluoridation chemicals. *Neurotoxicology* 28(5):1032-1042, 2007.
- Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Rosário de Sousa Mda L, Rabelo Buzalaf MA, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 104(3):337-345, 2007.
- de Almeida GRC, de Souza Guerra C, Tanus-Santos JE, Barbosa F Jr, Gerlach RF. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. *Environ Res.* 107(2):264-270, 2008.

de Menezes LMB, Volpato MC, Rosalen PL, Cury JA. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. *Forensic Science Internat.* 137:209-214, 2003.

Dean HT. Classification of mottled enamel diagnosis. *J Am Dent Assoc.* 21:1421-426, 1934.

Den Besten PK, Thariani H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. *J Dent Res.* 71 (5):1238-1243, 1992.

Den Besten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res.* 65 (10):1272-1277, 1986.

Eager JM. Chiaie teeth. *Dent Cosmos.* 44(3):300-301, 1902; *apud* Pereira AC. Odontologia em saúde coletiva. Planejando ações e promovendo saúde. Porto Alegre Artmed, 14:265-274, 2003.

Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, Martinez-Mier EA, Warrick JM, Stookey GK. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res.* 81(11):794-798, 2002.

Everett MM, Miller WA. Enamel matrix proteins in normal and abnormal amelogenesis. *J Dent Res.* 58:995-996 (Special issue B), 1979.

Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res.* 69:620-625, 1990.

Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in dentistry. Copenhagen, Munksgaard. 2ªEd. Cap.9:153-166, 1996.

Fejerskov O, Johnson NW, Silverstone LM. The ultrastructure of fluorosed human dental enamel. *Scan J Dent Res.* 82:357-372, 1974.

Fejerskov O, Manji F, Baelum V, Maeller IJ. Fluorose Dentária: um manual para profissionais da saúde. São Paulo, Ed. Santos 122, 1994.

Fejerskov O, Silverstone LM, Melsen B, Möller IJ. The histological features of fluorosed human dental enamel. *Caries Res.* 9:190-229, 1975.

Fejerskov O, Yaeger JA, Thylstrup A. Microradiography of acute and chronic administration of fluoride on human and rat dentine and enamel. *Arch Oral Biol.* 24:123-130, 1979.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 66:375-400, 1925.

Flegal AR. Clair Patterson's influence on environmental research. *Environ Res.* 78(2):65-70, 1998.

Frank RM, Sargentini-Maier ML, Turlot JC, Leroy MJ. Comparison of lead levels in human permanent teeth from Strasbourg, Mexico City, and rural zones of Alsace. *J Dent Res.* 69:90-93, 1990.

Freitas C. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no estado de São Paulo. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/chumbo.htm>. Acessado em 19/04/2009.

Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line SRP. Effect of lead on dental enamel formation. *Toxicology* 175:27-34, 2002.

Gerlach RF, Line SRP. Células uma abordagem multidisciplinar. Ed. Manole Ltda, 8:95, 2005.

Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of fluoride on matrix proteinases *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 108:49-54, 2000a.

Gerlach RF, Souza AP, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 108:327-334, 2000b.

Gerlach RF, Toledo DB, Novaes PD, Merzel J, Line SRP. The effect of lead on the eruption rates of incisor teeth in rats. *Arch of Oral Biol.* 45:951-955, 2000c.

Gomes VE, Sousa MLR, Barbosa F, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, Gerlach RF. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of pre-school children. *Sci Total Environ.* 320:25-35, 2004.

Goyer RA, Clarkson TW. Toxic effects of metals. In: Cassaret, Doull's. Toxicology: the basic science of poisons. 6rd Ed. McGraw-Hill Professional 23:811-867, 2001.

Guedes-Pinto AC. Odontopediatria. 6ª Ed. São Paulo, Cap.25:381-414,1997.

Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Howarth D, Phillips A, Hall J. Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull Environ Contam Toxicol*. 56(4):543-550, 1996.

Haavikko K, Anttila A, Helle A, Vuori E. Lead concentrations of enamel and dentine of deciduous teeth of children from two Finnish towns. *Arch Environ Health*. 39:78-84, 1984.

