PAULA MOCHIDOME YAMAGUTI

ESTUDO DA ADMINISTRAÇÃO DE FLÚOR E O ESTRESSE OXIDATIVO EM GLÂNDULAS SALIVARES DE RATOS

São Paulo

2009

Paula Mochidome Yamaguti

Estudo da administração de flúor e o estresse oxidativo em glândulas salivares de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. José Nicolau

São Paulo

2009

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Yamaguti, Paula Mochidome
Estudo da administração de flúor e o estresse oxidativo em glândulas salivares de ratos / Paula Mochidome Yamaguti; orientador José Nicolau. -- São Paulo, 2009.
98p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Fluoreto de sódio – Glândulas submandibular – Influência 2. Fluoreto de sódio – Parótida – Influência 3. Estresse oxidativo – Fluoreto de sódio 4. Materiais dentários

CDD 617.695
BLACK D6312

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yamaguti PM. Estudo da administração de flúor e o estresse oxidativo em glândulas salivares de ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, 17/06/2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, **Rosarita e Hugo**. Vocês são o exemplo de amor, dedicação, integridade e zelo incondicionais à família e àqueles que entraram em suas vidas. Impossível retribuir em uma existência todo amor e carinho recebidos!

Aos meus irmãos, **Renata e Hugo**, por sempre me apoiarem e compreenderem minha ausência em vários momentos.

À **Julinha**, por sempre fazer de cada dia uma aventura diferente.

Ao **Kobinho,** pela pureza, pelo amor incondicional e por tornar minha vida muito mais feliz!

To **Craig**, for all the patience, untiring support, and love in each and every moment and for making me appreciate all little things in life. Thank you for making me so happy! I am pretty sure this work will get us one big step closer (according to 7th Fret Over Andres, “you and I, we can make it”). I love you!

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Nicolau,** pioneiro nos estudos de Bioquímica Oral no Brasil, meus sinceros agradecimentos pelo incentivo, confiança, ensinamentos, compreensão e atenção. O senhor é o exemplo de integridade, dedicação, honestidade, bom senso, ética e humildade. Um exemplo de mestre, incansável, sempre pronto e disposto a ensinar e ajudar, a quem devo todo meu amadurecimento científico. Obrigada pela valiosa orientação! Fica aqui registrada minha grande admiração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar o meu caminho.

À toda minha família, por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus cunhados, Daniel e Mari, pela compreensão e apoio sempre demonstrados.

À minha tia, Profa. Dra. Fátima Ioko Mochidome, professora do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, grande exemplo de amor e dedicação à vida e a profissão. Agradeço seu amor, carinho e apoio incondicional e por ter me iniciado neste mundo maravilhoso da pesquisa.

To the Stewart and Sarvis families, for all the love and support.

Ao reitor da Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Alfredo Júlio Fernandes Neto, por ter me apoiado e acreditado em mim quando ainda iniciava minha vida acadêmica. Obrigada pela confiança depositada em mim!

À minha família bioquímica, Alyne, Ana Paula, Douglas, Emily, Fausto, Fernando, Flávia, Helena, Jonas, Luana, Mariana, Marcela e Walter, obrigada pela amizade, pela agradável convivência e por me proporcionarem grande aprendizado e

amadurecimento profissional. E também aos recém-chegados, Ethan e Henrique. Sentirei muita falta de vocês!

Ao Douglas Nesadal de Souza, pelos apoio e amizade, que iam muito além das suas obrigações, além de todo auxílio laboratorial.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, pela ajuda e incentivo constantes e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes, pela análise estatística dos dados deste trabalho.

Ao Departamento de Materiais Dentários, representado pelo Prof. Dr Leonardo Eloy Rodrigues Filho, pela confiança e oportunidade concedidas.

À Profa. Dra. Rosa Helena Grande, pelo o apoio e orientação fundamentais em todos os momentos, pelo trabalho desenvolvido na Pós-Graduação e constante atenção com os alunos. Obrigada, tia!

À Rosa Cristina Nogueira, querida Rosinha, pelo ajuda, apoio, paciência e alegria constantes, além de sempre nos acudir em todos os momentos necessários.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários, Antônio, Eli, Mirtes e Sílvio, pela colaboração e agradável convivência.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação do Departamento de Materiais Dentários, Carol, Tathy, Ísis, André e Maurício, pelos momentos de descontração.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo e ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes pelas valiosas sugestões para este estudo no Exame de Qualificação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, Cátia, Alessandra e Nair, sempre muito prestativas e atenciosas.

A todos os funcionários do SDO pela estruturação, formatação, correção das referências e elaboração da Ficha Catalográfica, além de todo auxílio e disposição ao longo da elaboração desta tese.

Aos queridos amigos, Fabiana Martins e Martins e Márcio Oliveira, pela nossa "amizade à primeira vista", sempre vibrando e torcendo pelo meu sucesso. Vocês são muito especiais para mim. Obrigada pelas palavras, apoio e carinho nas horas difíceis e também pela alegria compartilhada sempre!

Às queridas amigas, Pri, Vivian e Lee pelos conselhos, apoio e amizade de todas as horas e que se fortalece a cada dia. Meu eterno agradecimento e carinho!

Aos meus amigos XNE, Ed, Yo, Márcia, Mauro, Serginho, Margô, Cynthia, Cris, Aninha, Ric, P2, Shoiti, Crix, Ronão, Biti, Paty, Gerim e Renata, pela amizade e compreensão pelos meus furos de último hora.

Aos animais, que tiveram suas vidas sacrificadas em nome da ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, imprescíndivel à realização deste estudo.

A todos que, de alguma maneira, contribuiram para desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por tudo!

Every day I remind myself that my inner and outer life are based on the labours of other men, living and dead, and that I must exert myself in order to give in the same measure as I have received and am still receiving.

Albert Einstein

Yamaguti PM. Estudo da administração de flúor e o estresse oxidativo em glândulas salivares de ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O fluoreto (F) é um axioma toxicológico. Embora seja indiscutível a importância da sua utilização na prevenção de cárie, muito se discute a respeito da racionalização do seu uso em termos da sua toxicidade e benefícios. Muitos trabalhos sugerem que o F em diferentes concentrações induz o estresse oxidativo em diversos tecidos de diferentes animais experimentais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da administração do fluoreto de sódio (NaF) em dois protocolos experimentais, um agudo e outro a longo termo, em alguns parâmetros indicativos do estresse oxidativo nas glândulas submandibular (SM) e parótida (PA) de ratos. No experimento agudo, os animais do grupo experimental foram tratados com uma dose única intraperitoneal de NaF (15 mg F^-/kg p.c.), enquanto que os animais do grupo controle receberam dose equivalente de NaCl a 0,9%. Os animais foram sacrificados 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a injeção. Já no experimento a longo termo, os ratos do grupo experimental foram tratados com 100 ppm de F^- adicionados na água de beber por 30, 60 e 90 dias; enquanto que o grupo controle recebeu água proveniente do sistema de abastecimento público. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e as glândulas salivares SM e PA foram removidas, além do sangue, que também foi coletado. Foi estudada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além da determinação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA), proteínas totais e glicose sangüínea. Os

resultados mostraram um aumento da glicemia dos animais que receberam o NaF, tanto no experimento agudo como no experimento a longo termo. Além disso, o F interferiu no sistema de defesa antioxidante das glândulas salivares de ratos. Tanto a SOD como a CAT, apresentaram alterações nas suas atividades em ambas glândulas, SM e PA, no experimento agudo e a longo prazo. Os níveis de peroxidação lipídica aumentaram nos animais do grupo experimental e este aumento foi observado tanto nas amostras de sangue como nas glândulas SM e PA de ambos os protocolos experimentais. Não foram observadas alterações na concentração de proteínas de ambas as glândulas, SM e PA, no experimento agudo. Já no experimento a longo prazo, o F provocou aumento da concentração de proteínas na glândula SM após 90 dias e diminuição deste conteúdo na glândula PA após 30 e 60 dias. Os resultados obtidos sugerem que F provocou alterações no sistema de defesa antioxidante e aumentou os níveis de peroxidação lipídica no sangue e nas glândulas salivares SM e PA de ratos.

Palavras-Chave: Bioquímica oral – Glândulas salivares – Fluoreto – Estresse oxidativo – Peroxidação lipídica

Yamaguti PM. Study of fluoride-induced oxidative stress in salivary glands of rats [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Fluoride (F) is a toxicological axiom. Many reports have proposed that in varying concentrations, F induces increased reactive oxygen species generation, enhanced lipid peroxidation and impairs the antioxidant enzyme defence system in blood and tissues of experimental animals causing several biochemical alterations. Although the most pronounced effects of F intake are manifested in bones and teeth, soft tissues are also affected. Due to the paucity of reports investigating the short- and long-term effects of varied doses of F on soft tissues, especially salivary glands, this study aimed to evaluate the acute and long-term effects of sodium fluoride (NaF) exposure on antioxidant enzyme defence system and lipid peroxidation in the submandibular (SM) and parotid (PA) salivary glands of rats. For the acute investigation, the experimental groups of rats were injected intraperitoneally with NaF solution (15 mg F^-/kg b.w.), while control groups were administered the same volume of sodium chloride solution (0,9%). The animals were euthanized in groups 1, 3, 6, 12 and 24 hours after injection. To evaluate long-term exposure effects, experimental groups of rats were administered 100 pmm F^- in their drinking water for 30, 60 and 90 days. The control groups were provided with untreated tap water over the same periods. In all groups, after euthanization the SM and PA glands of each rat were extracted and analyzed for superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, malondialdehyde (MDA), protein and blood glycemia content. For both acute and long-term experiments, the experimental groups demonstrated higher

levels of glycemia, altered levels of SOD and CAT in both glands, and increased levels of MDA in blood and salivary tissues of both glands. There were no differences in protein content for the acute experiment, but in the long-term experiment, increased protein levels were observed after 90 days in the SM gland and decreased protein levels were observed in the PA gland after 30 and 60 days. These results suggest that F impaired the antioxidant defence system and enhanced the levels of MDA in blood and SM and PA salivary glands of rats.

Keywords*:* Oral biochemistry – Salivary glands – Fluoride – Oxidative stress – Lipid peroxidation

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DA LITERATURA 19

2.1 O íon flúor 19

2.1.1 Absorção, distribuição e excreção do fluoreto no organismo 20

2.1.2 Toxicidade aguda 23

2.1.3 Toxicidade crônica 25

2.2 Radicais livres 27

2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) 28

2.2.2 Peroxidação lipídica 30

2.2.2.1 Malondialdeído 33

2.2.3 Sistema antioxidante 35

2.2.3.1 Superóxido dismutase 36

2.2.3.2 Catalase 38

2.3 Glândulas salivares 41

3 PROPOSIÇÃO 43

4 MATERIAL E MÉTODOS 44

4.1 Aspectos éticos da pesquisa 44

4.2 Delineamento experimental 44

4.2.1 Animais 44

4.2.2 Tratamento com fluoreto de sódio 46

4.2.2.1 *Experimento agudo* 46

4.2.2.2 Experimento a longo termo 46

4.2.3 Obtenção e preparo das amostras 47

4.3 Análises 48

4.3.1 Determinação da glicose sanguínea 48

4.3.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase 49

4.3.3 Determinação da atividade da catalase 50

4.3.4 Determinação da peroxidação lipídica 51

4.3.5 Determinação da concentração total de proteínas 52

4.4 Análise estatística 52

5 RESULTADOS 54

6 DISCUSSÃO 75

7 CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS 87

ANEXOS 98

1 INTRODUÇÃO

O efeito benéfico do fluoreto (F) no controle da cárie dentária foi descoberto casualmente nas primeiras décadas do século XX (FAGIN, 2008) e, desde então, este íon vem sendo um grande aliado na prevenção desta doença na Odontologia. Sua introdução na Odontologia ocorreu de forma curiosa, pois através de seus efeitos deletérios na aparência do esmalte dental, a fluorose dental, é que houve o interesse inicial e, posteriormente, a descoberta de seus benefícios anticárie (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; MURRAY; RUGG-GUNN; JENKINS, 1991; WHITFORD, 1989).

Muitas razões contribuem para o sucesso do seu uso, como baixo custo, eficácia e ampla variedade de métodos pelos quais ele pode ser utilizado (BUZALAF; CURY; WHITFORD, 2001; SMITH, 1985). De acordo com as recomendações do relatório do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) (2001), a fluoretação das águas é destacada como a maneira mais segura, efetiva e econômica de prevenção da cárie dentária, abrangendo pessoas de todas as idades e níveis sociais e, por isso, é considerada como uma das dez medidas de maior impacto em saúde pública.

Contudo, como qualquer substância farmacologicamente ativa, seu uso deve ser racionalizado, visando maximizar seus efeitos benéficos e minimizar seus efeitos adversos (SMITH, 1985). A exposição à elevadas quantidades de F pode provocar reações adversas, de intensidade e forma de manifestação dose-dependentes (BUZALAF, 2008; FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; WHITFORD, 1989).

Entre elas, podemos citar desde a fluorose dentária, até a fluorose esquelética e mesmo a morte, em situações extremas (DUXBURY; LEACH; DUXBURY, 1982; WHITFORD, 1989).

Embora os efeitos mais pronunciados consequentes da ingestão do F sejam manifestados principalmente nos dentes e ossos, o F também atravessa as membranas celulares atingindo os tecidos moles (ARMSTRONG; SINGER, 1980; MOUNSOUR; KRUGER, 1985; REDDY et al., 2003)

As glândulas salivares são importantes órgãos secretórios responsáveis pela manutenção da homeostase na cavidade oral. O F provoca alterações em processos fisiológicos e bioquímicos do organismo, entre os quais, o metabolismo de glicose (DA MOTTA; DE SOUZA; NICOLAU, 1999) e glicogênio (NICOLAU; RIBEIRO, 1992), processos secretórios (WHITFORD; ALLMANN; SHAHED, 1987), além de danos no sistema antioxidante (CHLUBEK, 2003a, 2003b; RZEUSKI; CHLUBEK; MACHOY, 1998).

A respiração celular e o conseqüente consumo de oxigênio oferecem vantagem metabólica sobre a vida anaeróbica, pois a oxidação completa de combustíveis moleculares, como glicose e ácidos graxos pode produzir quantidades consideráveis de energia livre que é convertida em ATP. Todavia, o metabolismo do oxigênio também gera uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos conhecidos como radicais livres. O estresse oxidativo é um dano biomolecular resultante do ataque de espécies reativas (ER) nos constituintes do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entre as ER, as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm papel fundamental no dano, pois são altamente reativas (WINYARD; MOODY; JACOB, 2005). A partir do primeiro radical do oxigênio – resultado da redução de um elétron do oxigênio molecular – o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$),

podem se formar várias espécies secundárias que disparam reações em cadeia que, por sua vez, amplificam o processo e ocasionam a oxidação das biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e açúcares, conduzindo a alterações nas suas funções biológicas que podem provocar danos celulares. Além disso, as EROs vêm sendo consideradas importantes mediadores patológicos em diversas doenças (BLASZCZYK et al., 2008; GUO; SUN; SUN, 2003; ZHAN et al., 2005). Quando reagem com grupos metileno de ácidos graxos poliinsaturados, iniciam a peroxidação da membrana lipídica e produzem o malondialdeído (MDA) como um dos produtos finais. A peroxidação lipídica provoca danos celulares que culminam com a morte celular por apoptose ou necrose. A determinação dos níveis de MDA é um bom indicativo para mensuração dos níveis de peroxidação lipídica (CHLUBEK, 2003a; GROTTO et al., 2009).

Os organismos vivos possuem um amplo sistema de defesa antioxidante para proteger-se contra a ação prejudicial das EROs, que incluem componentes enzimaticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), tioredoxina redutase e não-enzimáticos, como as vitaminas (A, E e C), carotenóides, proteínas, lipídeos, glutationa (GSH), tioredoxina, albumina, melatonina, entre outros (ABDALLA, 1993; AUGUSTO, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O F por ser um inibidor/ativador de inúmeras enzimas (HODGE; SMITH, 1965), vem sendo intensamente estudado na sua influência na geração de EROs, na peroxidação lipídica e alterações no sistema antioxidante, porém os dados disponíveis na literatura com relação as glândulas salivares ainda são escassos, razão esta que nos leva a busca por respostas neste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O íon flúor

O íon flúor ou fluoreto (F) é um componente natural da biosfera, sendo o 13º elemento mais abundante encontrado na crosta terrestre (CHLUBEK, 2003b). O F é liberado ao meio ambiente principalmente através da atividade vulcânica e, conseqüentemente, é transportado para os demais compartimentos, ar e água, retornando à superfície terrestre através da sua deposição na forma de poeira, chuva ou neve. Além disso, fontes antropogênicas, como as indústrias de fabricação de vidros, cerâmicas, tijolos, pesticidas, fertilizantes, entre outras, contribuem para a emissão de F (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A dispersão do F no meio ambiente está representada na Figura 2.1.

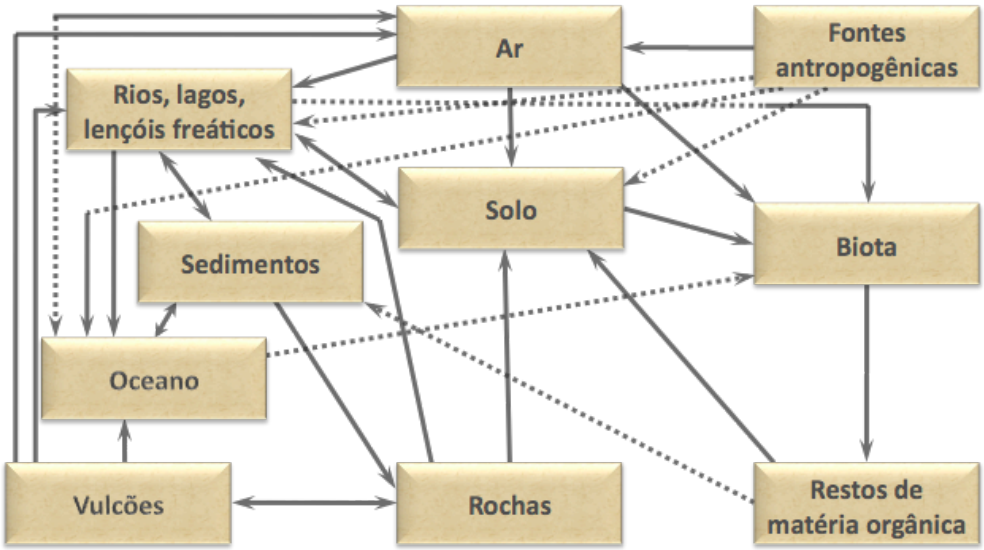

Figura 2.1 - Representação esquemática da distribuição do fluoreto (adaptado do relatório da OMS, 2002)

2.1.1 Absorção, distribuição e excreção do fluoreto no organismo

Uma vez ingerido, o F é rapidamente absorvido pelo trato gastro-intestinal, fato este que o distingue dos demais halógenos e outras substâncias (WHITFORD, 1989).

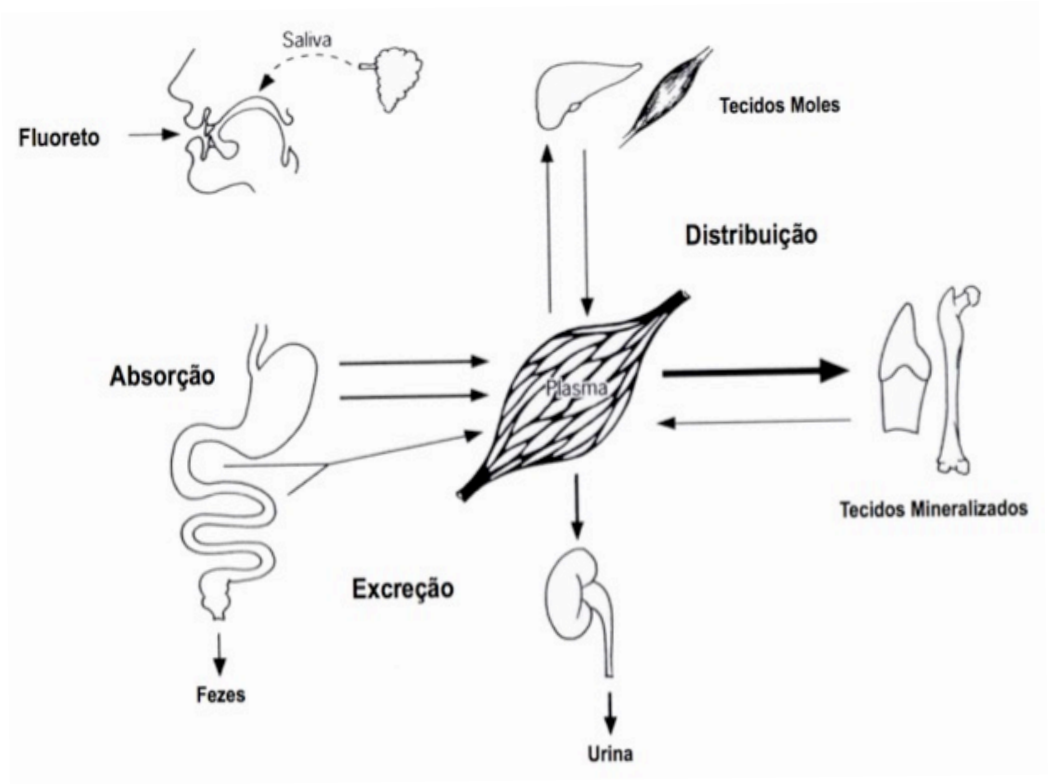

Figura 2.2 - Representação esquemática do metabolismo do fluoreto no organismo (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996)

Sua absorção ocorre por difusão passiva, não sendo influenciada por alterações de temperatura ou pela ação de inibidores metabólicos (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996). O mecanismo e a taxa de absorção do F é determinada pela acidez gástrica, pelo conteúdo gástrico e pela rapidez do esvaziamento gástrico para o intestino delgado. Outros fatores determinantes na absorção do F são a

ingestão do íon com outros alimentos, a acidez do produto fluoretado e a sua forma de administração (HODGE; SMITH, 1965; WHITFORD, 1989).