Hallen IP, Jorhem L, Lagerkvist BJ, Oskarsson A. Lead and cadmium levels in human milk and blood. *Sci Total Environ*. 166:149, 1995.

Halse A, Selvig KA. Mineral content of developing rat incisor enamel. *Eur J of Oral Sci*. 82(1):40-46, 2007.

Hernandez-Avila M, Gonzalez-Cossio T, Palazuelos E, Romieu I, Aro A, Fishbein E, Peterson KE, Hu H. Dietary and environmental determinants of blood and bone lead levels in lactating postpartum women living in Mexico City. *Environ Health Perspect*. 104:1076, 1996.

Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefei JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 159:943-948, 2005.

Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ Health Perspect*. 106:1-8, 1998.

Ismail AI, Brodeur JM, Kavanaga M, Bolsclair G, Tessler C, Picotte L. Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students, 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec. *Caries Res*. 14:290-297, 1990.

Jin A, Teschke K, Copes R. The relationship of lead in soil to lead in blood and implications for standard setting. *Sci Total Environ*. 208:23, 1997.

Jones S, Burt BA, Petersen PE, Lennon MA. The effective use of fluorides in public health. *Bull World Health Organ*. 83(9):670-676, 2005.

Kierdorf H, Aberg G, Kierdorf U. Lead concentration and lead and strontium stable-isotope ratios in teeth of European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Eur J Wildl Res* 54:313-319, 2008.

Kierdorf U, Kierdorf H, Erdelen M, Machoy Z. Mandibular bone fluoride accumulation in wild red deer (*Cervus elaphus* L.) of known age. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 110(4):299-302, 1995.

Kierdorf U, Kierdorf H, Sedlacek F, Fejerskov O. Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus* L.) from a region with severe environmental pollution by fluorides. *J Anat*. 188:183-195, 1996.

Kierdorf U, Kierdorf H. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environ Monit Assess*: in press, 1999.

Kim R, Hu H, Rotnitzky A, Bellinger D, Needleman H. A longitudinal study of chronic lead exposure and physical growth in Boston children. *Environ Health Perspect*. 103:952, 1995.

Klaassen CD. Metais Pesados e seus antagonistas. In: Goodman LS, Gilman AG, Rall TW. As bases farmacológicas da terapêutica. 8ªEd. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1061-1065, 1991.

Kuscu OO, Çağlar E, Aslan S, Durmusoglu E, Karademir A, Sandalli N. The prevalence of molar incisor hypomineralization (MIH) in a group of children in a highly polluted urban region and a windfarm-green energy island. *Int J of Paediatr Dent*. 19:176-185, 2009.

Kvet R. Mineral Mining on the Bohemian Side of the Krušné Hory Mountains/Erzgebirge up to the Time of Agricola. *GeoJournal* 32.2:101-102, 1994.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep*. 115(6):521-529, 2000.

Lawson BF, Stout FW, Ahern DE, Sneed WD. The incidence of enamel hypoplasia associated with chronic pediatric lead poisoning. *South Carolina Dent J*. 29:5-10, 1971.

Lazzari EP. Dental Biochemistry. 2ndEd. London: Lea & Keliger 7-8, 1976.

- Leasure JL, Giddabasappa A, Chaney S, Johnson JE Jr, Pothakos K, Lau YS, Fox DA. Low-level human equivalent gestational lead exposure produces sex-specific motor and coordination abnormalities and late-onset obesity in year-old mice. *Environ Health Perspect.* 116(3):355-61, 2008.
- Lima YBO, Cury JA. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. *Rev Saúde Pública* 35(6):576-581, 2001.
- Limeback H. Enamel formation and the effects of fluoride. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 22(3):144-147, 1994.
- Lyaruu DM, Bronckers AL, Santos F, Mathias R, Den Besten P. The effect of fluoride on enamel and dentin formation in the uremic rat incisor. *Pediatr Nephrol.* 23(11):1973-1979, 2008.
- Maas RP, Patch SC, Christian A-M, Coplan MJ. Effects of fluoridation and water disinfection agent combinations on lead leaching from leaded-brass parts. *Neurotoxicology* 28:1023-1031, 2007.
- Macek MD, Matte TD, Sinks T, Malvitz DM. Blood Lead Concentrations in children and Method of water fluoridation in the United States, 1988-1994. *Environ Health Perspect.* 114(1):130-134, 2006.
- Manuais de Legislação Atlas: Segurança e Medicina do Trabalho. São Paulo Ed. São Paulo Atlas, 1997.
- Masters RD, Coplan MJ, Hone BT, Dykes JE. Association of silicofluoride treated water with elevated blood lead. *Neurotoxicology* 21(6):1091-1100, 2000.
- Mjör IA, Fejerskov O. O esmalte dentário. In: Embriologia e Histologia Oral Humana Cap.3, Médica Panamericana 50-89, 1990.
- Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, Banse X, Devogelaer JP, Grynblas MD. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone* 43(6):1067-1074, 2008.
- Mullenix PJ, Den Besten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 17(2):169-77, 1995.
- Nanci A. Ten Cate. Histologia Oral. Cap.7, Elsevier 141-90, 2008.

Needleman H. "Deficits in Psychologic and classroom Performance of Children with Elevated Dentine Lead Levels". *New Engl J of Med.* 300(13):689-395, 1979.

Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. *Annu Rev Public Health.* 12:111, 1991.

Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barrett P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med.* 300(13):689-395, 1979.

Needleman HL, Schell A, Bellinger D, Leviton A, Allred EN. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N Engl J Med.* 322(2):83-88, 1990.

Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature* 235(5333):111-112, 1972.

Nevin R. Understanding international crime trends: The legacy of preschool lead exposure. *Environ Res.* 104:315-336, 2007.

Newbrun E. The fluoridation war: a scientific dispute or a religious argument? *J Public Health Dent.* 56:246-252, 1996.

Nicander A. The poems and poetical fragments. *Alexipharmaca* 75-114, 1966.

Nriagu JO. Lead Poisoning in Antiquity. Environmental Science and Technology Series, New York, John Wiley & Sons, 1983.

Nriagu JO. Lead Poisoning in Antiquity. *Sun Circles and Human Hands* 94-102, 1968.

Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res.* 67:1488-1492, 1988.

Paterson LJ, Raab GM, Hunter R, Laxen DP, Fulton M, Fell GS, Halls DJ, Sutcliffe P. Factors influencing lead concentrations in shed deciduous teeth. *Sci Total Environ.* 74:219-33, 1988.

Patterson CC. Contaminated and natural lead environments of man. *Arch Environ Health.* 11:344-359, 1965.

Pendrys DG. Risk of enamel fluorosis in nonfluoridated and optimally fluoridated populations: considerations for the dental professional. *J Am Dent Assoc.* 131(6):746-755, 2000.

Pires MBO. Fluorose dentária endêmica: Revisão da literatura Unimontes Científica 2:2, 2001.

Rabinowitz MB, Leviton A, Bellinger D. Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: models of tooth lead kinetics. *Calcif Tissue Int.* 53:338, 1993.

Rabinowitz MB. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 58:260-270, 1976.

Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect.* 91:33-37, 1991.

Richards A, Kragstrup J, Josephsen K, Fejerskov O. Dental fluorosis developed in post-secretory enamel. *J Dent Res.* 65(12):1406-1409, 1986.

Richards A. Nature and mechanisms of dental fluorosis in animals. *J Dent Res.* 70:1-5, 1990.

Riordan PJ, Tveit AB. Dental Fluorosis: a clinical, histological and microanalytical case study. *ASDC J Dent Child.* 49(5):337-342, 1982.

Saiani RA, Porto IM, Marcantonio-Junior E, Cury JA, Sousa FB, Gerlach RF. Morphological characterization of rat incisor fluorotic lesions. *Arch Oral Biol.* 2009 (accepted).

Sawan RMM, Leite GAS, Barbosa F, Saraiva MCP, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Fluoride-induced increases in the circulating and calcified tissues lead concentrations in lead-exposed rats, submetido.