A absorção no estômago está diretamente relacionada o seu pH, ou seja, quanto maior a acidez, mais rápida será sua absorção e maior será o pico plasmático. No intestino, por sua vez, a absorção do F é independente do pH e ocorre essencialmente na forma de íons que atravessam o epitélio intestinal via canais paracelulares das junções intercelulares. De fato, aproximadamente 25% da absorção do F é realizada no estômago, enquanto que 75% acontece no intestino (BUZALAF, 2008; FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; WHITFORD, 1989).

O F se distribui rapidamente pelo organismo. Do ponto de vista farmacocinético, o plasma sangüíneo é considerado o compartimento central a partir do qual o F será distribuído pelo organismo e posteriormente eliminado (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996) (Figura 2.2). O pico plasmático geralmente ocorre durante a primeira hora após sua ingestão. O período em que o pico é atingido independe da quantidade de F ingerida (BUZALAF, 2008). Já a concentração de F neste pico depende da quantidade ingerida, da proporção de absorção, do volume de distribuição e das proporções de “clearance” do F presente no plasma pelos rins e pelo esqueleto. O aumento nos níveis plasmáticos de F é contra-balanceado pela sua distribuição nos fluidos intersticial e intracelular, incorporação nos tecidos mineralizados e excreção renal (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; WHITFORD, 1989, 1990) (Figura 2.3).

Aproximadamente 99% do F retido no organismo está associado aos tecidos mineralizados, principalmente ossos, mas também ao esmalte e à dentina. No entanto, o F não se liga irreversivelmente ao tecido ósseo, sendo liberado durante o processo de remodelação óssea. Este “pool” de F permite a migração do íon, que

pode ser rapidamente trocado, isoionicamente ou heteroionicamente (com outros ânions do fluido extracelular), dependendo das concentrações relativas no fluído extracelular (WHITFORD, 1989).

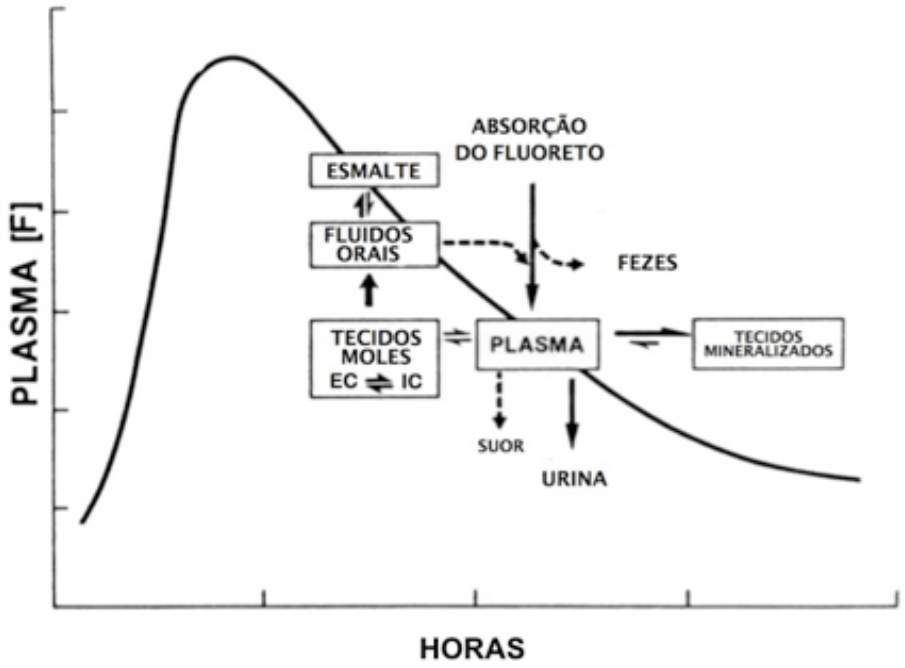

Figura 2.3 - Curva de concentração plasmática do fluoreto após ingestão do íon. O pico ocorre normalmente após 1 hora e depende de diversos fatores como a absorção no trato gastro-intestinal, distribuição para o plasma, excreção através da urina e captação pelos tecidos mineralizados (WHITFORD, 1990)

Nos tecidos moles, o F rapidamente estabelece um estado estacionário de distribuição entre os fluidos extracelular e intracelular, isto é, mesmo se os níveis de F não forem idênticos nos dois compartimentos, ocorre um aumento ou uma diminuição simultânea e proporcional dos níveis de F entre eles (WHITFORD, 1989). As alterações provocadas pelo F nos tecidos moles incluem seus efeitos no fígado (SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; SHAYIQ; RAZA; KIDWAI, 1986; SINGH; KANWAR, 1981; SONI; KACHOLE; PAWAR, 1984), cérebro (MULLENIX et al., 1995; SHAYIQ; RAZA; KIDWAI, 1986), rins (SHANTHAKUMARI;

SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; SINGH; KANWAR, 1981; SONI; KACHOLE; PAWAR, 1984), intestino (SHAYIQ; RAZA; KIDWAI, 1986; SONI; KACHOLE; PAWAR, 1984), pulmões (SONI; KACHOLE; PAWAR, 1984), glândulas salivares (ALLMANN; KLEINER, 1980; ALLMANN; SHAHED, 1987; DA MOTTA; DE SOUZA; NICOLAU, 1999; NICOLAU; RIBEIRO, 1992; SHAHED; ALLMANN, 1988), entre outros órgãos.

O F que foi absorvido será excretado principalmente pela urina nas 24 horas seguintes à sua ingestão, enquanto que, menos de 20% o será pelas fezes. O rim representa a maior rota de remoção do F do corpo e o mecanismo de excreção renal é caracterizado pela filtração no glomérulo, seguida por vários níveis de reabsorção tubular (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996; WHITFORD, 1989).

2.1.2 Toxicidade aguda

Assim como acontece virtualmente para todas as substâncias às quais o homem está exposto, a exposição a altas quantidades de F pode causar efeitos adversos (BUZALAF, 2008; WHITFORD, 1989).

Em geral, os casos de intoxicação aguda estão relacionados à ingestão acidental do F (DUXBURY; LEACH; DUXBURY, 1982; HODGE; SMITH, 1965; SPOERKE; BENNETT; GULLEKSON, 1980; YOLKEN; KONECNY; McCARTHY, 1976). Um dos acidentes mais conhecidos ocorreu no Hospital Estadual de Oregon, onde, aproximadamente, 40 litros de ovos mexidos foram preparados erroneamente com 7,7 kg de fluoreto de sódio (NaF), ao invés de leite em pó. Os bem conhecidos

sinais e sintomas ocorreram rapidamente: desde salivação, náuseas, hematêmese (presença de sangue no vômito), dores abdominais, diarréia, palidez, fraqueza, respiração ofegante, pele fria e úmida, cianose, papilas dilatadas, alterações musculares (espasmos e paralisia muscular) até a morte, que ocorreu num período de 2 até 20 horas após a ingestão do F; dos 263 casos de envenenamento agudo, 47 foram fatais (LIDBECK; HILL; BEEMAN, 1943). Watson et al. (2004) compilaram relatos de intoxicação por F registrados em centros de controle de envenenamento nos Estados Unidos entre os anos de 2000 e 2003. Em cada um dos anos, foram apresentados mais de 30.000 relatos; destes, 80% estava relacionado ao uso de dentifrícios e soluções para bochecho fluoretadas e, aproximadamente 90%, envolvia crianças pequenas, indicando que os produtos odontológicos mais comumente utilizados se constituem em uma fonte potencial de toxicidade.

Apesar da maior parte do F ingerido ser incorporado pelos tecidos mineralizados, baixas concentrações desse elemento traço são capazes de alterar o metabolismo e a atividade de várias enzimas nos tecidos moles (PILLAI; MATHAI; DESHMUKH, 1988). Whitford (1989) relata que o F interfere nas principais vias metabólicas do sistema biológico, funcionando como um potente inibidor de muitas enzimas. O autor afirma também que somente uma pequena quantidade do íon pode ser tolerada por qualquer célula viva, podendo causar várias alterações bioquímicas e por isto foi utilizado como uma ferramenta importante para estudar a via glicolítica.

A literatura apresenta muitos estudos a respeito do F, porém o mecanismo pleo qual ele exerce seus efeitos ainda é desconhecido, o que torna ainda mais difícil de se estabelecer qual seria a faixa de ingestão segura desta substância. A dose certamente letal (DL_{100}) seria de 5 – 10 g de NaF para um indivíduo de 70 kg;

pelo fato do NaF apresentar 45,2% de F, a dose seria de 32 a 64 mg F^-/kg (HODGE; SMITH, 1965). Já a dose aguda de F que pode causar toxicidade sistêmica grave é de 5 mg F^-/kg de peso corpóreo (p.c.); esta é conhecida como “dose tóxica provável” ou DTP (WHITFORD, 1989). Porém, os efeitos sistêmicos da exposição aguda à altas doses de F estão diretamente relacionados à suas concentracões no plasma e órgãos-alvo, além disso, fatores como idade, condição ácido-básica e tipo de composto químico também influenciam na sua toxicidade e, em função das diversas variáveis que podem influenciar a intoxicação aguda por F, não existe um consenso a respeito da dose fatal. No caso de animais de laboratório, os dados ainda são controversos. De Lopez, Smith e Hodge (1976) determinaram que a Dose Letal Média (DL_{50}) para ratas pesando 80, 150 ou 250 g, quando tratadas com NaF através de intubação estomacal foi de 54, 52 e 31 mg F^-/kg p.c., respectivamente, e concluiram que as ratas com maior peso eram mais susceptíveis à intoxicação aguda por F, além de apresentarem um maior grau de saturação do íon em seus esqueletos. Já Singer, Armstrong e Ophaug (1978) administraram três diferentes concentrações de NaF, 15, 20 e 25 mg F^-/kg p.c., em ratos de forma intraperitonial e observaram que a dose de 25 mg F^-/kg p.c., provocou a morte em todos os animais após 1 hora da injeção; já os animais que receberam as doses de 15 ou 20 mg F^-/kg p.c. sobreviveram apesar de apresentaram altas concentrações de F no plasma após 10 minutos.

2.1.3 Toxicidade crônica

O uso do F em várias áreas da Medicina, principalmente na Odontologia, assim como sua utilização na agricultura e indústria, tornou-se muito popular na segunda metade do século XX. Depois que foi observado que, comunidades com água naturalmente fluoretada têm menor incidência de cárie, muitos países iniciaram programas de fluoretação artificial da água, na qual aproximadamente 1 ppm de F^- é adicionado na água de beber (DEAN, 1938).

Desde então, vários estudos sobre o efeito do F na saúde bucal têm sido realizados. Se por um lado o uso do F tem promovido melhorias na saúde bucal e na qualidade de vida através da redução dos índices de cárie, por outro lado, a maior exposição ao F na era moderna tem contribuído para o aumento na prevalência de fluorose dentária (BURT, 1995). Os efeitos colaterais da ingestão crônica excessiva de F ocorrem pela administração de doses pequenas e constantes, atingindo principalmente os tecidos mineralizados, podendo provocar fluorose dentária e esquelética (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996).

Embora os efeitos mais evidentes conseqüentes à ingestão crônica do F sejam manifestados principalmente nos dentes e ossos, o F também atinge os tecidos moles (MONSOUR; KRUGER, 1985; REDDY et al., 2003). Reações de hipersensibilidade (GRIMBERG, 1974), insuficiência renal (HODGE; SMITH, 1965) e anomalias congênitas (HODGE; SMITH, 1965) já foram relatados como conseqüência da ingestão crônica do F.

Essas alterações conseqüentes à ingestão crônica do F nos tecidos moles vêm sendo muito estudadas pois ocorrem, de certa forma, mais rapidamente do que nos tecidos mineralizados. Entretanto, não existe um padrão de distribuição do F nos diversos tecidos, pois existem diferenças no seu aporte sangüíneo além de características funcionais e histológicas particulares (CHLUBEK, 2003b).

Muitos estudos experimentais, principalmente em ratos, já foram realizados para avaliar as consequências após intoxicação crônica pelo F em tecidos moles. Hodge e Smith (1965) compilaram mais de setenta estudos realizados nos mais diversos tecidos, como fígado, rins, pulmões, coração, pâncreas, sangue, cérebro, tireóide, estômago, entre outros em ratos, coelhos, cães, aves, gansos, porcos e bovinos e concluíram que, de forma geral, a exposição ao F não provocou aumento da sua concentração nos tecidos moles estudados (HODGE; SMITH, 1965). Num estudo de 8 meses, Guan et al. (1989) observaram diminuição na atividade enzimática da GPx, aumento da peroxidação lipídica e redução nos níveis de GSH no sangue de ratos macho e fêmeas tratados com 30 ppm F na água de beber. Neste mesmo estudo, não foram observadas alterações na atividade da SOD, fosfatase alcalina e da lactato desidrogenase e nos níveis de glicose, albumina e hemoglobina. Wang et al. (2000), num estudo de 7 meses, concluiram que a dose de 100 ppm de F^- na água de beber provocou alterações nos lipídeos da membrana dos ratos, como provável resultado do ataque de radicais livres. Utilizando o mesma concentração de F na água de beber (100 ppm F^-), Shivarajashankara et al. (2002) sugerem que o F provocou aumento no estresse oxidativo e alterou a atividade de enzimas antioxidantes no cérebro de ratos jovens. Redução no crescimento também já foi relatada em ratos que receberam 5 mg F^-/kg/dia por 6 meses (TAYLOR et al., 1961).

2.2 Radicais Livres

Átomos apresentam um núcleo e os elétrons se movimentam ao redor deste núcleo, normalmente em pares. Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que apresenta elétrons desemparelhados na sua camada de valência (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os elétrons desemparelhados alteram a reatividade química do átomo ou molécula e, em geral, são muito instáveis, têm uma meia-vida muito curta (de minutos a nanosegundos) e reagem de forma rápida e inespecífica com diversos compostos e alvos celulares, podendo danificar DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (ABDALLA, 1993).

Os radicais livres podem ser gerados a partir de várias fontes, tais como radiação solar, metabolismo de oxigênio, metabolismo de leucócitos, respiração mitocondrial e reações metabólicas intra e extracelulares (ABDALLA, 1993). Os radicais livres mais importantes, do ponto de vista biológico, são aqueles derivados do oxigênio, as espécies reativas de oxigênio (EROs) (PUNCHARD; KELLY, 1996).

2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As reações oxidativas são muito importantes para o metabolismo celular. A redução completa do oxigênio à água é acompanhada de uma alta liberação de energia que pode, por ventura, gerar uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, EROs. Estima-se que em torno de 1 a 5 % de todo o oxigênio utilizado durante o metabolismo celular aeróbico tenha sua redução incompleta formando as EROs (HALLIWELL, 1994; PUNCHARD; KELLY, 1996).

Convencionalmente, o oxigênio molecular (O_2) é um birradical. Sua estrutura eletrônica apresenta capacidade limitada de reagir com biomoléculas, favorecendo sua redução através da adição de um elétron por vez, o que leva a geração de radicais de oxigênio. O O_2 pode dar origem a diversas EROs, seja por absorção de energia, seja por transferência de elétrons. Quando o O_2, no seu estado fundamental (oxigênio triplete), absorve energia (luz ou radiação) e formam-se as espécies excitadas denominadas de oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$ e $^1\Sigma g^+O_2$). Outra via de formação de EROs é através da redução tetravalente do O_2 à água, resultando na formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, por fim, o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), considerado o mais reativo de todos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 2.4).

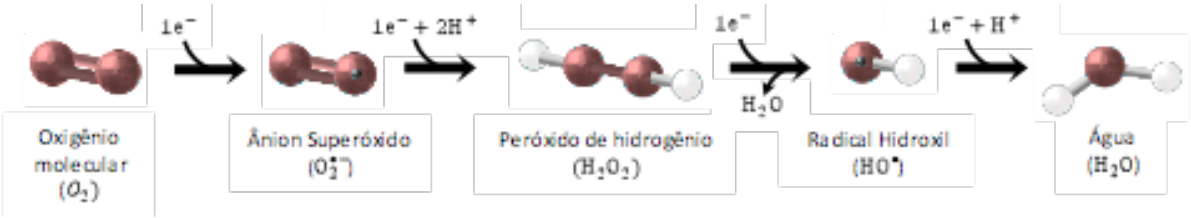

Figura 2.4 - Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação da água. Durante este processo, são formadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (adaptado de AUGUSTO, 2006)

Vale a pena lembrar, que EROs é um termo coletivo para espécies radicalares e não-radicalares de oxigênio. As formas mais comuns de EROs estão listadas na Tabela 2.1.

Portanto, a toxicidade do oxigênio depende da formação dessas espécies reativas (ER). Em condições fisiológicas, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa e desempenha funções reguladoras. Entretanto, o aumento na geração de EROs provoca alterações nas funções biológicas de moléculas provocando injúrias celulares, resultando no estresse oxidativo

(AUGUSTO, 2006). O estresse oxidativo é o dano biomolecular provocado pelo ataque de ER aos constituintes do organismo (HALLIWELL, 2007).

Tabela 2.1 – Espécies Reativas de Oxigênio

Radicais	Não-Radicais
Superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroperoxil, $HO_2^{\bullet}$	Peroxinitrito, $ONOO^{-a}$
Hidroxil, $OH^{\bullet}$	Ácido Peroxinitroso, $ONOOH^{a}$
Peroxil, $RO_2^{\bullet}$	Ácido Hipobromoso, $HOBr^{c}$
Oxigênio singlete, $^1\Sigma g^+O_2$	Ácido Hipocloroso, $HOCl^{b}$
Alcoxil, $RO^{\bullet}$	Oxigênio singlete, $^1\Delta gO_2$
Dióxido de carbono, $CO_2^{\bullet -}$	Ozônio, O_3

Muitos trabalhos vêm investigando a relação entre os efeitos tóxicos do F e o estresse oxidativo e, apesar da extensão de informações acumuladas, os dados ainda são contraditórios.

Um dos efeitos mais destrutivos das EROs é a peroxidação lipídica, que pode levar à destruição da membrana celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PUNCHARD; KELLY, 1996).

2.2.2 Peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é definido como uma reação em cadeia mediada por radicais livres que resulta na deterioração oxidativa de lipídeos poliinsaturados (GROTTO et al., 2009). Os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que apresentam duas ou mais duplas ligações carbono-carbono e são importantes componentes da membrana, envolvendo células e organelas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O processo de peroxidação lipídica pode ser dividido em 3 fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 2.5).

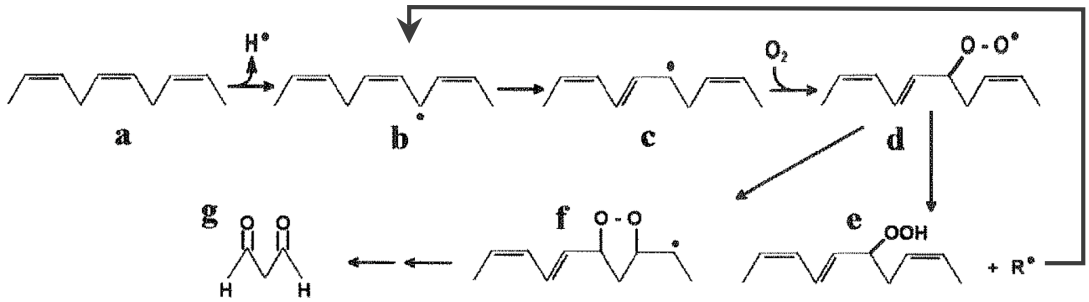

Figura 2.5 - Processo de peroxidação lipídica

Os ácido graxos poliinsaturados (a) são particularmente susceptíveis à peroxidação, que se inicia com o ataque de espécies químicas suficientemente reativas para abstrair um átomo de hidrogênio de um carbono metileno (— CH_2 —) da cadeia de um ácido graxo. Uma vez que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, sua remoção deixa um elétron desemparelhado no átomo de carbono ao qual estava ligado, formando um radical lipídico (b). Ocorre o rearranjo das duplas ligações resultando na formação de dienos conjugados (c). Em células aeróbicas, o destino mais comum do radical de carbono é ser combinado com o O_2 para formar

um radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) (d). A propagação do processo de peroxidação lipídica ocorre quando o $ROO^{\bullet}$ ataca proteínas de membrana, retirando um hidrogênio de um ácido graxo adjacente para formar um hidroperóxido (ROOH) (e) ou um endoperóxido lipídico (f). A formação de endoperóxidos em ácidos graxos insaturados contendo duplas ligações interrompidas por, pelo menos, 3 metilenos, pode levar à formação de MDA (g) e outros aldeídos como produto de hidrólise. Uma vez iniciado, o processo de peroxidação lipídica prossegue como uma reação em cadeia de radical livre. A terminação deste processo pode ocorrer como resultado da reação com um outro radical, proteína ou composto formando um produto final estável (GROTTO et al., 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação lipídica provoca alterações principalmente em componentes das membranas biológicas, resultando na diminuição da sua fluidez, interferência nas funções de proteínas associadas às membranas, redução no suprimento de energia, perda da seletividade iônica, modificações na sua permeabilidade e integridade e, conseqüentemente, perda das suas funções essencias (COMPORTI, 1993).

Muitos autores sugerem que o F interfere no metabolismo lipídico de animais experimentais. Em um estudo realizado em ratos, Hohenegger et al. (1986) administraram oralmente uma dose diária de 30 mg e 100 mg de NaF/kg p.c. durante uma semana e observou uma redução no consumo de oxigênio, nenhuma alteração na secreção de triglicerideos e um aumento na síntese de ácidos graxos nos níveis plasmáticos dos dois grupos experimentais estudados. Um aumento dos níveis de lipídeos totais, fosfolipídeos e triglicerideos também foi observado no cérebro de coelhos machos e fêmeas tratados subcutaneamente com 5, 10, 20 e 50 mg F^{-}/kg p.c./dia durante 100 dias (SHASHI, 1992). Em uma outra investigação a

longo termo, Wang et al. (2000) e Guan et al. (2000) relataram uma redução nos níveis de fosfolipídeos, ácidos graxos insaturados e ubiquinona no fígado e rins de ratos, machos e fêmeas, respectivamente, como resultado da peroxidação lipídica provocada pela ingestão de 100 ppm F^- adicionados a água de beber por 7 meses.

2.2.2.1 Malondialdeído

O malondialdeído (Figura 2.6), MDA, é um dialdeído de três carbonos altamente reativo produzido como resultado da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados. O MDA reage com diversos resíduos proteícos, além de outras biomoléculas formando adutos que podem provocar alterações mutagênicas e possivelmente carcinogênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os níveis elevados de MDA estão associados com diversas condições patológicas, fazendo com que o seu monitoramento em tecidos biológicos seja um importante indicativo dos danos provocados pela peroxidação lipídica (GROTTO et al., 2009).

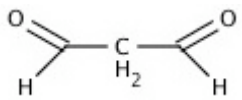

Figura 2.6 - Estrutura molecular do malondialdeído (MDA)

Muitos trabalhos relatam que o F provoca alterações nos níveis de MDA em diferentes tecidos de animais experimentais. Soni, Kachole e Pawar (1984), observaram um aumento nos níveis de MDA em fígado, pulmões, testículos, rins e intestino de ratos tratados com uma dose intraperitoneal (i.p.) de NaF (5 mg de F^-/kg

p.c.) por 4 dias consecutivos. Também foi relatado um aumento nos níveis de MDA por Inkielewicz e Krechniak (2004) nos rins, fígado, cérebro e testículos de ratos tratados com 5 e 25 ppm F^- (NaF) na água de beber por 3 meses e, por Akdogan et al. (2004) nos eritrócitos de coelhos tratados com 40 ppm F^- (NaF) por 70 dias na água de beber. Os resultados observados por Shivarajashankara et al. (2001) corroboram com estes achados; os autores encontraram níveis de MDA aumentados no cérebro, fígado e nas células vermelhas de ratos tratados com 100 ppm de F^- (NaF) na água de beber por 4 meses. Por outro lado, Shayiq, Raza e Kidwai (1986) verificaram que baixas concentrações de F (5 a 20 mM NaF) inibem a formação de MDA no cérebro, fígado e intestino de ratos incubados por 1, 2 e 3 horas; a diminuição da peroxidação lipídica também foi observada na concentração de 50 mM de NaF no fígado e intestino, mas não no cérebro, onde ocorreu aumento da produção de MDA. Nesta mesma investigação, os autores administraram NaF oralmente por 30 e 60 dias (25 mg NaF/ kg p.c./dia) e observaram uma redução nos níveis de MDA no intestino de ambos os grupos experimentais e nenhuma alteração no fígado nem no cérebro dos grupos estudados. Já Reddy et al. (2003) não relataram nenhuma alteração nos níveis de MDA nas células vermelhas de humanos expostos à 5 ppm F^- (NaF) na água de beber por 15 anos, nem em coelhos expostos à 150 ppm F^- na água de beber por 6 meses. O mesmo foi verificado por Chlubek et al. (2003) em pâncreas de ratos administrados com 50 e 100 ppm de F^- (NaF) na água de beber durante 4 meses.

2.2.3 Sistema antioxidante

O aumento na produção de EROs provoca danos biomoleculares aos constituintes do organismo, processo este denominado de estresse oxidativo. Para combater os danos provocados pelo estresse oxidativo, o organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Assim, antioxidante é definido como qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula-alvo (HALLIWELL, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende a uma variada gama de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário impede a geração de espécies reativas ou sequestram-nas de maneira a impedir a sua interação com alvos celulares. É representado pelas enzimas antioxidantes, quelantes, proteínas transportadoras e outras substâncias, tais como o urato, ascorbato, albumina, bilirrubina e carotenóides. O sistema de defesa secundário bloqueia a estapa de propagação da cadeia radicalar seqüestrando radicais intermediários e é representado pelo α-tocoferol, tocotrienóis, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos. O sistema de defesa terciário atua reparando lesões oxidativas no DNA, proteínas e lipídeos, através do sistema de reparo do ácido desoxirribonucleico, das proteases e das lipases, respectivamente (ABDALLA, 1993; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A seguir, detalharemos duas enzimas antioxidantes de interesse para o presente estudo.

2.2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloproteína presente no citoplasma celular e nos fluídos extracelulares de todos os organismos aeróbicos. Existem duas isoformas intracelulares da SOD, a Cu,ZnSOD e a MnSOD e uma extracelular, a EC-SOD (ABDALLA, 1993).

A Cu,ZnSOD é a principal SOD encontrada no meio intracelular. Apresenta estrutura homodimérica com 32kDa; cada subunidade apresenta um sítio ativo contendo um íon cobre e um íon zinco e está presente no citoplasma e núcleo celular. Já a MnSOD é uma proteína homotetrâmera com 96kDa localizada principalmente na matriz mitocondrial (Figura 2.7). A perda ou disfunção tanto da Cu,ZnSOD como da MnSOD está associada à patologias associadas com as EROs (FATTMAN; SCHAEFER; OURY, 2003). No caso, mutações na Cu,ZnSOD estão relacionadas com a esclerose lateral amiotrófica (ROSEN et al., 1993), enquanto que a perda da atividade da MnSOD está associada com morte neonatal (ROBINSON, 1998). A EC-SOD é uma glicoproteína e se encontra principalmente na matriz extracelular de mamíferos (MARKLUND, 1984). Está presente na maioria dos organismos na forma tetrâmera e, menos comumente, como um dímero e tem peso molecular de aproximadamente 135.000 kDa. Acredita-se que a isoforma extracelular esteja envolvida na sinalização de eventos induzidos pelo óxido nítrico e, em função da sua localização, tem papel fundamental na prevenção de danos celulares e teciduais iniciados por EROs gerados extracelularmente (FATTMAN; SCHAEFER; OURY, 2003) (Figura 2.8).

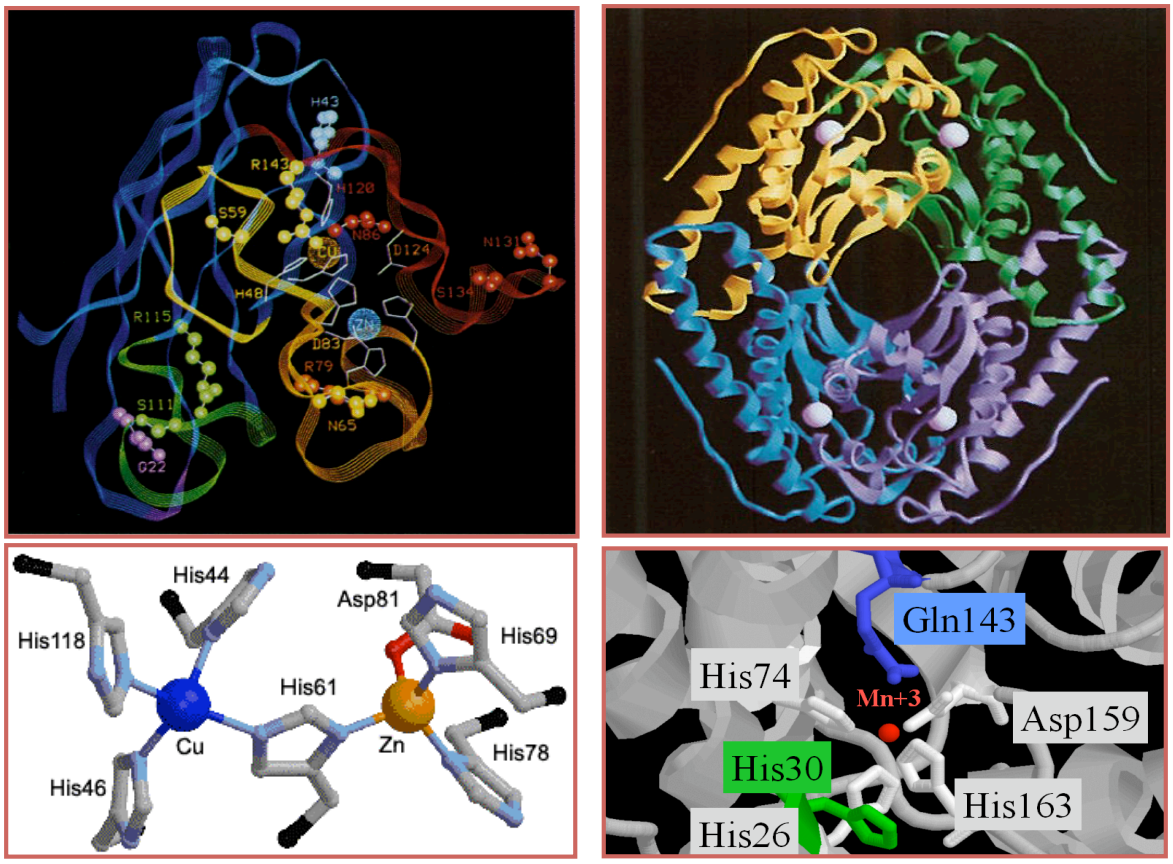

Figura 2.7 - À esquerda, temos a estrutura dimérica da Cu,ZnSOD, com destaque para a presença dos íons Cu e Zn no seu sítio ativo (PARGE; HALLEWELL; TAINER, 1992); à direita, a estrutura tetramérica da MnSOD, com destaque para a presença do íon Mn em um dos seus sítios ativo (BORGSTAHL et al., 1992)

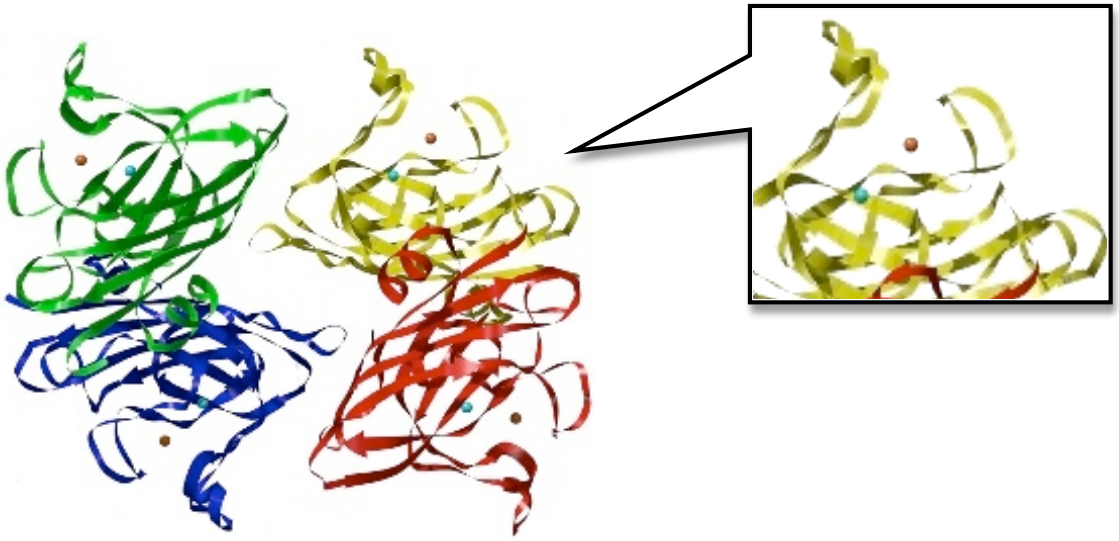

Figura 2.8 - Estrutura tetramérica da EC-SOD. Em destaque, os íons Cu e Zn no sítio ativo (ANTONYUK, 2009)

A SOD é a primeira defesa celular contra o estresse oxidativo. São enzimas altamente eficazes na remoção catalítica do $O_2^{\bullet -}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). De maneira geral, as isoformas catalisam, essencialmente, a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2 (Figura 2.9).

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2\ +\ O_2$$

Figura 2.9 - Reação de dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) catalisada pela enzima superóxido dismutase

Este H_2O_2 é então decomposto pelas enzimas GPx e CAT (RZEUSKI; CHLUBEK; MACHOY, 1998).

Altas concentrações de F provavelmente inibem a atividade da SOD (CHLUBEK, 2003a; RZEUSKI; CHLUBEK; MACHOY, 1998; SHIVARAJASHANKARA et al., 2001). Estudos realizados em humanos vivendo em áreas de fluorose endêmica apresentaram diminuição na atividade da SOD (LI; CAO, 1994). Efeitos similares em animais experimentais foram encontrados por diversos autores (GUO; SUN; SUN, 2003; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; ZHAN et al., 2005), contrariando os resultados de Reddy et al. (2003).

2.2.3.2 Catalase

A catalase (CAT) é uma hemeproteína citoplasmática presente na maioria das células aeróbicas. Nos animais está presente em todos os tecidos, principalmente no fígado (hepatócitos e peroxissomos) e nos eritrócitos (citoplasma). A CAT presente nos eritrócitos auxilia na proteção contra o H_2O_2 gerado pela dismutação do $O_2^{\bullet -}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A CAT presente nos animais apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento Fe III – heme ligado ao seu sítio ativo (REID et al., 1981). O grupamento heme está localizado a 20Å abaixo da superfície molecular, sendo acessível apenas através de resíduos hidrofóbicos ligados a ele e isto previne o acesso de outras moléculas que não sejam o H_2O_2, pois é este o sítio metálico que reage com o H_2O_2. Cada subunidade também apresenta uma molécula de NADPH ligada a ela (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KIRKMAN; GAETANI, 1984, 2007) (Figura 2.10).

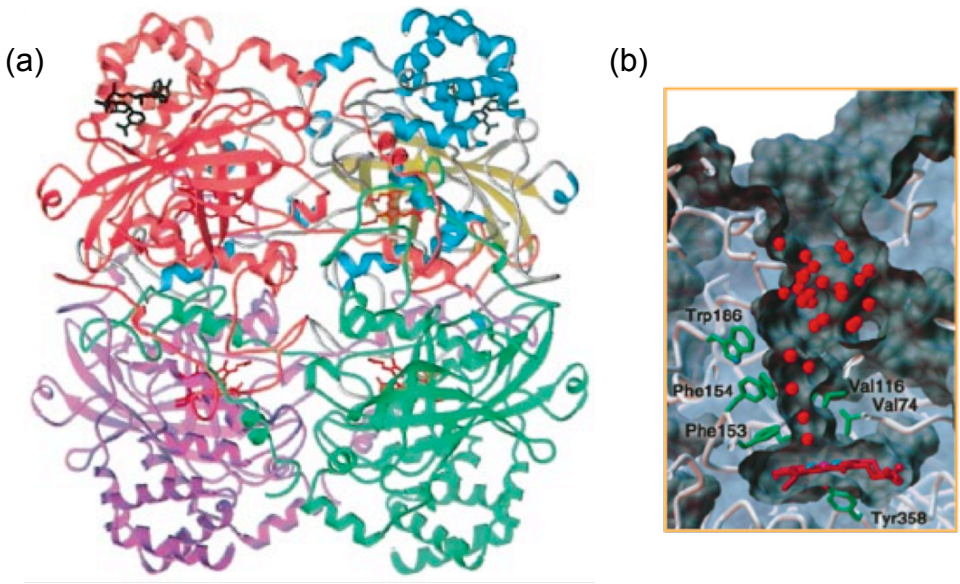

Figura 2.10 - (a) Estrutura tetramérica da catalase (PUTNAM et al., 2000) e (b) sítio ativo da catalase (KIRKMAN; GAETANI, 2007)

A conversão do H_2O_2 pela CAT (III) é uma reação de dismutação, onde um H_2O_2 é reduzido em H_2O (I) e outro, é oxidado em O_2 (II) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

$$\mathrm{Fe(III)\text{-}catalase} + H_2O_2 \xrightarrow{k_1} \text{composto I} + H_2O \qquad \text{(I)}$$

$$\text{composto I} + H_2O_2 \xrightarrow{k_2} \mathrm{Fe(III)\text{-}catalase} + H_2O + O_2 \qquad \text{(II)}$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2 \quad \text{onde,} \qquad \text{(III)}$$

$\mathrm{Fe\text{-}catalase}$ representa o átomo de ferro do grupo heme ligado à enzima.

Ao entrar no sítio ativo da CAT, uma molécula de H_2O_2 oxida o ferro, de $\mathrm{Fe(III)}$ a $\mathrm{Fe(IV)}$ formando $\mathrm{O=Fe(IV)}$ e, com isso, ocorre a liberação de uma molécula de H_2O. A espécie $\mathrm{O=Fe(IV)}$ é muito oxidante e reage com uma segunda molécula de H_2O_2, retirando-lhe um átomo de oxigênio. Forma-se assim uma segunda molécula de H_2O e o O_2. O íon ferro volta ao estado de oxidação 3+ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KIRKMAN; GAETANI, 2007; VETRANO et al., 2005).

A atividade da CAT de células vegetais e animais (com exceção dos eritrócitos) está, em grande parte, localizada em organelas subcelulares com uma única membrana, os peroxissomos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A influência do F na atividade da catalase já foi relatada por alguns autores na literatura. Shantakumari, Srinivasalu e Subramanian (2004) observaram diminuição na atividade da enzima no fígado e rim de ratos bebendo 25 ppm F^- e Vani e Reddy (2000) no cérebro e músculos de ratas tratadas com 20 mg F^-/kg/p.c. na forma de NaF. Por outro lado, Reddy et al. (2003) observaram nenhuma

alteração na atividade da enzima em coelhos bebendo 150 ppm de F^- durante 6 meses.

2.3 Glândulas salivares

As glândulas salivares são órgãos exócrinos importantes para manter a integridade dos tecidos orais, através da secreção salivar. As glândulas salivares maiores se encontram aos pares e incluem as glândulas parótidas (PA), submandibulares (SM) e sublinguais (SL), que são responsáveis por cerca de 90% da produção de saliva não estimulada, sendo os 10% restantes secretadas pelas glândulas salivares menores (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

O F, na forma de NaF, aumenta a concentração de AMPc através da estimulação da adenilato ciclase, o que pode influenciar a atividade fisiológica e metabólica intracelular em ratos (KLEINER; MILLER; ALLMANN, 1979), promovendo a secreção de amilase nas glândulas PA e de mucina nas glândulas SM (ALLMANN; SHAHED, 1987), aumentando o conteúdo de glicogênio na glândula SM (NICOLAU; RIBEIRO, 1992) e, alterando a atividade de algumas enzimas do metabolismo de carboidratos (DA MOTTA; DE SOUZA; NICOLAU, 1999).

Poucos estudos foram realizados investigando o papel dos radicais livres nas glândulas salivares e na saliva. Nogueira et al. (2005) relataram o aumento de MDA no sangue e na glândula SM de ratos diabéticos, enquanto nenhuma alteração foi observada na glândula PA; um aumento na atividade da enzima SOD e na relação glutationa reduzida/glutationa oxidada (GSH/GSSG) foi observado na

glândula SM de ratos tratados com isoproterenol (BARROSO; QUISSELL; COLEPICOLO, 2003); Nagler et al. (2002) observou que a secreção salivar proveniente da glândula PA apresenta parâmetros antioxidantes elevados em relação à secreção das glândulas SM e SL. Entretanto, não existem dados preliminares dos efeitos do F no estresse oxidativo das glândulas salivares e, com base nos dados da literatura, é de extrema importância o conhecimento do comportamento do F para minimização do seus efeitos tóxicos no ambiente oral.

3 PROPOSIÇÃO

Em razão da importância do papel do F na Odontologia e, considerando a escassez de informações disponíveis na literatura, em relação à sua atuação no estresse oxidativo das glândulas salivares, o objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis alterações no sistema antioxidante, através da atividade das enzimas SOD e CAT, e determinar os níveis de peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos submetidos ao excesso de NaF em dois modelos experimentais:

- agudo, onde os animais foram tratados com dose única de injeção i.p. de NaF a 15 mg F^-/kg p.c.;

- a longo termo, onde os animais foram submetidos à ingestão de 100 ppm de F^- adicionados à água de beber por 30, 60 e 90 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Antes do início da pesquisa, os protocolos experimentais deste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Sub-Comissão de Bioética de Animais) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), com o parecer de aprovação número 01/06, de 15 de fevereiro de 2006 (Anexo A).

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Animais

Foram utilizados cento e sessenta (160) ratos machos da linhagem Wistar com dois meses de idade, pesando aproximadamente entre 220 – 270 g, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisa em Biologia Oral da FOUSP.

Durante todo o período experimental, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais onde tiveram livre acesso à água e alimento (ração extrusada de

forma cilíndrica, marca Labina, Purina®, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda., São Paulo, Brasil).

Dois protocolos experimentais foram utilizados, um para avaliar o efeito da administração de uma única injeção i.p. de NaF ao longo de um período de 24 horas (experimento agudo) e outro para avaliar o efeito do NaF adicionado à água de beber durante 30, 60 e 90 dias (experimento a longo termo). Para isso, os ratos foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em dois grupos, controle (C) e experimental (F), que foram, então, subdivididos, de acordo com o tratamento com NaF recebido (Figura 4.1), a ser descrito a seguir.

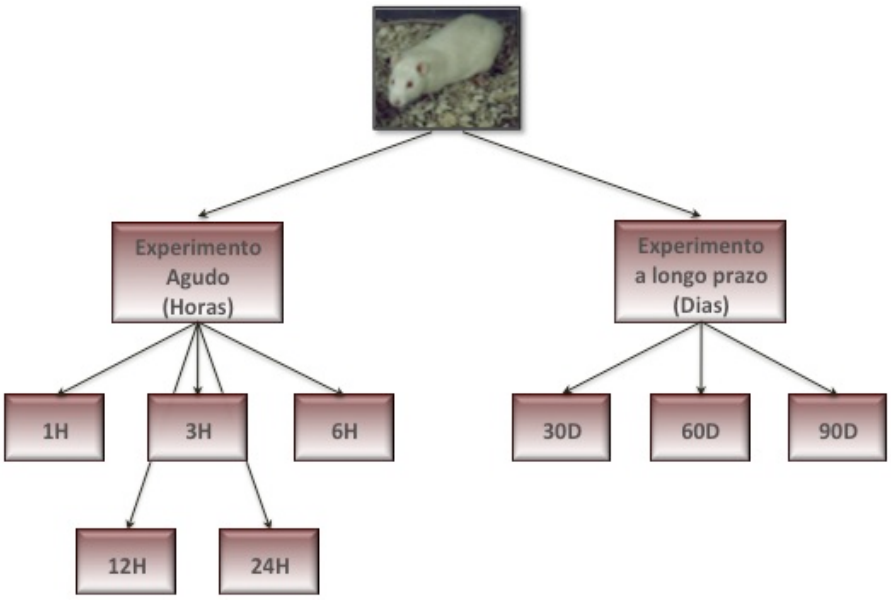

Figura 4.1 - Distribuição dos grupos experimentais utilizados neste estudo

4.2.2 Tratamento com fluoreto de sódio

4.2.2.1 Experimento agudo

Neste tipo de experimento, os animais foram separados em gaiolas individuais e deixados para aclimatização por uma semana.

Após 12 horas em jejum, os animais do grupo experimental foram tratados com uma única dose i.p. de solução de NaF (15 mg F^-/kg de p.c.) e, em seguida, eutanasiados 1 (F1H), 3 (F3H), 6 (F6H), 12 (F12H) ou 24 (F24H) horas após a injeção. Já ao grupo controle (C1H, C3H, C6H, C12H e C24H) foi administrada uma dose equivalente de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%.

O peso corpóreo dos animais de ambos os grupos, controle e experimental, foi obtido no dia da eutanásia dos mesmos.

4.2.2.2 Experimento a longo termo

Neste tipo de experimento, os animais foram alocados em gaiolas individuais durante uma semana para aclimatização. Decorrido este tempo, os animais do grupo experimental foram submetidos ao tratamento com NaF (100 ppm F^{--}) adicionado à água de beber. Os ratos foram eutanasiados 30 (F30D), 60 (F60D) ou 90 (F90D) dias após o início do experimento. Já os animais do grupo controle (C30D, C60D e

C90D) receberam água proveniente do sistema de abastecimento público da cidade de São Paulo, que apresenta níveis de F não superiores a 1 ppm.

Durante todo o período experimental, o consumo de água foi monitorado a cada 2 dias, tanto no grupo controle, como no experimental. Os valores do peso inicial (início do experimento) e final (dia da eutanásia) também foram coletados.

4.2.3 Obtenção e preparo das amostras

Após a eutanásia dos animais, as glândulas salivares, SM e PA, foram imediatamente removidas, limpas de tecido aderente e prensadas entre duas placas de alumínio previamente resfriadas em gelo seco e, conservadas em freezer a -80°C até o momento das análises (Figura 4.2).

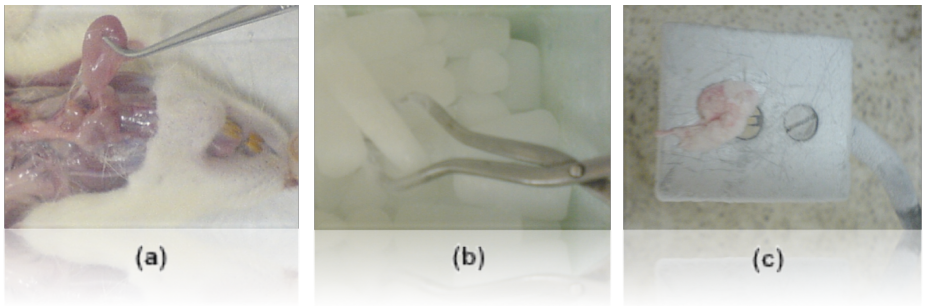

Figura 4.2 - (a) remoção da glândula submandibular (SM) no rato; (b) glândula sendo prensada entre as placas de alumínio; (c) tecido congelado, pronto para ser armazenado

No momento em que foram utilizadas, as glândulas SM e PA foram pesadas, tomando-se o cuidado para não descongelarem, homogeneizadas a 10% em solução tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 e centrifugadas a 1.540 x *g* por

10 minutos a 4ºC. Foram utilizados os sobrenadantes das amostras em todos os protocolos experimentais.

Também foram coletadas amostras de sangue que foram preservadas em tubos descartáveis de coleta de sangue contendo EDTA a 15% (Vacutainer®, BD Brasil, São Paulo, Brasil). As amostras de sangue obtidas foram analisadas em relação aos níveis de glicose e peroxidação lipídica no mesmo dia em que foram coletadas.

4.3 Análises

Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados em espectrofotômetro (DU-800, Beckman, EUA) à 25ºC.

4.3.1 Determinação da glicose sanguínea

A determinação da glicemia foi feita pelo método da glicose oxidase + peroxidase (PGO) de Bergmeyer e Bernt (1974). 50 µL de amostras de sangue foram adicionados em tubos de plástico previamente resfriados e preservados em gelo picado contendo 750 µL de água deionizada. As amostras foram tratadas com soluções de $Ba(OH)_2$ 0,3 N e $ZnSO_4$ 5%, promovendo a desproteinização das amostras. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 15 minutos

e o sobrenadante foi utilizado para a reação com a PGO. As leituras foram realizadas a 460 nm em espectrofotômetro e utilizaram a o-dianisidina como substrato colorimétirco. Nesta metodologia a intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de glicose oxidada (Figura 4.3).

$$\beta - \text{D-Glicose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Glicose oxidase}} \text{ácido D-glucônico} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} 2H_2O + D$$

Figura 4.3 - O H_2O_2 é decomposto pela peroxidase e o O_2 liberado oxida o doador de hidrogênio DH_2 (o-dianisidina), resultando no derivado D. A intensidade da cor formada a partir de DH_2 é equivalente à concentração de glicose presente na amostra

4.3.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Paoletti et al. (1986) e Paoletti e Mocali (1990). O meio de reação (volume final de 1,1 mL) foi composto de tampão trietanolamina/dietanolamina (TEA-DEA) 100 mmol/L (pH 7,4), EDTA/$MgCl_2$ 2,27/1,14 mmol/L (pH 7,0), NADH 0,14 mmol/L e 100µL de amostra. A reação foi acompanhada por um período inicial de 5 minutos e, em seguida, mensurou-se a inibição da atividade da enzima, através da oxidação do NADH pela adição de 0,91 mmol/L de mercaptoetanol na presença de EDTA e cloreto de manganês. As alterações na absorbância foram acompanhadas a 340 nm durante 15 minutos. Uma curva de atividade foi realizada através da substituição da amostra por igual volume de tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,2 (controle), onde foi

determinada a atividade máxima da reação em cada leitura. O percentual de inibição foi utilizado como índice da atividade da SOD e calculado como (Δmin amostra/ Δmin atividade máxima) x 100, onde 1 unidade da atividade da SOD é definida como a quantidade da enzima capaz de inibir 50% da taxa de oxidação observada pelo controle (atividade máxima = sem presença da enzima).

4.3.3 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo método de Aebi (1984) e Beers e Sizer (1952), acompanhando a decomposição do H_2O_2 (Figura 4.4) por 3 minutos a 240 nm de absorbância (ε_{240} = 43,6 $M^{-1}.cm^{-1}$).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

Figura 4.4 - Dismutação do peróxido de hidrogênio pela catalase

O meio de reação (volume final 1,0 mL) foi composto de tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,2 e 2 µL de amostra. A reação foi iniciada através da adição de H_2O_2 100 mmol/L. Os valores foram expressos em mU/min/mg prot, onde uma unidade de atividade da catalase é definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H_2O_2/min.

4.3.4 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da concentração de malondialdeído (MDA), a partir da estimativa de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) na amostra pelo método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Durante o processo de peroxidação lipídica são produzidos aldeídos sendo o MDA o mais abundante. Nesta metodologia, cada molécula de MDA presente na amostra reage com duas moléculas de TBA, resultando numa solução de coloração rósea que pode ser detectada em espectrofotômetro a 535 nm de absorbância (Figura 4.5).

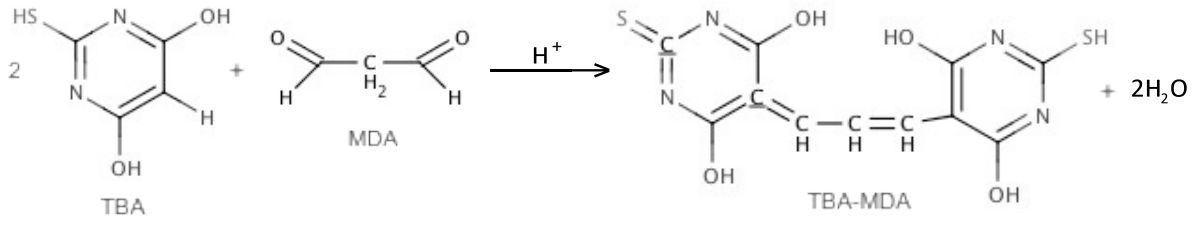

Figura 4.5 - Reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA) formando o aduto TBA-MDA, que apresenta coloração rósea

As amostras (sangue e tecidos) foram desproteinizadas através da adição de ácido tricloroacético (TCA) 20% e, em seguida, adicionou-se 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol 4% (BHT ou hidroxitolueno butilado). A adição de BHT evita a auto-oxidação de lipídeos, que é catalisada por metais durante o aquecimento com o TBA. As amostras foram agitadas e permaneceram em gelo por 30 minutos. Decorrido este período, foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 5 minutos e ao sobrenadante foi adicionado volume igual de TBA 0,7%. As amostras foram, então,

aquecidas a 95°C por 45 minutos e, em seguida, rapidamente resfriadas em gelo por 30 minutos. A concentração de MDA foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $\varepsilon_{535} = 153\ mM^{-1}/cm^{-1}$.

4.3.5 Determinação da concentração total de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Este método consiste na adição de hidróxido de sódio e carbonato de cálcio às proteínas presentes nas glândulas salivares, além de sulfato de cobre e tartarato de sódio, formando um complexo. Os aminoácidos fenólicos presentes neste complexo apresentam pouca variação em sua estrutura primária e são reduzidos pelo reativo de Folin-Ciocalteu, resultando em uma coloração azulada. A intensidade de coloração da reação formada foi, então, detectada em espectrofotômetro à um comprimento de onda de 660 nm. O conteúdo de proteína total foi calculado por meio de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/ml.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com 2 fatores (tratamento com NaF vs. tempo) para comparação entre os grupos. Em caso de diferença estatisticamente significante, foi utilizado o teste

complementar de Tukey para analisar onde as diferenças estavam presentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes adotando-se $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

As diferenças estatisticamente significantes estão representadas por um asterisco para comparação entre o grupo controle e o grupo experimental correspondente no mesmo tempo experimental; por letras maiúsculas, comparando somente os grupos controle entre si e, letras minúsculas, comparando somente os grupos experimentais entre si.

5 RESULTADOS

5.1 Exposição aguda

A figura 5.1 representa a média dos valores da glicemia obtidos no momento da eutanásia. A glicemia foi de 88,92 ± 14,60 para o grupo controle e de 103,26 ± 18,61 mg/dL para o grupo experimental. Foi observada diferença estatisticamente significante para o fator grupo, isto é, na comparação entre os grupos controle e experimental ($p < 0,05$). Entre os grupos experimentais, foi observado um pico nos valores de glicemia no grupo de 3 horas ($p < 0,05$), que retornou a valores próximos do grupo controle no tempo de 24 horas.

A figura 5.2 representa a média dos valores do peso corporal dos animais no dia em que foi realizada a eutanásia dos mesmos. Os animais selecionados para o presente estudo apresentaram peso médio de 242,00 ± 3,41 e 238,60 ± 3,27 g para os grupos controle e experimental, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos estudados ($p \geq 0,05$).

As figuras 5.3 e 5.4 representam a média dos valores da atividade específica da enzima SOD das glândulas SM e PA, respectivamente. A glândula SM apresentou uma redução da atividade, diferente estatisticamente do seu respectivo grupo controle, nos tempos 1H, 12H e 24H ($p < 0,05$). A exceção foi o grupo 3H que apresentou um aumento significativo da atividade enzimática de 45,67% em relação ao seu controle ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa

nos valores obtidos para a glândula PA; os valores obtidos para o grupo controle foram 6,90 ± 1,40 e, para o grupo experimental, 6,13 ± 1,42 U/mg prot ($p \geq 0,05$).

As figuras 5.5 e 5.6 representam a média dos valores obtidos da atividade específica da CAT das glândulas SM e PA, respectivamente. Na glândula SM, os valores obtidos para a atividade da CAT foram 11,18 ± 2,24 e 12,28 ± 2,74 mU/min/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente. Na glândula PA, os valores obtidos para a atividade da CAT foram 5,61 ± 0,88 e 5,13 ± 0,79 mU/min/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente. Tanto a glândula SM como a PA, apresentaram diferença estatisticamente significante somente para o fator grupo, na comparação entre os grupos controle e experimental ($p < 0,05$).

A figura 5.7 representa a média da concentração de MDA nas amostras de sangue. As figuras 5.8 e 5.9 representam a média da concentração de MDA das glândulas SM e PA, respectivamente. Nas amostras sanguíneas, os valores obtidos para o grupo controle foram 76,07 ± 16,23 e, para o grupo experimental, 93,12 ± 20,13 µg/mL sangue; já nas amostras glandulares, a SM apresentou os valores 1,72 ± 0,37 e 2,89 ± 0,91 µg/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente; e a PA, 2,33 ± 0,51 e 2,87 ± 0,63 µg/mg prot, para os grupos controle e experimental, respectivamente. O tratamento com NaF provocou aumento da concentração de MDA, tanto nas amostras sanguíneas, como nas amostras glandulares de SM e PA, na comparação entre os grupos controle e experimental (fator grupo, $p < 0,05$), indicando que o F aumentou a peroxidação lipídica dos tecidos estudados independente do tempo da injeção de NaF. Somente na glândula SM que este acréscimo foi mais pronunciado: o aumento da peroxidação lipídica foi

de 91,33% após 6 horas da injeção de NaF sendo sustentado nos grupos seguintes de 12H (110,39%) e 24H (92,82%), em relação ao seu controle ($p < 0,05$).

As figuras 5.10 e 5.11 representam a média da concentração de proteína total das glândulas SM e PA, respectivamente. Os valores obtidos para a SM foram 10,67 ± 0,85 e 10,93 ± 1,02 mg/mL para os grupos controle e experimental, respectivamente. Os valores obtidos para a PA foram 13,04 ± 1,90 e 12,98 ± 1,83 mg/mL para os grupos controle e experimental, respectivamente. Ambas as glândulas, SM e PA, não apresentaram qualquer diferença entre os grupos estudados para o parâmetro referido ($p \geq 0,05$).

5.2 Exposição a longo termo

A figura 5.12 representa a média dos valores da glicemia obtidos no momento da eutanásia. A glicemia foi de 85,50 ± 13,34 para o grupo controle e de 97,23 ± 23,11 mg/dL para o grupo experimental. Foi observada diferença estatisticamente significante somente na comparação entre os grupos controle e experimental (fator grupo, $p < 0,05$), indicando que o F provocou o aumento da glicemia no grupo experimental independente do período decorrido do tratamento com NaF.

A figura 5.13 representa a média diária de ingestão de água durante o período experimental, 30, 60 ou 90 dias. O consumo diário de água foi de 37,18 ± 5,34 para o grupo controle e de 39,81 ± 7,46 mL/dia para o grupo experimental. A adição do NaF na água de beber não provocou alterações no consumo diário de

água dos animais do grupo experimental, em todos os períodos experimentais ($p \geq 0,05$).

A figura 5.14 representa a média dos valores do peso corporal, inicial e final, dos animais em cada período experimental (30, 60 ou 90 dias). Como já era esperado, foi observado ganho de peso dos animais ao final de cada período ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes entre os pesos iniciais dos grupos controle e experimental ($p \geq 0,05$), nem para os pesos finais, dos grupos controle e experimental ($p \geq 0,05$), indicando que o F não alterou a evolução do peso dos animais.

As figuras 5.15 e 5.16 representam as médias de peso das glândulas SM e PA, respectivamente. A SM apresentou os valores 0,25 ± 0,03 e 0,21 ± 0,03 g para os grupos controle e experimental, respectivamente; e a PA, 0,32 ± 0,04 e 0,28 ± 0,04 g, para os grupos controle e experimental, respectivamente. A administração do NaF provocou diminuição do peso das glândulas SM e PA quando comparadas ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). A glândula SM apresentou uma redução de peso no grupo experimental, em função do período experimental decorrido, significativa após 60 (17,39%) e 90 (17,86%) dias em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). Já na glândula PA, notou-se uma diminuição do peso glandular do grupo experimental de 15,63%, 12,90% e 6,25% para os grupos de 30, 60 e 90 dias, respectivamente, entretanto, estatisticamente diferente do grupo controle apenas no grupo de 30 dias ($p < 0,05$).

As figuras 5.17 e 5.18 representam a média dos valores da atividade específica da enzima SOD das glândulas SM e PA, respectivamente. A SM apresentou os valores 2,92 ± 0,48 e 1,59 ± 0,36 U/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente; e a PA, 9,97 ± 1,43 e 3,04 ± 1,02 U/mg prot, para os

grupos controle e experimental, respectivamente. A administração do NaF provocou redução da atividade da SOD do grupo experimental em ambas as glândulas ($p < 0,05$). Além disso, nossos resultados demonstraram que a glândula PA possui atividade da SOD aproximadamente 3 vezes maior do que a glândula SM. Na glândula SM, a diminuição da atividade nos grupos experimentais ocorreu de forma constante, em todos os períodos experimentais, ou seja, após 30 (41,96%), 60 (50,53%) e 90 (43,93%) dias do tratamento com NaF quando comparados aos respectivos controle ($p < 0,05$). Já na glândula PA, esta queda foi mais pronunciada do que na glândula SM e, também, observada em todos os períodos experimentais, em relação ao grupo controle respectivo, após 30 (77,45%), 60 (60,92%) e 90 (70,52%) dias de tratamento, sendo mais marcante no grupo de 30 dias ($p < 0,05$).

As figuras 5.19 e 5.20 representam a média dos valores da atividade específica da enzima CAT das glândulas SM e PA, respectivamente. Na glândula SM, os valores obtidos para a atividade da CAT foram 9,38 ± 1,66 e 5,81 ± 0,87 mU/min/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente. Na glândula PA, os valores obtidos para a atividade da CAT foram 4,42 ± 0,63 e 3,27 ± 0,47 mU/min/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente. O tratamento com NaF provocou redução da atividade da CAT dos grupos experimentais em ambas as glândulas ($p < 0,05$). Na glândula SM, a diminuição na atividade foi progressiva, de 30,01%, 35,15% e 48,61% para os 30, 60 e 90 dias de tratamento, respectivamente ($p < 0,05$). A resposta da glândula PA foi semelhante à encontrada na SM, porém de forma menos expressiva. Quando comparados ao seu respectivo controle, verificou-se uma queda de 27,76%, 25,61% e 24,61% da atividade enzimática nos grupo 30, 60 e 90 dias, respectivamente ($p < 0,05$).

A figura 5.21 representa a média da concentração de MDA nas amostras de sangue. As figuras 5.22 e 5.23 representam a média da concentração de MDA das glândulas SM e PA, respectivamente. Nas amostras sanguíneas, os valores obtidos para o grupo controle foram 37,53 ± 10,09 e, para o grupo experimental 47,60 ± 12,38 µg/mL sangue; já nas amostras glandulares, a SM apresentou os valores 1,06 ± 0,27 e 2,20 ± 0,78 µg/mg prot para os grupos controle e experimental, respectivamente; e a PA, 1,24 ± 0,32 e 1,70 ± 0,42 µg/mg prot, para os grupos controle e experimental, respectivamente. Tanto nas amostras de sangue como nas amostras glandulares, o NaF provocou aumento da concentração de MDA nos grupos experimentais ($p < 0,05$). No sangue, a concentração de MDA foi maior em 13,94% no grupo experimental em relação ao seu controle no período de 30 dias e continou-se elevando após 60 (30,86%) e 90 (35,45%) dias de tratamento com NaF, contudo as diferenças significativas se deram apenas na comparação entre grupos (controle vs. experimental). A concentração de MDA na glândula SM apresentou um aumento bastante acentuado em relação ao grupo controle no grupo de 30 dias (180,80%) e uma elevação significativa (90,90%) no grupo experimental de 90 dias ($p < 0,05$). Já na glândula PA, o aumento da concentração de MDA do grupo experimental ocorreu de maneira progressiva, sendo estatisticamente diferente apenas no grupo de 90 dias, onde elevou-se em 54,09% em relação ao seu respectivo controle ($p < 0,05$). Outra informação importante foi que, os valores obtidos nas amostras sanguíneas, foram aproximadamente 30 vezes maior do que os resultados encontrados nas amostras glandulares, indicando que a peroxidação lipídica nas glândulas acompanhou as alterações sanguíneas provocadas pela administração de F em excesso.

As figuras 5.24 e 5.25 representam a média dos valores da concentração de proteína total das glândulas SM e PA, respectivamente. Os valores obtidos para a SM foram 11,98 ± 1,50 e 12,97 ± 2,03 mg/mL para os grupos controle e experimental, respectivamente. Os valores obtidos para a PA foram 11,48 ± 1,33 e 9,36 ± 1,23 mg/mL para os grupos controle e experimental, respectivamente. O tratamento com NaF provocou aumento na concentração de proteínas somente no grupo experimental de 90 dias na glândula SM quando comparada com o seu respectivo controle ($p < 0,05$). O oposto foi observado na glândula PA, onde houve redução significativa na concentração de proteínas nos grupos experimentais de 30 e 60 dias em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$).

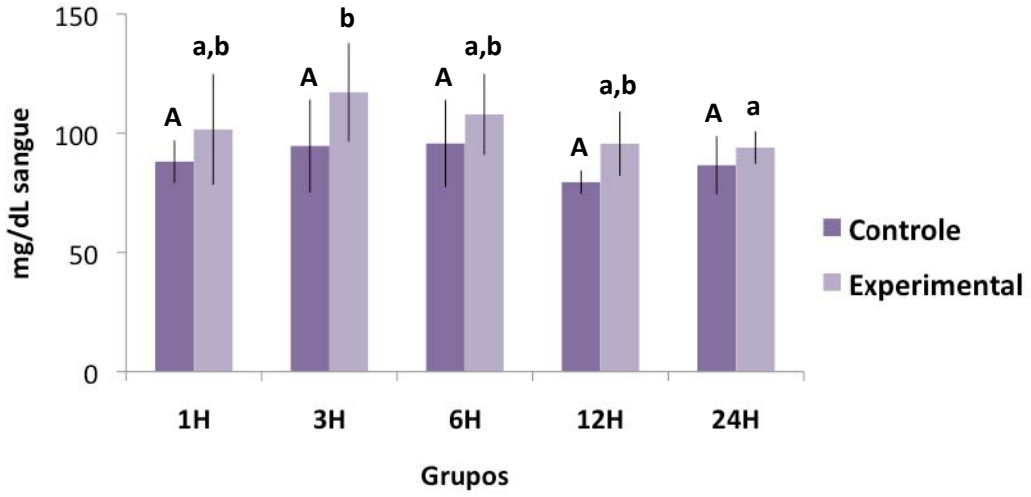

Figura 5.1 – Glicemia dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

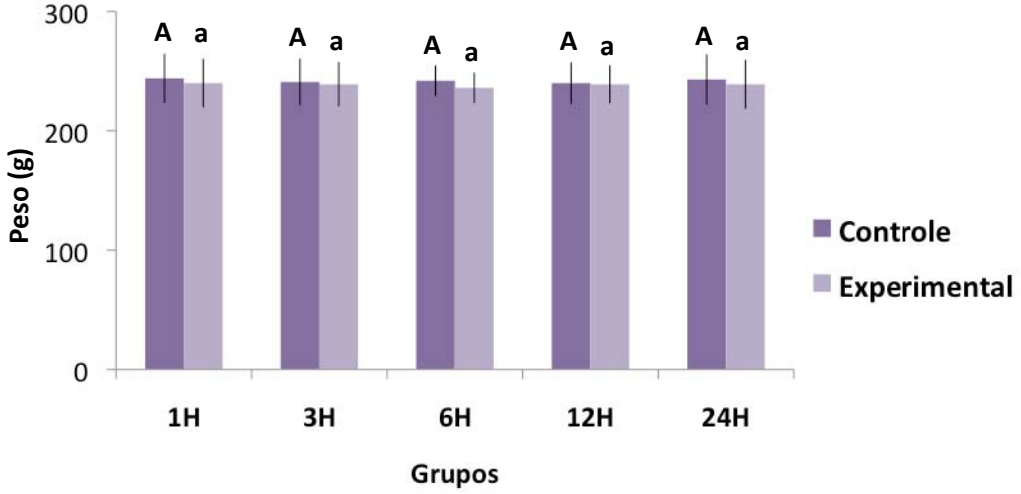

Figura 5.2 – Média do peso corporal dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

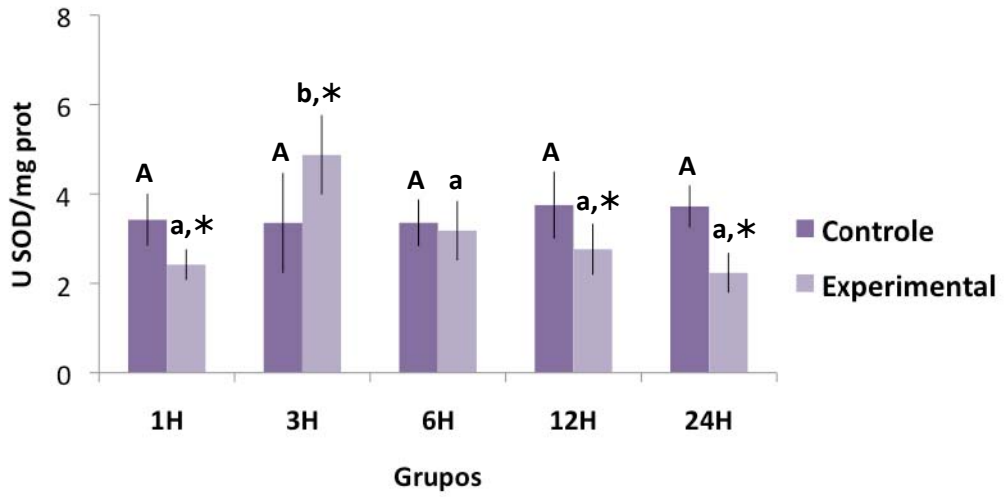

Figura 5.3 – Atividade específica da enzima superóxido dismutase da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

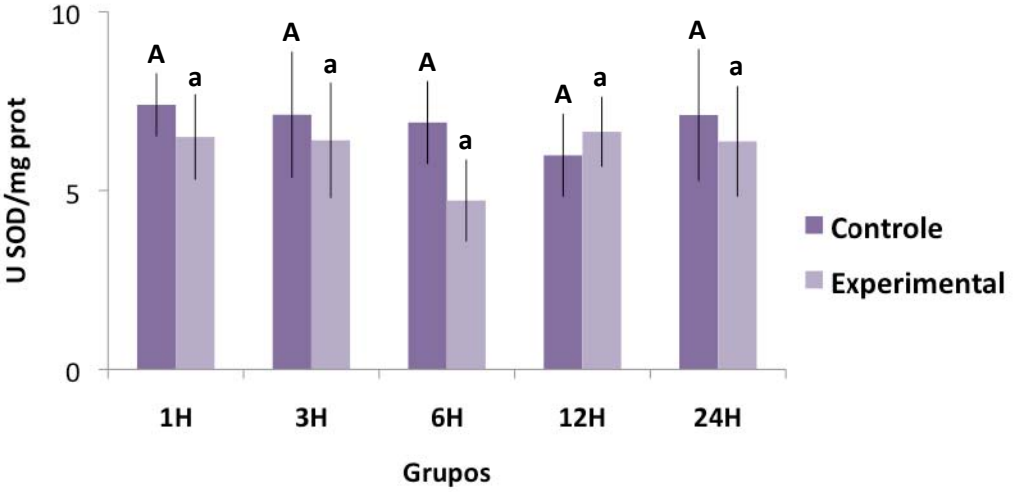

Figura 5.4 – Atividade específica da enzima superóxido dismutase da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

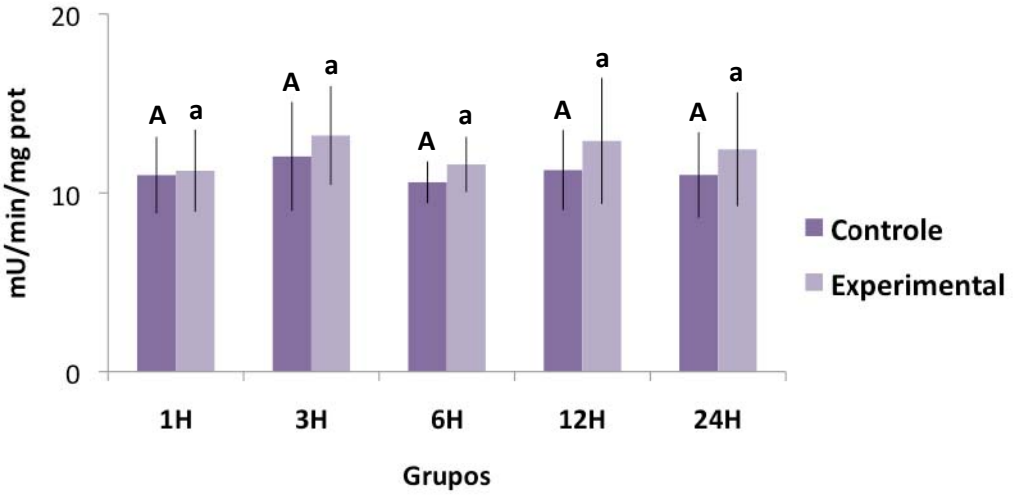

Figura 5.5 – Atividade específica da enzima catalase da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

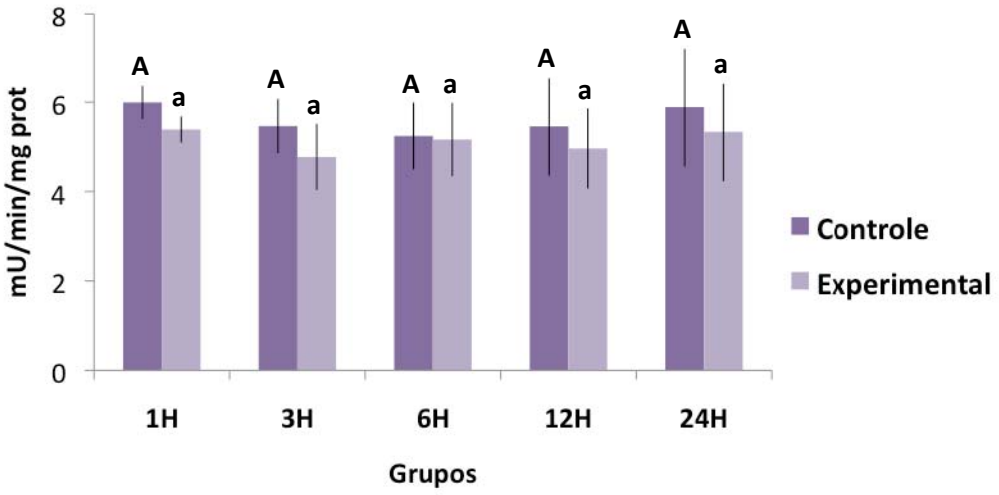

Figura 5.6 – Atividade específica da enzima catalase da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

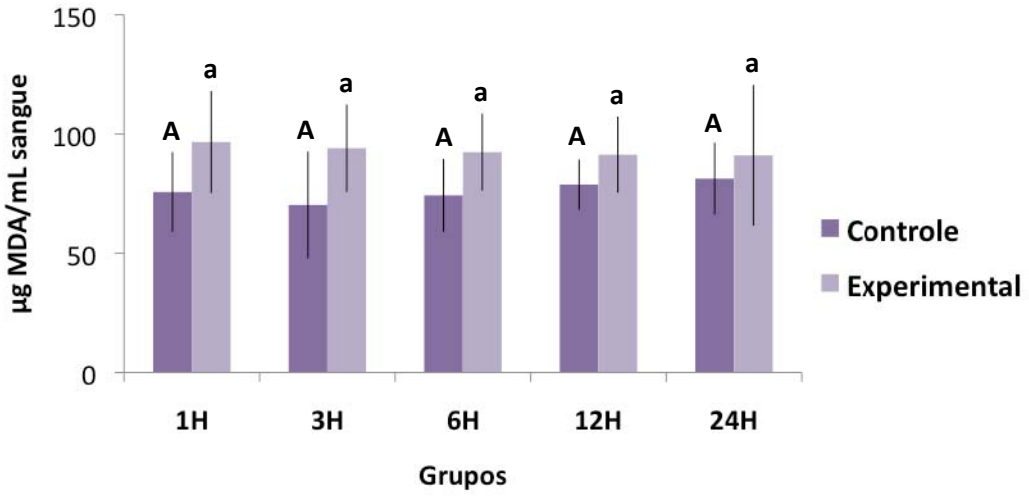

Figura 5.7 – Concentração média de malondialdeído nas amostras de sangue dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

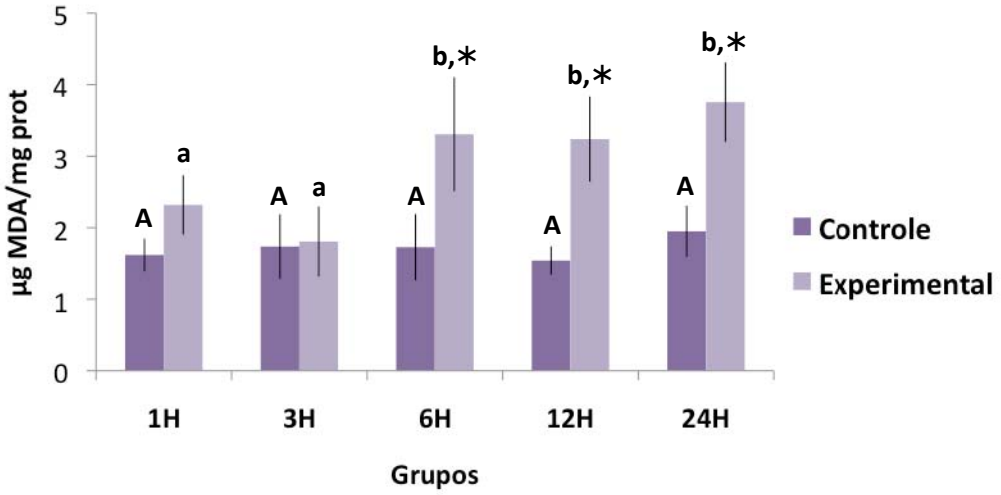

Figura 5.8 – Concentração média de malondialdeído da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

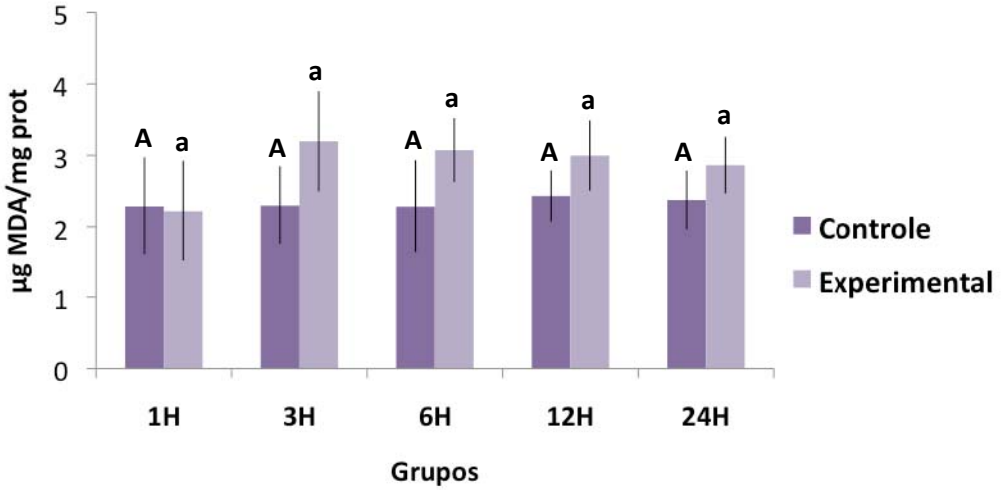

Figura 5.9 – Concentração média de malondialdeído da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

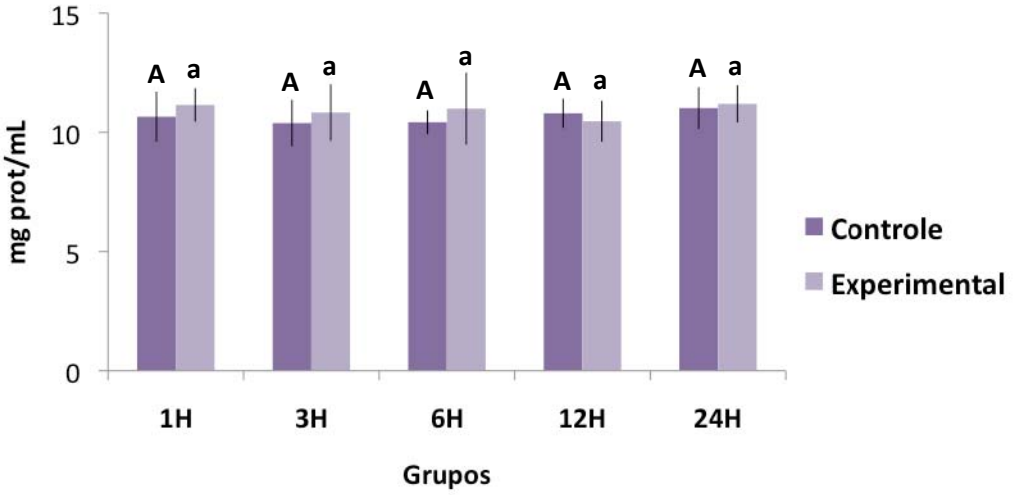

Figura 5.10 – Concentração de proteína total da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

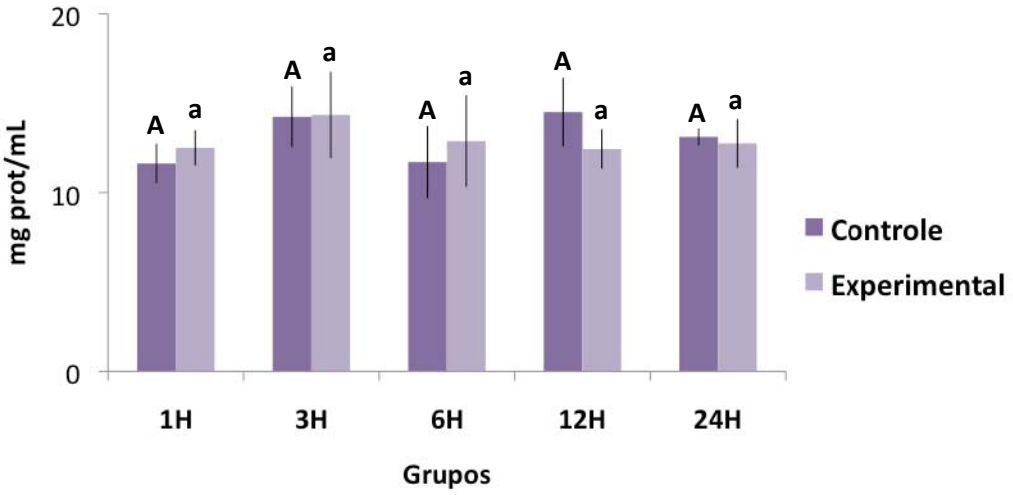

Figura 5.11 – Concentração de proteína total da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes tempos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

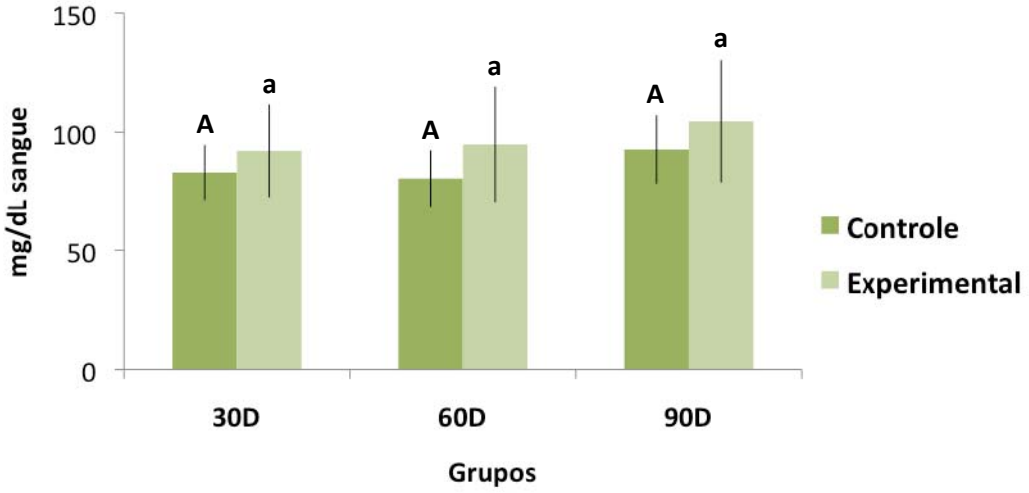

Figura 5.12 – Glicemia dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

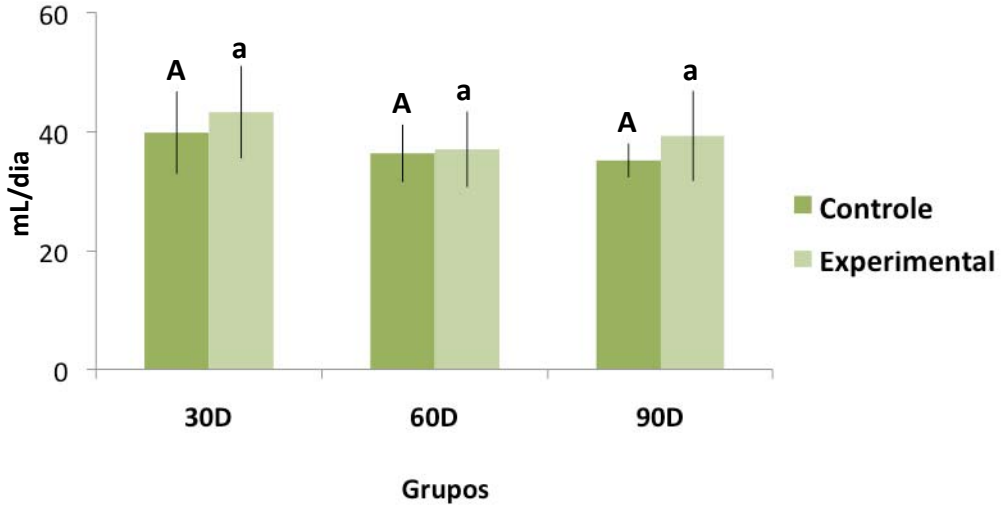

Figura 5.13 – Consumo diário de água dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

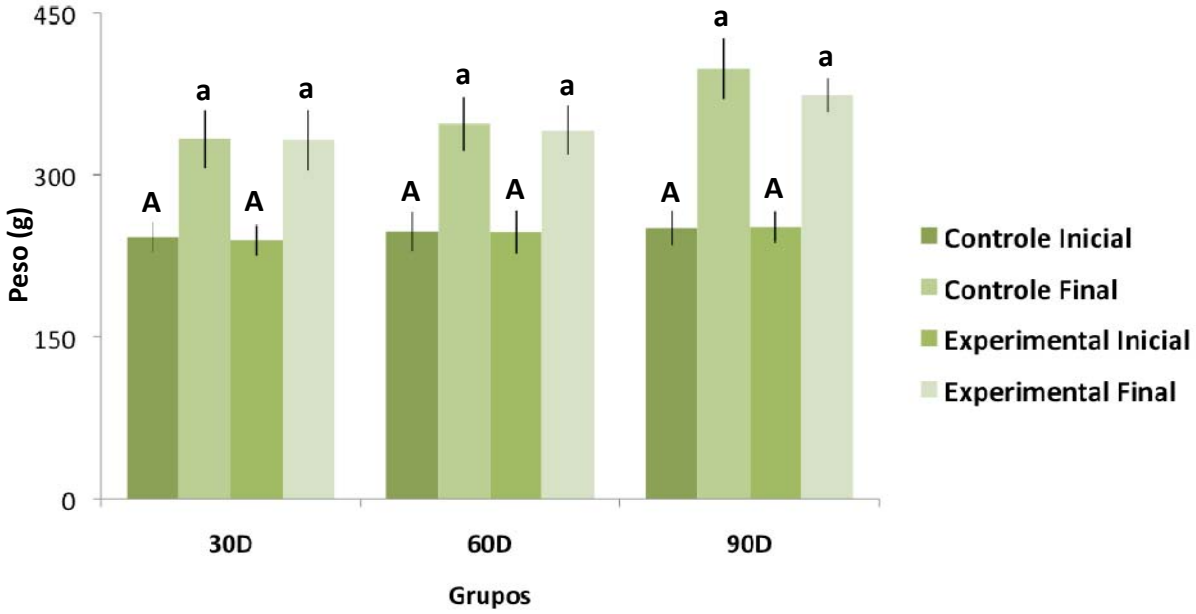

Figura 5.14 – Média do peso corporal inicial e final dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante, comparando-se o grupo controle e experimental inicial (ou final) no mesmo período experimental ($p < 0,05$)

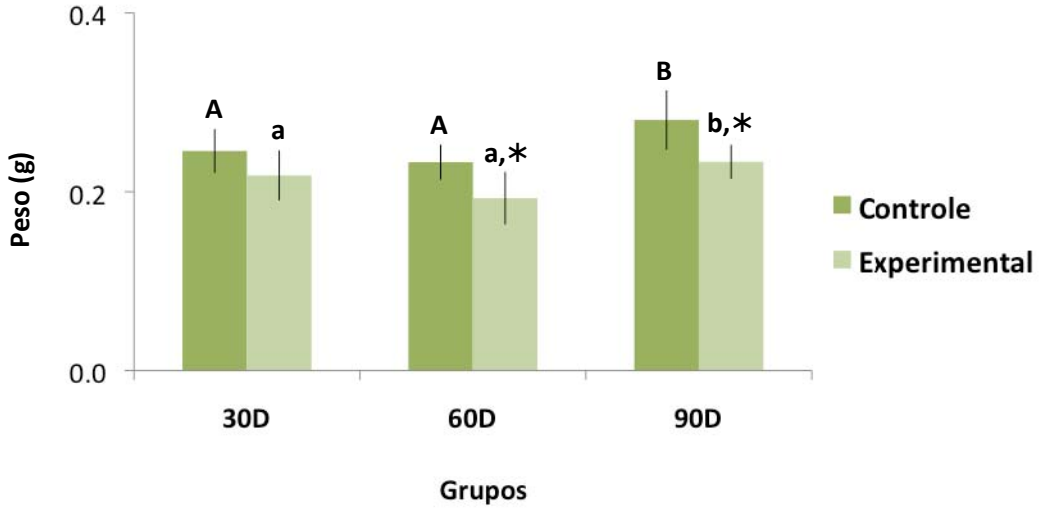

Figura 5.15 – Peso glandular médio da submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo período experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

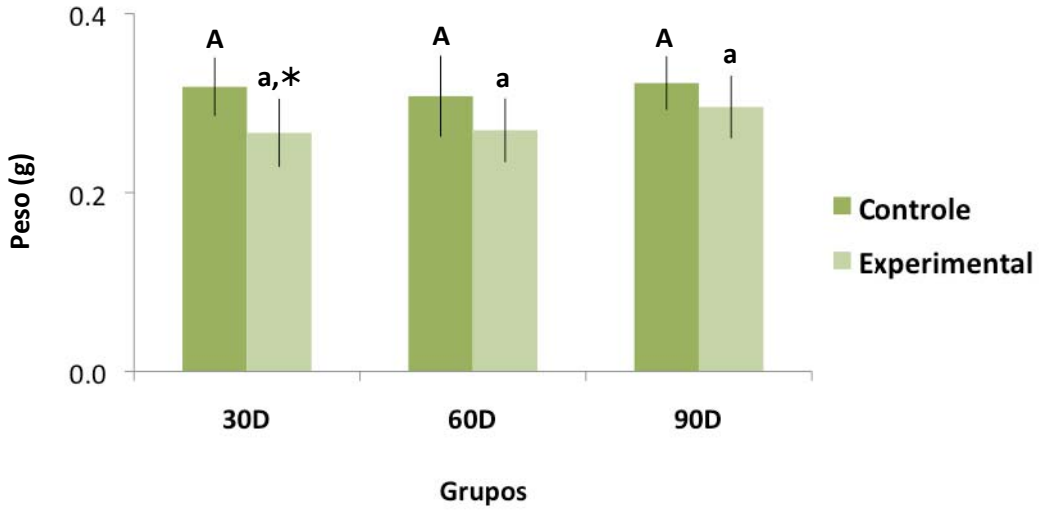

Figura 5.16 – Peso glandular médio da parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo período experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

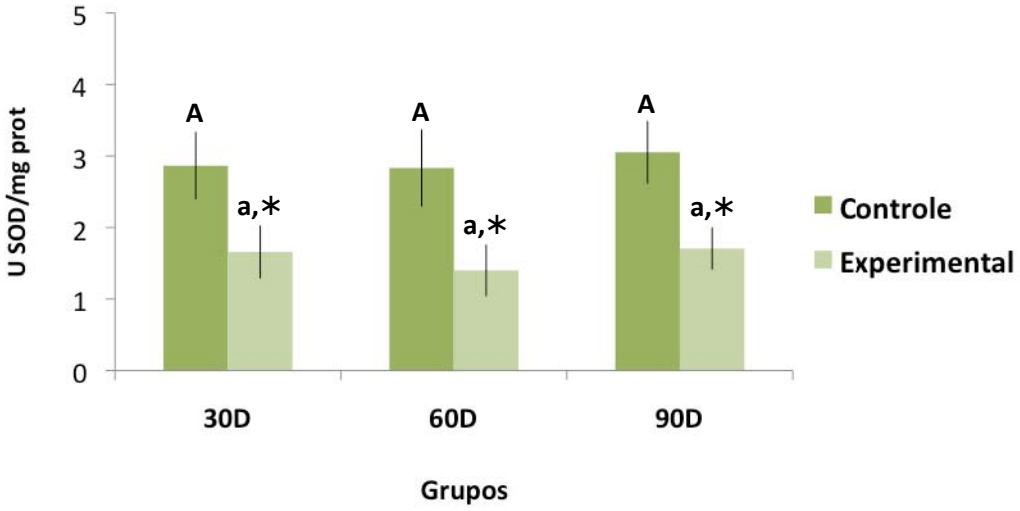

Figura 5.17 – Atividade específica da enzima superóxido dismutase da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes períodos experimentais ($p < 0,05$)

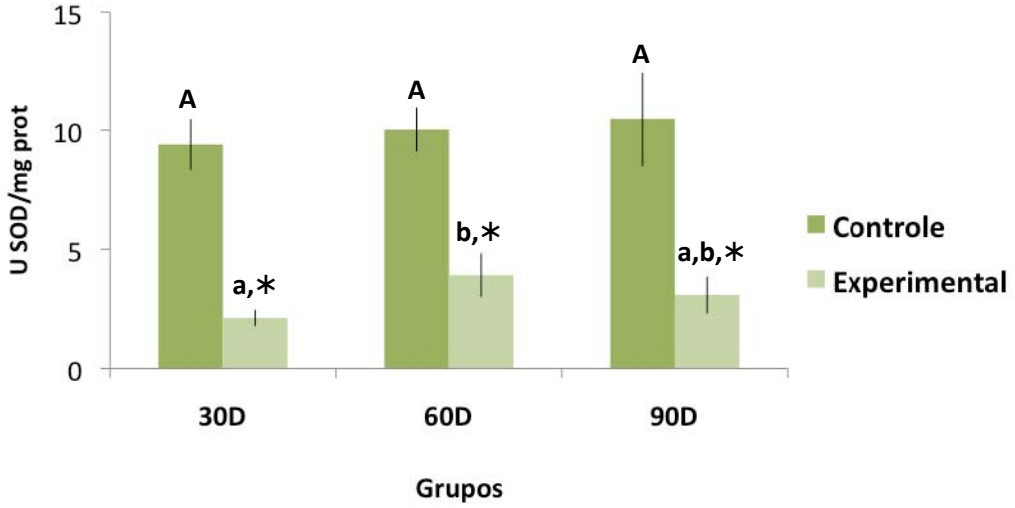

Figura 5.18 – Atividade específica da enzima superóxido dismutase da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes períodos experimentais ($p < 0,05$)

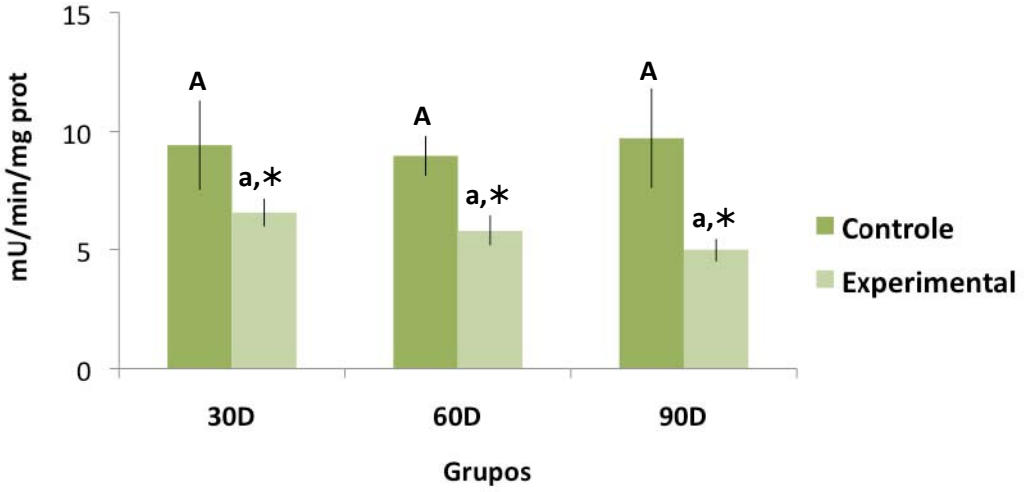

Figura 5.19 – Atividade específica da enzima catalase da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes períodos experimentais ($p < 0,05$)

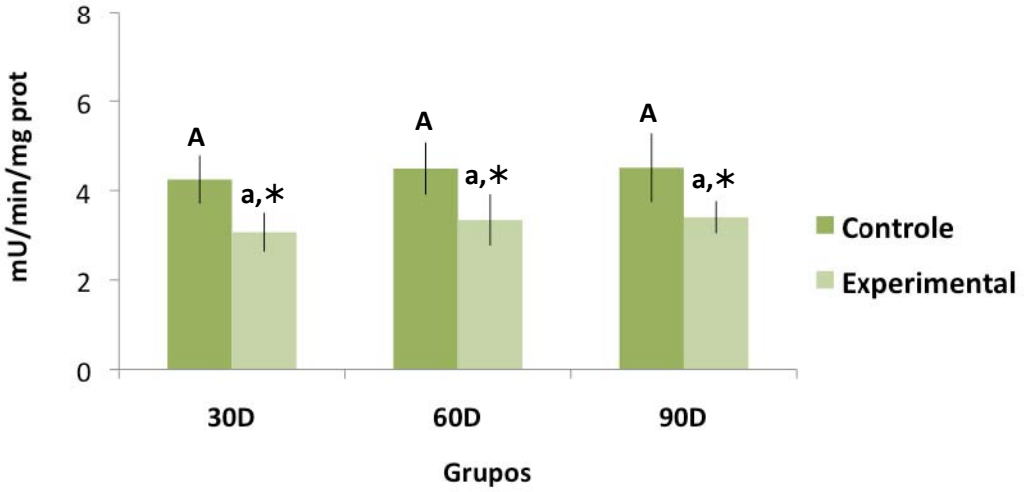

Figura 5.20 – Atividade específica da enzima catalase da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes períodos experimentais ($p < 0,05$)

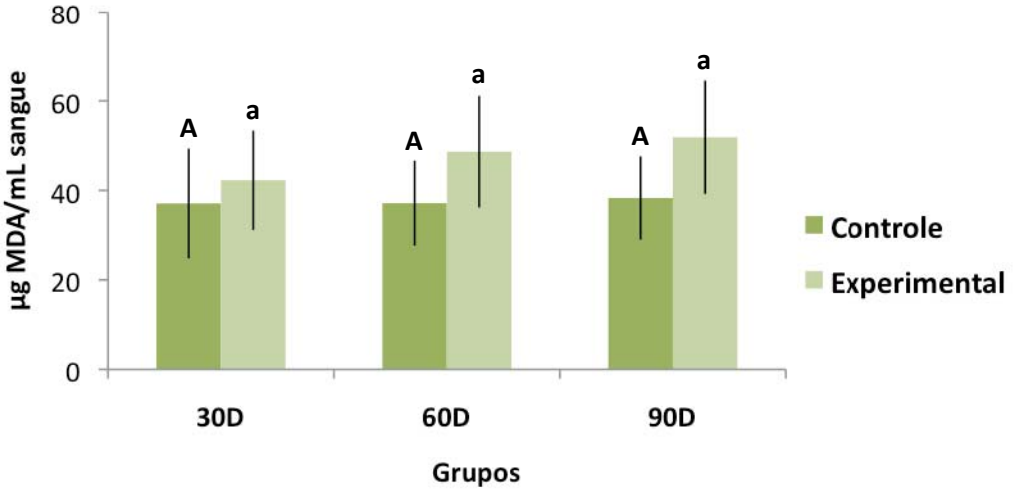

Figura 5.21 – Concentração média de malondialdeído nas amostras de sangue dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

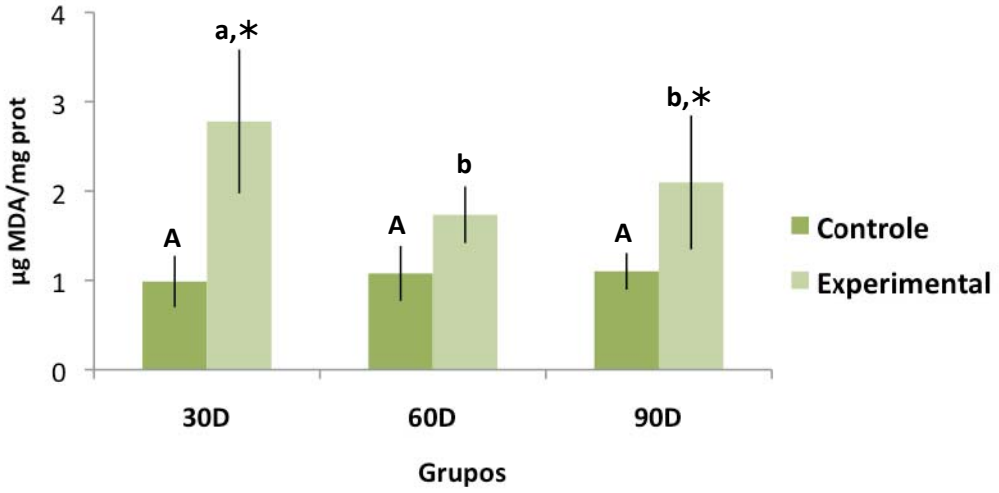

Figura 5.22 – Concentração média de malondialdeído da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

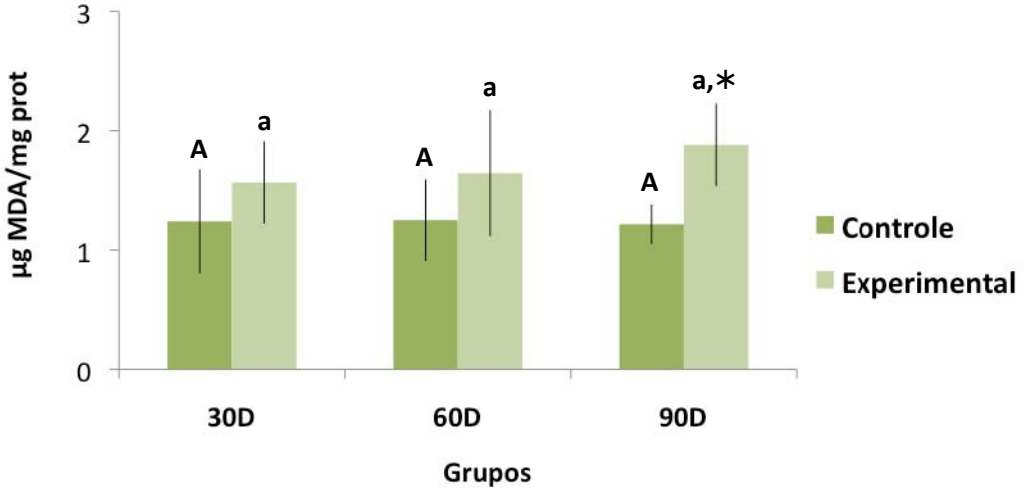

Figura 5.23 – Concentração média de malondialdeído da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

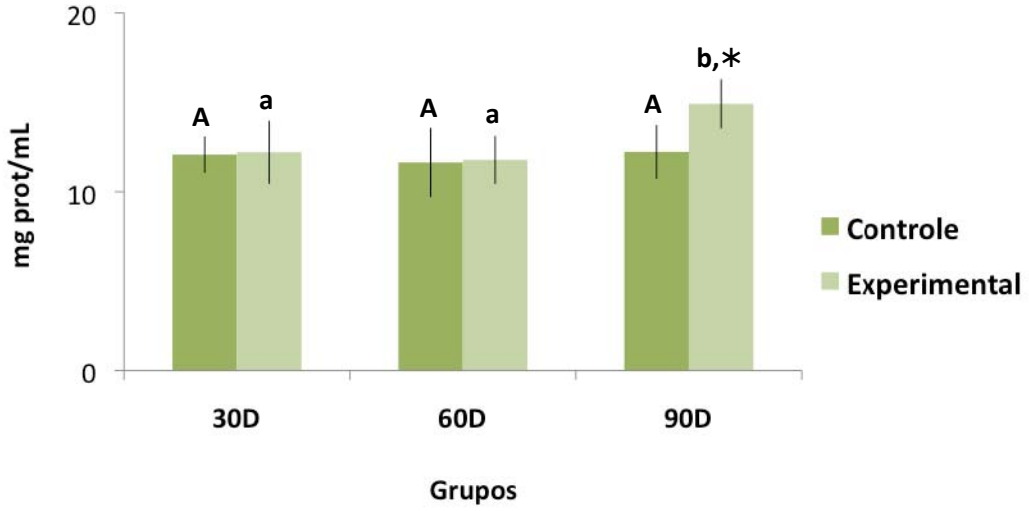

Figura 5.24 – Concentração de proteína total da glândula submandibular dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

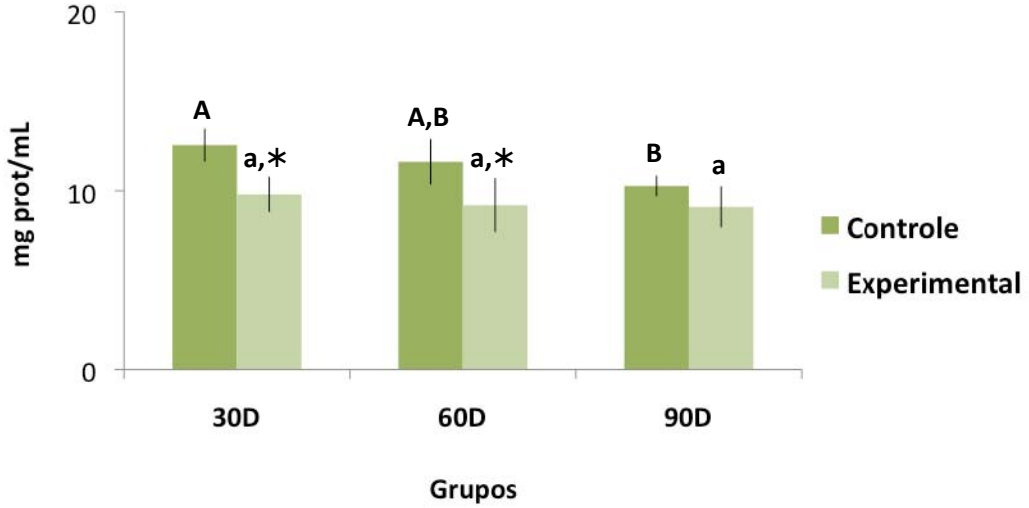

Figura 5.25 – Concentração de proteína total da glândula parótida dos grupos estudados, controle e experimental, nos diferentes períodos experimentais. As colunas indicam os valores médios e as barras, o desvio padrão (n=10). O ∗ indica diferença significativa comparando os grupos controle e experimental no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ou minúsculas) diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre as colunas, comparando o grupo controle (ou experimental) em diferentes tempos experimentais ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou investigar a susceptibilidade das glândulas salivares SM e PA de ratos frente ao estresse oxidativo induzido pela ingestão em excesso de NaF através de um experimento agudo e outro a longo termo. No experimento agudo foi utilizada uma dose única de 15 mg F^-/kg p.c., administrada intraperitonealmente ao longo de um período de 24 horas, enquanto que no experimento a longo termo, os animais receberam 100 ppm F^- adicionados a água de beber por 30, 60 e 90 dias.

O F pertence ao grupo de elementos conhecidos como halogênios. Os halogênios estão distribuídos na natureza e têm como característica grande afinidade eletrônica, combinando-se rapidamente com outros elementos e, por isso, são raramente encontrados em estado livre na natureza (VAN RENSBURG, 1979). Desta forma, o F se encontra amplamente distribuído e está presente virtualmente em todos as plantas e animais e, consequentemente, nos alimentos e na água (BUZALAF, 2008; OMS, 2000). Após ser ingerido, ele é rapidamente absorvido pelo trato gastro-intestinal e se distribui rapidamente pelo organismo através do plasma de diversas maneiras: (a) incorporação aos tecidos mineralizados; (b) distribuição nos fluidos intersticial e extracelular, atingindo os tecidos moles e (c) excreção renal, fecal e, em menor quantidade, por fluídos como suor e saliva (WHITFORD, 1989).

As glândulas salivares são importantes órgãos secretórios para a manutenção da saúde oral e sistêmica (MATHISON, 1995; NOGUEIRA et al., 2005).

São poucos os relatos na literatura a respeito da toxicidade do F em glândulas salivares e, até o momento, nenhum estudo foi realizado investigando

alterações em parâmetro oxidativos nas glândulas salivares provocadas por este íon, sendo esta a proposição deste estudo.

A hiperglicemia subsequente à administração de F foi relatada por vários autores (ALLMANN; KLEINER, 1980; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2004; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2005; MCGOWN; SUTTIE, 1977; RAPP, 1950; WHITFORD; ALLMANN; SHAHED, 1987) e confirmada neste trabalho. Handler (1945) e Handler, Herring e Hebb (1946) relataram a hiperglicemia como resultado da intoxicação subcutânea aguda com F em coelhos e ratos, respectivamente. Allmann e Kleiner (1980) e Grucka-Mamczar et al. (2005) observaram um aumento por volta de 40 a 50% na glicemia de ratos tratados com uma única dose i.p. de NaF, nas concentrações de 15 e 35 mg F^-/kg p.c., respectivamente. Em nosso experimento agudo, ocorreu uma hiperglicemia transitória, com um pico após 3 horas da injeção com NaF, chegando a valores próximos do grupo controle após 24 horas. O mesmo comportamento foi observado por Motta (1993), onde a administração i.p. de NaF (10 mg F^-/kg p.c.) provocou hiperglicemia em ratos após 3 horas, retornando à valores semelhantes ao controle após 6 horas. Sabe-se que o F inibe enzimas catalisadoras de reações chaves no metabolismo de carboidratos (HODGE; SMITH, 1965) e, pelo fato que a oxidação de carboidratos tem papel fundamental na produção de energia, pode-se dizer que esta interferência seja conseqüência da intoxicação aguda. Já no experimento a longo termo, houve um aumento da glicemia no grupo experimental que foi independente da duração do tratamento com o NaF. O F, em diferentes concentrações, adicionado à água de beber provocou aumento da glicemia em ratos quando foi administrado por períodos prolongados (GRUCKA-MAMCZAR et al., 1997; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2004). Este aumento na glicose sangüínea provocado pelo F pode estar relacionado ao aumento da concentração de

AMPc, promovendo o aumento da mobilização dos estoques de glicogênio (MCGOWN; SUTTIE, 1977; WHITFORD; ALLMANN; SHAHED, 1987); liberação de epinefrina, considerada um hormônio hiperglicemiante (MCGOWN; SUTTIE, 1977); ativação/inibição de enzimas do metabolismo de carboidratos, como, hexoquinase, fosfofrutoquinase-1, enolase, piruvato quinase (DA MOTTA; DE SOUZA; NICOLAU, 1999; SARALAKUMARI; RAO, 1991); e apoptose celular provocada pela perda da capacidade de captação de glicose (OTSUKI et al., 2005).

O aumento da glicemia provoca um desequilíbrio osmótico, resultando num quadro de desidratação intra e extracelular que, clinicamente, pode provocar polidipsia (MANFREDI et al., 2004). Além disso, alguns autores sugerem que a ingestão de quantidades excessivas de F provoca polidipsia (SAUERBRUNN; RYAN; SHAW, 1965). Contudo, Priya et al. (1997) não encontrou nenhuma diferença em ratos tratados com 20 ppm de F^- na água por 31 dias, assim como Boros et al. (1998) em ratos tratados com 10 ppm de F^- na água por 21 dias. Já Al-Hiyasat, Elbetieha e Darmani (2000) observaram redução crescente da ingestão de água contendo 200, 400 e 600 ppm de F^-. Nossos resultados mostraram que a adição de 100 ppm de F^- na água de beber por 30, 60 e 90 dias não alterou o consumo de água pelos ratos do grupo experimental.

Alguns autores relatam que uma das consequências provocadas pela ingestão de F, em diferentes concentrações, é a perda de peso. Num estudo com ratas prenhas, foi observada a redução de 30% do peso dos animais tratados com 200 ppm de F^- na água de beber (AL-HIYASAT; ELBETIEHA, DARMANI; 2000). Em filhotes, cujas mães foram submetidas à baixas concentrações de F durante a gestação, houve 35% de redução do peso corporal em relação aos animais controle (TRABELSI; GUERMAZI; ZEGHAL, 2001). Em contrapartida, Boros et al. (1998) não

encontrou diferença no peso corpóreo de ratos tratados com 10 ppm de F^- por 21 dias. Nossos experimentos a longo termo não observaram alterações no peso corporal decorrentes da administração do F após 30, 60 e 90 dias, indicando que o F não modifiicou a evolução do peso dos animais. Embora o F não tenha promovido alterações no peso dos animais, este efeito pôde ser observado nos tecidos periféricos, nas glândulas salivares SM e PA. Na glândula SM, esta redução foi mais acentuada nos primeiros 30 dias e, na glândula PA, após 90 dias de tratamento com o F. Relatos na literatura são contraditórios e descrevem que o F provocou o aumento do peso de ovários de ratas (AL-HIYASAT; ELBETIEHA; DARMANI, 2000); assim como a redução do peso em cérebro e cerebelo de camundongos (TRABELSI; GUERMAZI; ZEGHAL, 2001), como também, nenhuma alteração no peso dos rins de ratos (BOROS et al., 1998). Os autores sugerem que o excesso de F influencia os diferentes órgãos e seus processos metabólicos de maneiras diferentes.

O O_2 é um potente agente oxidante e relativamente inerte, podendo ser misturado ao hidrogênio, um forte agente redutor (BAYNES; DOMINICZAK, 2000). A redução biológica do O_2 gera produtos denominados espécies reativas de oxigênio, EROs, que compreendem ao radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) , o radical hidroperoxil ($HO_2^{\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$).

O O_2, no seu estado molecular, apresenta dois elétrons desemparelhados. A interação do O_2 com um par de elétrons de origem exógena é, entretanto, confrontada com a restrição de spins, peculiar a este composto. Dessa forma, as reações oxidativas do O_2 procedem através da adição de apenas um elétron por vez e envolve a formação de intermediários citados anteriormente, as EROs (FRIDOVICH, 1972).

As células apresentam uma grande variedade de respostas quando expostas à ação das EROs, que vão desde o aumento da proliferação, prevenção da divisão celular, senescência (processo natural de envelhecimento), até morte celular provocada por necrose, apoptose ou ambos. Isso, de certa forma, depende da resposta específica de cada tipo celular que é influenciada por receptores de membrana, mecanismos de transdução de sinal e dos níveis de defesa antioxidante (HALLIWELL, 2007).

As EROs produzidas no metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação das enzimas SOD, GPx e CAT (ABDALLA, 1993).

A SOD se encontra amplamente distribuída em organismos aeróbios e, os mamíferos possuem três diferentes isoformas, localizadas em diferentes compartimentos celulares, todas capazes de eliminar eficientemente $O_2^{\bullet -}$ (AUGUSTO, 2006). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1968). A GPx é uma enzima que apresenta selênio na sua estrutura e cataliza a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela GSH para formar a glutationa oxidada (GSSG) e água (ou álcoois). A continuidade do ciclo catalítico da GPx depende da redução da GSSG pela enzima glutationa redutase, que utiliza NADPH formado pela via das pentoses (ABDALLA, 1993). A CAT é uma hemeproteína que apresenta especificidade pelo H_2O_2, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos e ter baixa afinidade pelo H_2O_2 em comparação com a GPx, a CAT seria mais importantes em condições nas quais ocorra a formação de altas concentrações de H_2O_2 (ABDALLA, 1993).

Relatos na literatura descrevem que a administração do F em diferentes concentrações provoca a redução da atividade da SOD no fígado (MITTAL; FLORA, 2006; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; ZHAN et al., 2005), rins (BLASZCZYK et al., 2008; MITTAL; FLORA, 2006; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; ZHAN et al., 2005), cérebro (VANI; REDDY, 2000), tireóide (ZHAN et al., 2005) e neurônios (ZHANG et al., 2007) assim como o aumento em osteoblastos (XU et al., 2008) e também, nenhuma alteração em eritrócitos (REDDY et al., 2003). Em nosso estudo, observamos que a administração do NaF, em ambos os experimentos, influenciou a atividade da SOD das glândulas salivares. No experimento agudo, em particular na glândula SM, notamos um aumento de 45,67% da atividade da enzima após 3 horas, sugerindo uma resposta adaptativa inicial da glândula ao F, seguida de uma queda na sua atividade em função do aumento das horas; já na glândula parótida, não foram observadas alterações. No experimento a longo termo, os resultados mostraram queda da atividade do grupo experimental em função da administração do F, tanto na glândula submandibular como na parótida.

No caso da CAT, a literatura apresenta dados controversos a respeito da influência do F na sua atividade. Alguns estudos relatam o aumento da atividade da CAT em eritrócitos (AKDOGAN et al., 2004) e osteoblastos (XU et al., 2008), assim como a diminuição nos rins (BLASZCZYK et al., 2008; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004), soro (ZHAN et al., 2005) e fígado (SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004) ou nenhuma alteração no fígado (MITTAL; FLORA, 2006), rins (MITTAL; FLORA, 2006) e eritrócitos (REDDY et al., 2003) de diferentes animais experimentais. No experimento agudo, o F provocou alterações na atividade da CAT do grupo experimental, em relação ao

grupo controle, independente do tempo decorrido da injeção; comportamento este observado tanto na glândula SM como na PA. Todavia, as respostas foram diferentes: observou-se um aumento da atividade da CAT no grupo experimental da glândula SM, enquanto que na PA, ocorreu a diminuição da atividade no grupo experimental. No experimento a longo termo, verificou-se a redução da atividade da CAT em ambas as glândulas, que foi mais acentuada na SM do que na PA.

De modo geral, os nossos resultados demonstraram que a exposição ao F por períodos prolongados provocou maiores alterações nas atividades da SOD e CAT do que o observado no experimento agudo. Landis e Tower (2005) sugerem que a habilidade das células detoxificarem as EROs e substituírem as macromoléculas danificadas oxidativamente é aparentemente ineficiente ao longo do tempo, pois ocorre acúmulo de produtos resultantes de danos oxidativos. Já Rzeuski, Chlubek e Machoy (1998) acreditam que as altas concentrações de F provocariam a inativação da SOD promovendo o acúmulo de grande quantidade de radicais livres e peróxidos resultando no dano celular. Por outro lado, a diminuição da atividade da SOD pode ser atribuída a uma ação direta do F sobre a enzima que atua como um inibidor competitivo (LAWSON; YU, 2003), e não pelo aumento da geração de radicais livres proporcionado por seus efeitos tóxicos (CHLUBEK et al., 2003). Bray et al. (1974) sugerem que o H_2O_2 pode provocar a inativação da SOD, sendo importante, portanto a presença da CAT. Além disso, os níveis elevados dos danos oxidativos podem ser conseqüentes não apenas do aumento de espécies pró-oxidativas, mas também de falhas no sistema de reparo e substituição (HALLIWELL, 2007).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio celular no qual os oxidantes predominam sobre os antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo

(AUGUSTO, 2006). A peroxidação lipídica é a resposta mais comum ao estresse oxidativo mediado por radicais livres e pode ser estimada pela concentração de MDA. O F provocou o aumento no conteúdo de MDA dos animais experimentais em ambas as amostras sanguineas e glandulares. No experimento agudo, destacamos o aumento expressivo de MDA após 6, 12 e 24 horas na glândula SM. No experimento a longo termo, a peroxidação lipídica foi mais acentuada no grupo experimental de 30 dias na glândula SM, enquanto que, na glândula PA, este aumento foi observado principalmente no grupo experimental de 90 dias. Uma outra informação interessante é que a concentração de MDA nas amostras de sangue foi, aproximadamente, 30 vezes maior do que a encontrada nas amostras glandulares, refletindo o efeito do F nesses tecidos. Esses dados corroboram com os achados de muitos autores (BLAZCZYK et al., 2008; GUO; SUN; SUN, 2003; INKIELEWICZ; KRECHNIAK, 2004; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; ZHAN et al., 2005).

Com relação ao conteúdo de proteína total, não foram encontradas diferenças na glândula SM, nem na PA no experimento agudo. Já no experimento a longo termo, houve um aumento na concentração de proteína total na glândula SM após 90 dias da ingestão do F e, na glândula parótida, este aumento ocorreu nos grupos experimentais de 30 e 60 dias, chegando próximos aos valores do grupo controle no grupo de 90 dias. Verma e Sherlin (2002) observaram redução no conteúdo de proteínas do plasma tanto de ratas lactantes como de seus filhotes que foram tratadas com NaF via oral (40 mg/kg p.c./dia) por 30 dias. Sobre esse aspecto, as proteínas que apresentam sítios ligantes para metais, em especial, para o ferro e o cobre também podem ser consideradas antioxidantes. Dentre essas proteínas podemos destacar a transferrina, a ceruloplasmina, a lactoferrina e a albumina. Por

exemplo, o ferro ligado a transferrina ou lactferrina, não catalisa a formação do radical hidroxil e não promove peroxidação lipídca; a albumina apresenta sítios de ligação para o cobre, inibindo a peroxidação lipídica (ABDALLA, 1993).

Até o momento, o mecanismo de ação do F no organismo é desconhecido. O F pode alterar o metabolismo celular através de modificações funcionais ou prejudicando o seu funcionamento. Muitos estudos descreveram os efeitos tóxicos do F nos tecidos moles, porém os dados são inconclusivos e muito controversos. Otsuki et al. (2005) sugerem que o F promove a apoptose celular, através da perda do potencial da membrana mitocondrial e fragmentação do DNA. Chlubek (2003a) observou que baixas concentrações de F estimulam a peroxidação lipídica, enquanto que altas, atuam como inibidor da geração de MDA. Reddy et al. (2003) relatou que a toxicidade do F não está diretamente ligada ao estresse oxidativo em si; é mais um efeito secundário do que a causa primária. Em contrapartida, Gardner e Fridovich (1991) sugerem que mesmo na ausência da SOD, o F promoveria a proteção de células vivas contra a ação das EROs. E para complementar, não existem relatos na literatura sobre o estresse oxidativo provocado pelo F em glândulas salivares.

Nossos resultados demonstram a dificuldade e a complexidade do estudo da toxicidade do F no estresse oxidativo. Também é importante ressaltar, que diversas variáveis podem influenciar as divergências entre os estudos, como dose, dieta, espécie, sexo e idade dos animais experimentais, via de administração, duração do período experimental, entre outros (WHITFORD, 1989). Os estudos in vitro, por exemplo, não consideram a complexidade dos mecanismos homeostáticos que ocorrem in vivo (RIBEIRO et al., 2004).

Os ratos são mais resistentes ao F do que ovelhas e coelhos (MONSOUR; KRUGER, 1985). Com relação à idade, ocorre maior incorporação de F nos tecidos ósseos dos animais mais jovens do que nos animais adultos, pelo fato que os cristalitos presentes no osso em desenvolvimento são pobremente organizados e não compactados em comparação ao osso maduro, o que lhes confere uma área superficial muito maior para a rápida incorporação de F (BUZALAF, 2008; WHITFORD, 1989). Ratos mais jovens, de ambos os sexos, são mais resistentes do que os mais velhos; assim como as fêmeas, que são menos resistentes do que os machos da mesma idade (HODGE; SMITH, 1965).

Vale a pena lembrar que, a forma de administração do F, também é um importante fator contribuinte para sua absorção. Quando um composto solúvel, como NaF, é ingerido com água, 80 a 90% da quantidade do fluoreto ingerido é absorvido a partir do trato gastro-intestinal (WHITFORD, 1989). A dose de 100 ppm F adicionada a àgua de beber é considerada alta e tóxica o suficiente para produzir sinais de fluorose dentária clinicamente detectáveis (SMITH; NANCI; DENBESTEN, 1993).

Em um estudo com cães, Leone, Geever e Moran (1956) apontam que a dose de F administrada intravenosamente para produzir efeitos tóxicos agudos é elevada (DL_{50} = 20 mg/kg p.c.) e que os efeitos fisiológicos e patológicos observados foram semelhantes aos relatados nos casos de envenenamento por F em humanos (LIDBECK; HILL; BEEMAN, 1943). A dose de 15 mg F^-/kg p.c. é considerada relativamente alta e subtóxica e foi escolhida por demonstrar, em estudos anteriores com ratos, o aumento nas concentrações de AMPc após 30 e 60 minutos nas glândulas submandibulares (ALLMANN; KLEINER, 1980); redução da atividade da α-amilase em glândula parótida (SHAHED; BONDI; ALLMANN, 1985), além de,

hiperglicemia (ALLMANN; KLEINER, 1980). Os valores da DL_{50} estabelecidos para ratos machos tratados com NaF, via i.p., variam de 85,5 a 98,0 mg F^-/kg (WHITFORD, 1989).

A saliva é produzida principalmente pelas glândulas maiores SM e PA. As glândulas diferem no tipo de secreção produzida, o que depende da proporção das células acinares mucosas e serosas (NICOLAU, 2008; SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). A glândula SM é uma glândula mista, que apresenta túbulos mucosos e semiluas serosas em sua composição. A glândula PA é composta principalmente por células acinosas serosas (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; NICOLAU, 2008; SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). Além de diferenças histológicas e fisiológicas, as glândulas SM e PA apresentam diferenças metabólicas: a glândula PA tem seu metabolismo predominantemente aeróbico, enquanto que na SM, é predominantemente anaeróbico (NICOLAU; SASSAKI, 1967).

Nagler et al. (2002) observaram que a saliva da PA apresentava níveis mais elevados de componentes salivares e enzimas antioxidantes do que a saliva da SM.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo podemos concluir que o F:

- Aumentou a concentração de glicose sangüínea nos grupos experimentais das glândulas SM e PA no experimento agudo e a longo termo;
- Com relação ao sistema antioxidante, representado pelas enzimas SOD e CAT neste trabalho, o F alterou a atividade de ambas enzimas, tanto no experimento agudo, como no experimento a longo termo. Entretanto, as alterações foram mais pronunciadas no experimento a longo termo.
- Com relação à peroxidação lipídica, houve aumento dos níveis de MDA nas glândulas SM e PA em ambos protocolos experimentais. Os níveis de MDA no sangue foram, aproximadamente, de 20 a 30 vezes mais elevados do que os encontrados nos tecidos glandulares.
- Com relação ao conteúdo de proteína total, foram observadas alterações nas concentrações das glândulas SM e PA no experimento a longo prazo.

REFERÊNCIAS[1]

Abdalla DSP. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. Ars Cvrandi 1993;26(10):141-64.

Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121-6.

Akdogan M, Eraslan G, Gultekin F, Sahindokuyucu F, Essiz D. Effects of fluoride on lipid peroxidation in rabbits. Fluoride 2004;37(3):185-9.

Al-Hiyasat AS, Elbetieha AM, Darmani H. Reproductive toxic effects of ingestion of sodium fluoride in female rats. Fluoride 2000;33(2):79-84.

Allmann DW, Kleiner HS. Effect of NaF on rat tissue cAMP levels in vivo. Pharmacol Ther Dent 1980;5(3-4):73-8.

Allmann DW, Shahed AR. The effect of NaF on salivary gland function. Dtsch Zahnarztl Z 1987;42(10 Suppl 1):S95-8.

Antonyuk SV, Strange RW, Marklund SL, Hasnain SS. The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 A resolution: insights into heparin and collagen binding. J Mol Biol 2009;388(2):310-26.

Armstrong WD, Singer L. Fluoride tissue distribution: intracellular fluoride concentrations. Proc Soc Exp Biol Med 1980;164:500-6.

Augusto O. Radicais livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de textos; 2006.

Barroso AS, Quissell DO, Colepicolo P. Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. Arch Oral Biol 2003;48(2):133-9.

Baynes J, Dominiczak MH. Bioquímica Médica. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole; 2000.

[1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 1952;195(1):133-40.

Bergmeyer HU, Bernt E. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed. Verlag Chemie Weinheim/Academic Press; 1974.

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.

Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF, Hallewell RA, Tainer JA. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. Cell 1992;71(1):107-18.

Boros I, Keszler P, Csikos G, Kalasz H. Fluoride intake, distribution, and bone content in diabetic rats consuming fluoridated drinking water. Fluoride 1998;31(1):33-42.

Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. Biochem J 1974;139(1):43-8.

Burt BA. Fifty years of water fluoridation. Br Dent J 1995;178(2):49-50.

Buzalaf MAR. Fluoretos e Saúde Bucal. 1st ed. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2008.

Buzalaf MAR, Cury JA, Whitford GM. Fluoride exposures and dental fluorosis: a literature review. Rev Fac Odontol Bauru 2001;9(1/2):1-10.

Centers for Disease Control and Prevention. Recomendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. Morbid Mortal Weekly Rev 2001;50:1-42.

Chlubek D. Fluoride and oxidative stress. Fluoride 2003a;36(4):217-28.

Chlubek D. Fluoride in Medicine, Biology and Toxicology. 1st ed. Warsaw: Katedra i Zaklad Biochemii i Chemii Pomorskiej Akademii Medycznej; 2003b.

Chlubek D, Grucka-Mamczar E, Birkner E, Polaniak R, Stawiarska-Pieta B, Duliban H. Activity of pancreatic antioxidative enzymes and malondialdehyde concentrations in rats with hyperglycemia caused by fluoride intoxication. J Trace Elem Med Biol 2003;17(1):57-60.

Comporti M. Lipid Peroxidation. An overview. In: Free radicals: from basic science to Medicine. Basel:Birkhauser Verlag; 1993. p. 65-79.

da Motta MV, de Souza DN, Nicolau J. Effects of subtoxic doses of fluoride on some enzymes of the glucose metabolism in submandibular salivary glands of fed and overnight-fasted rats. Fluoride 1999;32(1):20-6.

Dean HT. Endemic Fluorosis and Its Relation to Dental Caries. Public Health Rep 1938;53(33):1443-52.

de Lopez OH, Smith FA, Hodge HC. Plasma fluoride concentrations in rats acutely poisoned with sodium fluoride. Toxicol Appl Pharmacol 1976;37(1):75-83.

Duxbury AJ, Leach FN, Duxbury JT. Acute fluoride toxicity. Br Dent J 1982;153(2):64-6.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990;186:407-21.

Fagin D. Second thoughts about fluoride. Sci Am 2008;298(1):74-81.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med 2003;35(3):236-56.

Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in Dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. Acc Chem Res 1972;5(10):321.

Gardner PR, Fridovich I. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. J Biol Chem 1991;266(29):19328-33.

Grimberg GW. Double-blind test for determination of intolerance to fluoridated water. Fluoride 1974;7(3):146-52.

Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quim Nova 2009;32(1):169-74.

Grucka-Mamczar E, Birkner E, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Chlubek D, Samujlo D, et al. Lipid balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. Fluoride 2004;37(3):195-200.

Grucka-Mamczar E, Birkner E, Zalejska-Fiolka J, Machoy Z. Disturbances of kidney function in rats with fluoride-induced hyperglycemia after acute poisoning by sodium fluoride. Fluoride 2005;38(1):48-51.

Grucka-Mamczar E, Machoy Z, Tarnawski R, Birkner E, Mamczar A. Influence of long-term sodium fluoride administration on selected parameters of rat blood serum and liver function. Fluoride 1997;30(3):157-64.

Guan ZZ, Yang PS, Yu ND, Zhuang ZJ. An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. Fluoride 1989;22(3):112-8.

Guan ZZ, Xiao KQ, Zeng XY, Long YG, Cheng YH, Jiang SF, et al. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. Arch Toxicol 2000;74:602-8.

Guo XY, Sun GF, Sun YC. Oxidative stress from fluoride-induced hepatotoxicity in rats. Fluoride 2003;36(1):25-9.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr Rev 1994;52(8 Pt 1):253-65.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans 2007;35(Pt 5):1147-50.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.

Handler P, Herring HE, Hebb JH. The effects of insulin in fluoride-poisoned rats. J Biol Chem 1946;164(2):679-83.

Hodge HC, Smith FA. Fluorine chemistry. New York: Academic Press; 1965.

Hohenegger M, Huber I, Echsel H, Skolek-Winnisch R, Vermes M. Metabolism of free fatty acids (FA) and triacylglycerol (TG) in acute and subacute fluoride intoxication of the rat. Arch Toxicol 1986;59(4):285-9.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent 2001;85(2):162-9.

Inkielewicz I, Krechniak J. Fluoride effects on glutathione peroxidase and lipid peroxidation in rats. Fluoride 2004;37(1):7-12.

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004.

Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81(14):4343-7.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem Sci 2007;32(1):44-50.

Kleiner HS, Miller A, Allmann DW. Effect of dietary fluoride on rat tissue 3'5'--cyclic AMP levels. J Dent Res 1979;58(9):1920.

Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech Ageing Dev 2005;126(3):365-79.

Lawson PB, Yu MH. Fluoride inhibition of superoxide dismutase (SOD) from the earthworm *Eisenia fetida*. Fluoride 2003;36(3):143-51.

Leone NC, Geever EF, Moran NC. Acute and subacute toxicity studies of sodium fluoride in animals. Public Health Rep 1956;71(5):459-67.

Li JX, Cao SR. Recent studies on endemic fluorosis in China. Fluoride 1994;27(3):125-8.

Lidbeck WL, Hill IB, Beeman JA. Acute sodium fluoride poisoning. JAMA 1943;121:826-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75.

Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. Oral Dis 2004;10(4):187-200.

Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. J Clin Invest 1984;74(4):1398-403.

Mathison M. The submandibular glands: a role in homeostasis and allostasis. Biomed Rev 1995;4:61-9.

McCord JM, Fridovich I. Reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. J Biol Chem 1968;243(21):5753-60.

McGown EL, Suttie JW. Mechanism of fluoride-induced hyperglycemia in rat. Toxic Appl Pharmacol 1977;40(1):83-90.

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.

Monsour PA, Kruger BJ. Effect of fluoride on soft-tissues in vertebrates. Fluoride 1985;18(1):53-61.

Motta MV. Efeitos do fluoreto de sódio no metabolismo de carboidratos em glândulas submandibulares de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1993.

Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. Neurotoxicol Teratol 1995;17(2):169-77.

Murray JJ, Rugg-Gunn AJ, Jenkins GN. Fluorides in Caries Prevention. 3rd ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1991.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. Free Radic Biol Med 2002;32(3):268-77.

Nicolau J. Fundamentos da Bioquímica Oral. 1ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2008.

Nicolau J, Sassaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. Arch Oral Biol 1976;21:659-61.

Nicolau J, Ribeiro DM. Metabolism of glycogen in submandibular glands of rats. Alteration by NaF. J Biol Buccale 1992;20(2):97-102.

Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. Clin Chim Acta 2005;353(1-2):133-9.

Otsuki S, Morshed SRM, Chowdhury SA, Takayama F, Satoh T, Hashimoto K, et al. Possible link between glycolysis and apoptosis induced by sodium fluoride. J Dent Res 2005;84(10):919-23.

Organização Mundial da Saúde. Fluorides. Environmental Health Criteria 227. Genebra:World Health Organization; 2002.

Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal Biochem 1986;154(2):536-41.

Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. Methods Enzymol 1990;186:209-20.

Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(13):6109-13.

Pillai KS, Mathai AT, Deshmukh PB. Effect of subacute dosage of fluoride on male mice. Toxicol Lett 1988;44(1-2):21-9.

Priya CAYB, Anitha K, Mohan EM, Pillai KS, Murthy PB. Toxicity of fluoride to diabetic rats. Fluoride 1997;30(1):51-8.

Punchard NA, Kelly FJ. Free radicals: a practical approach. New York: Oxford University Press; 1996.

Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. J Mol Biol 2000;296(1):295-309.

Rapp GW. The invivo effect of fluoride on carbohydrate metabolism. The effect on blood sugar levels. J Dent Res 1950;29(5):680.

Reddy GB, Khandare AL, Reddy PY, Rao GS, Balakrishna N, Srivalli I. Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. Toxicol Sci 2003;72(2):363-8.

Reid TJ, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78(8):4767-71.

Ribeiro DA, Marques MEA, de Assis GF, Anzai A, Poleti ML, Salvadori DMF. No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats. Caries Res 2004;28:576-9.

Robinson BH. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. J Inherit Metab Dis 1998;21(5):598-603.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993;362(6415):59-62.

Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z. Interactions between fluoride and biological free radical reactions. Fluoride 1998;31(1):43-5.

Saralakumari D, Rao PR. Red blood cell glucose metabolism in human chronic fluoride toxicity. Bull Environ Contam Toxicol 1991;47(6):834-9.

Sauerbrunn BJ, Ryan CM, Shaw JF. Chronic fluoride intoxication with fluorotic radiculomyelopathy. Ann Intern Med 1965;63(6):1074-8.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. Arch Oral Biol 2007;52:1114-35.

Shahed AR, Allmann DW. Effect of NaF on cAMP accumulation, cAMP-dependent protein kinase activity in, and amylase secretion from, rat parotid gland cells. J Dent Res 1988;67(2):462-6.

Shahed AR, Bondi J, Allmann DW. Effect of Naf on rat parotid gland amylase activity and cAMP concentration in vitro and in vivo. J Dent Res 1985;64(9):1126-9.

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. Studies on alterations in brain lipid metabolism following experimental fluorosis. Fluoride 1992;25(2):77-84.

Shayiq RM, Raza H, Kidwai AM. Fluoride and lipid peroxidation: a comparative study in different rat tissues. Bull Environ Contam Toxicol 1986;37(1):70-6.

Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Bhat PG, Rao SH. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. Fluoride 2001;34(2):108-13.

Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Bhat PG, Rao SH. Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. Fluoride 2002;35(3):197-203.

Singer L, Armstrong WD, Ophaug RH. Effects of acute fluoride intoxication on rats. Proc Soc Exp Biol Med 1978;157(3):363-8.

Singh M, Kanwar KC. Effect of fluoride on copper, manganese and zinc in bone and kidney. Bull Environ Contam Toxicol 1981;26(3):428-31.

Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. Anat Rec 1993;237:243-58.

Smith GE. A surfeit of fluoride. Sci Prog 1985; 69:429-42.

Soni MG, Kachole MS, Pawar SS. Alterations in drug metabolising enzymes and lipid peroxidation in different rat tissues by fluoride. Toxicol Lett 1984;21(2):167-72.

Spoerke DG, Bennett DL, Gullekson DJK. Toxicity related to acute low-dose sodium fluoride ingestions. J Fam Pract 1980;10(1):139-40.

Taylor JM, Maynard EA, Downs WL, Hodge HC, Smith FA, Scott JK, et al. Toxic effects of fluoride on rat kidney. 2. Chronic Effects. Toxic Appl Pharmacol 1961;3(3):290-314.

Trabelsi M, Guermazi F, Zeghal N. Effect of fluoride on thyroid function and cerebellar development in mice. Fluoride 2001;34(3):165-73.

van Rensburg BG. Metabolism of fluorides. J Dent Assoc S Afr 1979;34(3):163-6.

Vani ML, Reddy KP. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. Fluoride 2000;33(1):17-26.

Verma RJ, Sherlin DM. Hypocalcaemia in parental and F1 generation rats treated with sodium fluoride. Food Chem Toxicol 2002;40(4):551-4.

Vetrano AM, Heck DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. J Biol Chem 2005;280(42):35372-81.

Wang YN, Xiao KQ, Liu JL, Dallner G, Guan ZZ. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. Toxicology 2000;146(2-3):161-9.

Watson WA, Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Rodgers GC, Youniss J, Reid N, et al. 2003 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. Am J Emerg Med 2004;22(5):335-404.

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. 1st ed. Basel: S. Karger AG; 1989.

Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. J Dent Res 1990;69(Spec No):539-49.

Whitford GM, Allmann DW, Shahed AR. Topical fluorides: effects on physiologic and biochemical processes. J Dent Res 1987;66(5):1072-8.

Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. Trends Biochem Sci 2005;30(8):453-61.

Xu H, Wang CH, Zhao ZT, Zhang WB, Li GS. Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. Biol Trace Elem Res 2008;123:109-15.

Yolken R, Konecny P, Mccarthy P. Acute fluoride poisoning. Pediatrics 1976;58(1):90-3.

Zhan XA, Xu ZR, Li JX, Wang M. Effects of fluorosis on lipid peroxidation and antioxidant systems in young pigs. Fluoride 2005;38(2):157-61.

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.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
PROTOCOLO nº 01/06

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Estudo da administração do flúor e o estresse oxidativo em glândulas salivares de ratos",** de responsabilidade da pesquisadora **Paula Mochidome Yamaguti**, sob orientação do Professor Doutor **José Nicolau**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O.