Schwartz J, Angle C, Pitcher H. Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics* 77:281, 1986.

Seow WK. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. *J Dent Child.* 58:441-452, 1991.

Shulman JD, Wells LM. Acute fluoride toxicity from ingesting home-use dental products in children, birth to 6 years of age. *J Public Health Dent.* 57(3):150-158, 1997.

Silbergeld EK. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ Health Perspect.* 91:63-70, 1991.

Silbergeld EK. Maternally mediated exposure of the fetus: in utero exposure to lead and other toxins. *Neurotoxicology* 7:557, 1986.

Silva MJ, Ulrich SR. In vitro sodium fluoride exposure decreases torsional and bending strength and increases ductility of mouse femora. *J Biomech.* 33(2):231-234, 2000.

Simmons T. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J Physiol.* 378, 1986.

Smith CE, Nanci A, Den Besten, PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *Anat Rec.* 237:243-258, 1993.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:128-161, 1998.

Smith RD, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. *Envir Healt Persp.* 104(1):60-66, 1996.

Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *J Microsc.* 221(2):79-83, 2006.

Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet.* 42(10):863-881, 2003.

Suga S. Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Adv Dent Res.* 3(2):188-198, 1989.

Tenuta LMA, Cury JA. Odontopediatria: Bases Científicas Para Prática Clínica 4:115-152, 2005.

Theuns HM, Shellis RP, Groeneveld A, Van Dijk JW, Poole DF. Relationships between birefringence and mineral content in artificial caries lesions of enamel *Caries Res.* 27(1):9-14, 1993.

Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance and surface distribution of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological changes. *Comm Dent Oral Epidemiol.* 6:315-328, 1978.

Tjäderhane L, Hietala EL, Larman M. Mineral element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalyzer combined with back-scattered electron image. *J Dent Res.* 74(11):1770-1774, 1995.

Warren CB. With Death: a social history of lead poisoning. 1st Ed. The Johns Hopkins Paperbacks, 2000.

Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm AM. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol.* 12(1):85-97, 1967.

Whitford GM. Fluoride toxicology and health effects. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in Dentistry. Ed.2, Copenhagen, Munksgaard 167-184, 1996.

Wigg NR. Low-level lead exposure and children. *J Pediatr Child Health* 37:423, 2001.

World Health Organization: Regional Office for Europe: air quality guidelines. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1986.

Wright JT, Chen SC, Hall KI, Yamauchi M, Bawden JW. Protein characterization of fluorosed human enamel. *J Dent Res.* 75(12):1936-1941, 1996.

Wright RO, Hu H, Maher TJ, Amarasiwardena C, Chaiyakul P, Woolf AD, Shannon MW. Effect of iron deficiency anemia on lead distribution after intravenous dosing in rats. *Toxicol Ind Health* 14(4):547-551, 1998.

Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am J Public Health* 89(7):1049-1053, 1999.

Wright RO, Tsaih SW, Schwartz J, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr.* 142(1):9-14, 2003.

Xenophon O. Early american: Lead compounds. Dover Publication 108-134, 1968.

Youravong N, Chongsuvivatwong V, Teanpaisan R, Geater AF, Dietz W, Dahlén G, Norén JG. Morphology of enamel in primary teeth from children in Thailand exposed to environmental lead. *Sci Total Environ.* 348(1-3):73-81, 2005.

Ziegler EE, Edwards BB, Jensen RL, Mahaffey KR, Fomon SJ. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res.* 12:29, 1978.

8. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.346.53.3), intitulado: "Efeitos da Exposição Concomitante a Fluoreto de Silício e Chumbo nas Concentrações de Flúor e Chumbo no Osso, Dentina, Esmalte, Sangue Total e Plasma e na Formação do Esmalte Fluorótico de Ratos Expostos Durante o Período Pré e Pós-Natal", de autoria de **Gisele de Angelo Souza Leite**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.08.07.

Ribeirão Preto, 13 de agosto de 2007

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução ou divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte e comunicado ao autor a referência da citação.

Ribeirão Preto, ____/____/____

Giselle de Angelo Souza Leite
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo