

*Determinação do período de remoção do
flúor incorporado ao esqueleto de ratos após
exposição aguda*

Élide Escolástico Caroselli

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

BAURU
2006

*Determinação do período de remoção do flúor
incorporado ao esqueleto de ratos após
exposição aguda*

Élide Escolástico Caroselli

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de Biologia Oral.

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

BAURU
2006

Caroselli, Elide Escolástico

C222d Determinação do período de remoção do flúor incorporado ao esqueleto de ratos após exposição aguda / Elide Escolástico Caroselli -

Bauru, 2006.

87 p. : il. ; 31 cm.

Tese. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura do autor (a):

Data:

Comitê de Ética da FOB

No. Do Protocolo: 38/2003

Data: 07 de novembro de 2003

Élide Escolástico Caroselli

Nascimento

28 de março de 1979

Porto Alegre - RS

Filiação

Marli de Oliveira Escolástico

Ítalo Caroselli

1999 – 2003

Curso de Graduação - Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP– Bauru – SP

2005 – 2006

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha mãe, Marli de Oliveira Escolástico, pelo exemplo de vida, pelo carinho e amor incondicionais. Ao meu pai, Ítalo Caroselli por todo apoio que sempre me deu e à minha irmã Elena Escolástico Caroselli, pelo companheirismo. Ao meu avô Marino e à minha avó Isaura, por tudo que fizeram por nós enquanto estiveram por aqui.

AGRADECIMENTOS

À orientadora deste trabalho Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, por tantos anos de caminhada juntas, pela atenção nunca negada. Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes da Silva, exemplos de profissionalismo. À Vera Lucia Rufino Rosa, pelo carinho com que sempre nos auxiliou. Aos professores Antônio de Castro Rodrigues, Carlos F. dos Santos, Gerson F. Assis, Flavio A. C. Faria, José Mauro Granjeiro. Aos funcionários do Biotério, Erasmo, Wagner, Richard e Luís, por facilitarem a execução deste trabalho. Aos funcionários do Departamento de Dentística: “Sr. Nelson” e “S. Dito”. Às funcionárias da Pós-graduação Giane Tenório Quintela e Maria Margareth Pereira Mokarzel. Aos funcionários da biblioteca: Ademir, Valéria, Cibele, Roberto e Rita. Aos colegas do mestrado de Biologia Oral, turma de 2005, especialmente Flávia de Moraes Italiani, Tatiana de Almeida Furlani, Thiemy Kato e Cláudia Kobayashi e aos colegas do laboratório de bioquímica: Andrea Gutierrez Maria, Aline de Lima Leite, Irene Ramires, Juliane Carvalho, Juliano Pelin Pessan, Flavia Mauad Levy, Maria Heloisa Correa Rodrigues, Flavia Godoy Iano, Vivian Rocio, Heloisa A. B. da Silva. Aos companheiros da Faculdade de Odontologia de Bauru: Valéria Gelani, Eduardo Figueira, Tânia Mary Cestari, Danielle Santi Ceolin.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

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

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTE DE ABREVIATURAS.....	
RESUMO.....	
ABSTARCT.....	
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 O elemento flúor.....	23
2.2 Metabolismo e toxicidade do flúor	24
2.3 O flúor e os tecidos mineralizados	28
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	35
5 DOSAGENS DE FLÚOR	39
5.1 Plasma	39
5.2 Superfície óssea	43
5.3 Osso total	46
5.4 Fezes	47
5.5 Urina	48
5.6 Ração	49
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
7 RESULTADOS	53
8 DISCUSSÃO	67
9 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vista frontal da gaiola metabólica	35
Figura 2	Fragmento ósseo em tubo de ensaio	37
Figura 3	Colocação de hexametil-disiloxano	40
Figura 4	Combinação das gotas de NaOH	40
Figura 5	Leitura da [F] com eletrodo	41
Figura 6	Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBBAROW	45
Figura 7	Eletrodo para determinação da [F]	48
Figura 8	Concentração média de F no plasma em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal).	54
Figura 9	Concentração média de F na superfície óssea em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal).	56
Figura 10	Concentração média de F no osso total em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração média de F (\pm EP) no plasma ($\mu\text{g/mL}$) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)	53
Tabela 2	Concentração média de F (\pm EP) na superfície óssea dos ratos ($\mu\text{g/g}$) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)	55
Tabela 3	Concentração média de F (\pm EP) no osso total dos ratos ($\mu\text{g/g}$) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)	57
Tabela 4	Razão média (\pm EP) entre a concentração de F na superfície óssea e no osso total dos ratos em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)	59
Tabela 5	Quantidade média (\pm EP) de F ingerido (μg) através da ração em 24 h para as duplas de animais, a cada 14 dias, após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada	61
Tabela 6	Concentração de F presente na ração consumida pelos animais das diferentes coletas	62
Tabela 7	Quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através das fezes para as duplas de animais, a cada 14 dias após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada	64
Tabela 8	Quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através da urina para as duplas de animais, a cada 14 dias após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AANS	Ácido Alfa Amino Naftol Sulfônico
Ca₅(PO₄)₃(OH)	Apatita
CO₂	Dióxido de carbono
DCL	Dose certamente letal
DTP	Dose tóxica provável
EP	Erro Padrão
F⁻	Íon fluoreto
G	Gramas
H	Horas
H⁺	Próton
HCl	Ácido clorhídrico
HF	Ácido fluorídrico
HMDS	Hexametil-disiloxano
M	Molar
MFP	Monofluorfosfato
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mV	Milivoltagem
μL	Microlitro
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanomolar
OH⁻	Íon hidroxila
P	Fósforo
P	Nível de significância
pbpk	Farmacocinético fisiologicamente baseado
pH	Potencial hidrogênico ou hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
PTH	Hormônio da Paratireóide
Rpm	Rotações por minuto
SiF₄	Fluoreto de silício
TISAB	Tampão de ajuste de força iônica total

RESUMO

O tecido ósseo é o maior sítio de acúmulo de flúor (F) do nosso organismo. Parte do F ingerido pode transitar através de um mecanismo de estado estacionário entre cristais da superfície óssea e plasma, ou quando da remodelação óssea, mantendo constantes os níveis plasmáticos algum tempo após a diminuição da ingestão de F. O objetivo deste estudo foi avaliar o período de tempo para que o F acumulado no osso de ratos, após uma exposição aguda, seja removido. Três grupos experimentais com 10 ratos Wistar (70 dias de idade) receberam, por via gástrica, dose única de 50 mg F/Kg peso corporal (como NaF) e 3 grupos controle, também com 10 animais cada, receberam água deionizada. A eutanásia dos animais ocorreu após 30, 90 ou 180 dias da administração de F. Os ratos foram anestesiados, sangue e fêmures removidos e analisados quanto à concentração de F. Para o fêmur, foi analisado o F solúvel em ácido removido por biópsia da superfície óssea, além do F presente no osso total, após calcinação. As cinzas e o plasma foram analisados para o F com o eletrodo, após difusão facilitada por HMDS. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Os níveis plasmáticos de F do grupo controle foram constantes ao longo do tempo, e similares aos do grupo experimental eutanasiado aos 30 dias. Para os grupos experimentais eutanasiados após 90 e 180 dias, houve uma redução significativa nos níveis plasmáticos de F em relação ao grupo controle. A concentração de F na superfície do fêmur para o grupo experimental foi significativamente maior em relação ao grupo controle no tempo de eutanásia de 30 dias apenas, sendo que para os demais períodos experimentais, apesar de a concentração de F ser maior no grupo experimental quando comparado ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Para ambos os grupos pôde ser observado um aumento nos níveis de F na superfície óssea ao

longo do tempo. Para o osso total, o grupo experimental apresentou concentrações similares de F nos diferentes tempos de morte, e estes níveis foram similares aos encontrados para o grupo controle, no tempo de eutanásia de 180 dias. O grupo controle, nos tempos de morte 30 e 90 dias, apresentou valores significativamente menores quando comparado às demais situações. Os dados sugerem que o F incorporado à superfície óssea de ratos a partir de uma exposição aguda não é irreversivelmente ligado, mas vai sendo perdido ao longo do tempo, parecendo ser completamente perdido entre 90 e 180 dias após a exposição. Já os níveis de F incorporados no osso total 30 dias após uma ingestão aguda subletal não parecem ser perdidos ao longo do tempo. A não ocorrência de aumento ao longo do tempo nos níveis de F no osso total do grupo experimental sugere que existe um limite para a incorporação de F no osso total, provavelmente relacionado ao número de sítios possíveis para ligação irreversível do F.

Palavras chave: Flúor. Toxicidade. Osso e ossos. Ratos.

ABSTRACT

Determination of the lag period required from removal of fluoride incorporated in the bone of rats after acute exposure

Bone is the major site for fluoride (F) accumulation in the body. Part of the ingested F can transit between bone surface crystals and plasma, through a steady-state mechanism, which can also occur during bone remodeling. This could maintain constant plasma F levels for some time after the F intake is reduced. The aim of this study was to evaluate the lag time required to remove F accumulated in bone of rats after acute exposure. Three experimental groups, containing ten 70-day-old Wistar rats each, received, by gastrogavage, a single dose of 50 mgF/Kg body weight (as NaF), while 3 control groups received deionized water. The animals were euthanized 30, 90 or 180 days after F administration. The animals were anesthetized, blood and femurs were collected and analyzed for F. F on the femur surface was removed through an acid biopsy and F in whole bone was analyzed after ashing. Ash and plasma F were analyzed with the electrode following HMDS-facilitated diffusion. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's tests ($p < 0.05$). Plasma F levels in control group were constant along time and similar to the levels found for the experimental group euthanized after 30 days. For the experimental groups euthanized after 90 and 180 days, a significant reduction in plasma F levels in respect to control was found. F in bone surface for the experimental group was significantly higher than for the control group only 30 days after F administration. For the other experimental times, despite F concentration was higher in the experimental group when compared to control, this difference was not significant. For both groups an increase in bone surface F levels along

time was seen. For whole bone, the experimental group had similar F concentrations for all times of euthanasia and these levels were similar to those found for control group 30 days after F administration. Control group, 30 and 90 days after F administration had values significantly lower when compared to the other situations. Data suggest that F incorporated into bone surface of rats after acute exposure does not seem to be irreversibly bound and is lost along time. It seems to be completely lost between 90 and 180 days after F administration. On the other hand, F levels incorporated in whole bone 30 days after acute exposure to F do not seem to be lost along time. The lack of increase in whole bone F levels in the experimental group along time suggests that there is a limit for F uptake in whole bone, probably related to the number sites available to bind F irreversibly.

Key words: Fluorine. Toxicity. Bone and bones. Rats.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização terapêutica do flúor (F) está relacionada a um decréscimo na ocorrência de cárie dentária, estando também relacionado à dinâmica da formação óssea. (DEAN et al., 1942, DenBESTEN; THARIANI, 1992, WHITFORD, 1996a)

Muitos países, incluindo Bulgária, Grécia, Irlanda, alguns estados dos EUA, Israel e Holanda adotam a fluoretação artificial da água de abastecimento como medida de controle da cárie. A fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento no Brasil é regulamentada pelo Decreto Federal nº 76.872, de dezembro de 1975 (BRASIL, 1975). Estudos conduzidos nos EUA nos anos 1940 estabeleceram que a ingestão a longo prazo de água contendo F com 1 ppm foi associada com redução de cerca de 50 % na prevalência de cárie dentária (DEAN et al., 1942).

Além da dose protetora, o F pode ser prejudicial aos tecidos do corpo. Por ser uma substância tóxica quando consumido em doses excessivas, pode causar reações adversas, tanto crônicas como agudas, que variam desde fluorose dentária, distúrbios gástricos reversíveis e reduções transitórias na capacidade de concentração urinária, até a fluorose esquelética e mesmo morte, que em geral é acidental (WHITFORD, 1996a). Quando o F é ingerido em excesso durante o período de desenvolvimento do dente, podem ser produzidas mudanças na qualidade e aparência do esmalte (WHITFORD, 1996a).

Tais efeitos estão relacionados com a capacidade do F atuar tanto sobre ameloblastos como sobre estágios tardios de maturação e formação do esmalte dentário (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1978, BURT, 1992, LEWIS; BANTING, 1994, HOROWITZ, 1996, ASSIS et al., 1999).

Os efeitos colaterais crônicos do F ocorrem pela administração de doses pequenas e constantes, atingindo principalmente os tecidos mineralizados (FEJERSKOV et al., 1996). Segundo MELSEN et al. (1996), o excesso de F no organismo ao longo do tempo pode ocasionar também a fluorose esquelética, uma condição ainda mais séria, que pode ser classificada em 6 estágios de severidade crescente: fase assintomática, fase sintomática inicial, fase esquelética estabelecida, fase de complicações, fase de enfraquecimento e fase de incapacitação. As características clínicas da fluorose esquelética incluem imobilização das articulações e uma combinação de outras discrepâncias, como osteoesclerose, osteomalácia (“amolecimento” discernível clinicamente dos ossos) e osteoporose. Joelho vago (“genu varum”) e exostose dos joelhos (“knock knee”) também são características comuns da fluorose esquelética, associada a casos de deformidade do rádio e da ulna e hiperparatireoidismo secundário (aumento significativo na circulação de hormônio da paratireóide – PTH) (KRISHNAMACHARI, 1986).

Radiologicamente ocorrem mudanças estruturais, com o osso apresentando densidade anormal, e formação de osso novo, com formas e tamanhos variados, estimulados pelo F.

A ingestão crônica de F, além de ser associada ao consumo de água contendo grandes quantidades de F solúvel, pode ocorrer também pela ingestão de alimentos (algumas vezes preparados com água fluoretada) e bebidas, produtos odontológicos e mais raramente determinados tipos de medicamentos (WHITFORD, 1996b), além da exposição a vapores e gases industriais, caracterizando uma doença ocupacional, a fluorose industrial. Den BESTEN; THARIANI, (1992) relatam que o consumo de doses superiores a 5 ppm de F na

água de abastecimento pode resultar em fluorose esquelética e aumentar o risco de fratura óssea.

Os efeitos agudos do F são devidos a doses elevadas e freqüentes. As principais conseqüências relatadas são casos de intoxicação, cujos sintomas podem aparecer rapidamente e incluem náusea, vômito e dores abdominais, sintomas não específicos como salivacão excessiva, lacrimejamento, diarreia e convulsões. Com a queda da concentração de cálcio no plasma, ocorrem fraqueza e tetania. Em geral, o F pode exercer sua toxicidade aguda de quatro maneiras:

a) o ácido fluorídrico (HF) em contato com a pele ou mucosas pode causar uma queimadura química; b) sistemas enzimáticos como enzimas glicolíticas, fosfatases e colinesterases podem ser inibidos; c) sua ligação a cátions como o cálcio, pode afetar a ação nervosa; d) pode provocar um aumento na concentração de potássio no sangue, o que leva à cardiotoxicidade (SAMPAIO, 2000).

Sendo o F amplamente usado na Odontologia como um agente terapêutico para a cárie dentária, é bastante freqüente nos estudos que envolvem o teste de novos agentes fluoretados a realização de um período de “washout”, onde se utilizam dentifrícios sem F e são evitados ainda outros agentes fluoretados, para que os níveis anteriormente existentes de F no plasma e saliva não interfiram com o agente que será testado. No entanto, é sabido que existe uma relação de estado estacionário entre o fluido extra-celular e a camada de hidratação dos cristalitos ósseos (WHITFORD, 1996a). Assim, a camada de hidratação é contínua com, ou pelo menos acessível aos fluidos extra-celulares. Presumivelmente, o F neste “pool” é rapidamente passível de trocas, podendo migrar em qualquer direção,

dependendo da concentração relativa no fluido extracelular (regulada pela concentração plasmática) e na camada de hidratação. Quando os níveis plasmáticos de F caem, em consequência da redução da ingestão, uma vez que não existe regulação homeostática, ocorre um fluxo de F da camada de hidratação dos cristalitos para o fluido extra-celular, e daí para o plasma, não havendo, deste modo, uma queda imediata nos níveis plasmáticos de F num primeiro momento.

O intervalo de tempo necessário para que aconteça o retorno dos níveis plasmáticos aos valores basais, devido ao esgotamento do “pool” passível de trocas na superfície óssea não é conhecido, nem mesmo em animais, e o seu conhecimento é essencial para o planejamento de períodos de “washout” adequados em trabalhos envolvendo o estudo do metabolismo do F e de agentes terapêuticos fluoretados. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm mostrado que após a administração de uma dose aguda subletal de F (50 mg/Kg peso corporal), ocorre um aumento significativo nos níveis de F presentes no plasma e superfície óssea já no primeiro dia após a administração. Para a superfície óssea, 3 dias após a administração de F os níveis encontrados já não são significativamente diferentes do baseline, o que para o plasma só ocorre após 9 dias. Entretanto, para o osso total, a cinética de incorporação de F é bastante diferente, já que um aumento significativo nas concentrações de F só é detectado 3 dias após a administração do F, permanecendo relativamente constante até 27 dias, que foi o máximo intervalo de tempo após a administração de F analisado (BUZALAF et al., 2004, 2005).

O modelo farmacocinético fisiologicamente baseado (pbpk) considera que o osso tem dois compartimentos: o compartimento da superfície óssea, que é pequeno, limitado pelo fluxo e rapidamente passível de trocas e um compartimento do restante do tecido

ósseo, mais interno e que virtualmente não é passível de trocas e este modelo foi validado para exposição crônica ao F (RAO et al., 1995). Entretanto, é sabido que o F associado ao compartimento interno não se encontra irreversivelmente ligado, de forma que pode, a longo prazo, ser mobilizado através dos contínuos processos de remodelação óssea, no osso jovem, e de reabsorção e remodelação óssea, no osso adulto. O tempo requerido para eliminação do F do compartimento interno do osso após uma ingestão aguda ainda precisa ser determinado.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

A fim de tornar a leitura mais dinâmica, esta revisão de literatura foi dividida em tópicos, a saber:

- o elemento flúor;
- metabolismo e toxicidade do flúor;
- o flúor e os tecidos mineralizados

2.1. O elemento flúor

Devido às suas características químicas, como pequeno raio atômico e superfície de contato bastante efetiva, o F apresenta-se como o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica. O F reage prontamente com suas redondezas e é raramente encontrado no estado livre ou elementar. Assim, em temperaturas apropriadas, o F ataca diretamente todos os elementos, exceto oxigênio e nitrogênio. O F é exclusivamente monovalente, o que não vale para outros halógenos (SMITH; EKSTRAND,1996). O F pode se combinar reversivelmente com íons de hidrogênio e formar o HF, um ácido fraco. O íon F também tem grande afinidade pelo íon cálcio.

Interações biológicas entre F e cálcio são fatores clínicos e metabólicos importantes. Suas interações são influenciadas, por exemplo, pelas ingestões relativas dos dois elementos, níveis hormonais e perda urinária dos minerais. Nas membranas biológicas, o F penetra quando na forma de HF e *in vitro*, apresenta-se como potente inibidor de sistemas enzimáticos mitocondriais. Porém, apenas uma pequena porção do F ingerido encontra-se na forma iônica (KRISHNAMACHARI, 1986).

O F é encontrado na natureza mais freqüentemente como F inorgânico. Está presente no magma e seus vapores residuais, rochas (ígneas e sedimentares) e gases vulcânicos. Na água, sua concentração é afetada por fatores como temperatura, pH e presença de outros elementos como cálcio, alumínio e ferro. Com relação ao F atmosférico, os gases componentes mais comuns são HF e SiF₄. Folhas de plantas, em geral, contêm 2 a 20 ppm de F. Poucas espécies de plantas são conhecidas por acumularem muitas centenas de ppm de F, como exemplo, membros do gênero *Camillia*. (SMITH; EKSTRAND, 1996)

2.2. Metabolismo e toxicidade do flúor

A diferença entre a dose desejável de F e a dose tóxica é muito discreta. (KRISHNAMACHARI et al., 1986). De acordo com WHITFORD (1996a), o F, na forma de fluoreto de sódio (NaF) é facilmente ionizado e rapidamente absorvido pelo estômago e intestino delgado, enquanto o F do monofluorfosfato (MFP) precisa ser hidrolisado, principalmente por fosfatases, antes de ocorrer sua absorção. O fato de que a concentração de F no plasma e no tecido extra-celular é maior do que nos fluidos intracelulares é consistente com a hipótese de que é o HF, um ácido fraco, de pH 3.4, e não o F iônico que está em equilíbrio de difusão através das membranas celulares. A consequência é que o F pode ser levado do plasma para as células ou retirado delas para o plasma pela diferença de valores de pH dos valores intra e extracelulares.

O F é rapidamente absorvido pelo estômago e parte proximal do intestino e é levado pelo sangue para vários tecidos em curto período após sua ingestão. A absorção no estômago

está relacionada à acidez do mesmo e ao tempo em que chega ao intestino delgado. Quanto mais baixo o pH gástrico, mais rápida é a absorção do F, com menor tempo para atingir seu pico de concentração. (WHITFORD, 1994a; WHITFORD, 1994b; WHITFORD, 1996a). A presença de alimentos com os quais o F possa se complexar no estômago (especialmente aqueles compostos com cálcio e magnésio) faz com que o F seja parcialmente excretado nas fezes. Caso o estômago esteja vazio no momento da ingestão de F, a absorção tende a ser total (FEJERSKOV; THYLSTRUP, 1994; ASSIS et al., 1999)

Após a passagem pelo estômago sem ser absorvido, o intestino delgado, na sua porção proximal, é responsável pela absorção do F. Sua ação independe do pH e aproximadamente 2 horas após a ingestão, cerca de 80% do F já terá sido absorvido (WHITFORD, 1990; MESSER; OPHAUG, 1993; WHITFORD, 1994a). O F iônico é medido em fluidos biológicos usando eletrodo íon específico para F. Em pessoas normais, apenas traços da quantidade de F iônico são detectados. (KRISHNAMACHARI, 1986).

Osso, esmalte e dentina concentram cerca de 99% do F encontrado no organismo. As concentrações de F presente nos ossos estão, em geral, associadas à ingestão ao longo do tempo. O aumento da retenção do F pelo esqueleto em desenvolvimento provavelmente se deve ao rico suprimento sanguíneo que irriga aquela região, e também ao menor tamanho dos cristalitos ósseos em formação, que proporcionam maior área de superfície (WHITFORD; PASHILEY; REYNOLDS, 1979; WHITFORD, 1994a)

A exposição ao F tanto pela ingestão de água fluoretada como pelo uso de dentifrícios fluoretados ocasiona alterações físico-químicas no ambiente oral, em relação ao pH crítico de dissolução do dente. A presença constante de F na saliva protege o esmalte e a

dentina, pois a saliva contém cálcio e fosfato, naturalmente componentes da estrutura dentária. A capacidade da saliva de proteger os dentes é pH-dependente e é aumentada pela presença do F (CURY, 1992, BUZALAF, 2002; WHITFORD, 2002)

Cerca de 50% do F absorvido diariamente pelo trato gastrintestinal de adultos, é excretado pela urina (WITHFORD, 1990). O rim é o principal órgão para eliminação de F do corpo. Como o íon F sofre filtração nos rins, esse órgão é continuamente exposto a grandes quantidades de F. Isto tem particular relevância em áreas endêmicas para fluorose, uma vez que a carga corporal cumulativa do elemento tóxico acumulado em grandes quantidades deve ser excretada por esse órgão de maneira contínua. Em pessoas normais, o rim perfaz a função de homeostase do F nos tecidos calcificados. PARSONS et al. (1975) relataram a incapacidade do rim em excretar o F em falência renal crônica, resultando em elevados níveis séricos desse elemento, com uma tendência de acúmulo nos ossos. HARINARAYAN et al. (2006) demonstraram que danos crônicos nos túbulos renais estão associados também a uma ingestão excessiva de F em regiões de clima quente e seco, caracterizando uma doença óssea fluorotóxica metabólica. A ingestão excessiva de F gera uma alta concentração de ácido hidrofúrico e o fluxo de íons H^+ e F^- através dos túbulos renais, o que resultaria em danos ao tecido.

O F tem sido relatado como constituinte de cálculos renais (HERMAN et al. (1958), HERMAN; PAPADAKIS, 1960, ZIPKIN et al. 1962). Rins saudáveis são essenciais para o controle corporal do F. Em pessoas normais não mais que 0,01 a 0,05 mg de F são excretados num período de 24 horas. A excreção de F depende de muitos fatores:

- a) consumo diário total do elemento
- b) grau de eficiência renal
- c) idade
- d) estado fisiológico
- e) interação do F com outros fatores, como ligantes

(KHISHNAMACHARI, 1986)

O F encontrado nas fezes corresponde, em geral, àquele que não foi absorvido. O F também pode ser excretado através do suor (WHITFORD, 1994).

A dose mínima de F capaz de provocar sinais e sintomas de intoxicação aguda, incluindo a morte, é chamada de dose seguramente tolerada, ou “dose tóxica provável” (DTP). A DTP é de aproximadamente 5 mg F/kg peso corporal, enquanto a “dose certamente letal” (DCL) está entre 32 e 64 mg de F/kg peso corporal. Apesar disso, há relatos de óbitos com doses menores (VIEGAS et al., 1987; WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2002).

Depressão do sistema respiratório, pressão sanguínea e frequência cardíaca, assim como hipocalcemia e aumento da secreção de PTH (hormônio da paratireóide) têm sido citados como principais sintomas da intoxicação letal pelo F (KOSKINEM-KAINULAINEM; LUOMA, 1987)

A fluorose industrial, uma doença ocupacional relacionada a poluição industrial tem seus sintomas primariamente com relação ao sistema músculo-esquelético. A doença é crônica e requer muitos anos de exposição para se manifestar completamente. Algumas características são restrição dos movimentos articulares e formação de exostose.

Características radiológicas incluem formação de osso novo, osteoesclerose, calcificação e/ou ossificação de ligamentos. Além das alterações radiológicas nos ossos e juntas, sintomas circulatórios e respiratórios foram observados em 97% de todas as manifestações não esqueléticas. (KRISHNAMACHARI, 1986)

2.3. O flúor e os tecidos mineralizados

A concentração de F nos tecidos mineralizados, de acordo com HODGE (1961), WEATHERELL; WEIDMANN (1963), ZIPKIN et al, (1963) depende de fatores como:

- a) nível de ingestão de F;
- b) duração da exposição;
- c) fatores inter-relacionados como estágio de desenvolvimento do tecido, o seu ritmo de crescimento, vascularização, área da superfície e reatividade dos cristalitos minerais, porosidade e grau de mineralização.

Nos tecidos mineralizados, parte do F está incorporado no interior dos cristalitos minerais, como parte da estrutura do cristal, mas o F também pode estar localizado mais superficialmente, provavelmente na superfície dos cristais ou entre as camadas de hidratação dos cristalitos minerais, uma parte do F estará temporariamente presente no sangue e tecidos moles. Parte do F localizado superficialmente pode ser perdido e migrar do mineral para o fluido tissular ao redor, sangue, saliva ou fluido da placa (MELBERG et al., 1966, BAUD; BANG, 1970, CASLAVSKA et al., 1975, LOTT, 1962). Essa tendência dos níveis de F serem maiores na superfície está relacionada com o fato dessa região ser a mais próxima do suprimento do fluido tissular. Entretanto, a distribuição e concentração na superfície podem

mudar com a idade (PERKINSON et al., 1955, WALLACE-DURBIN, 1954, JACKSON; WEIDERMANN, 1958).

De acordo com WHITFORD (1996a) existe uma relação de estado estacionário entre o fluído extra-celular e a camada de hidratação dos cristalitos ósseos . A camada de hidratação é contínua com, ou pelo menos acessível aos fluidos extra-celulares. Assim, o F neste “pool” é rapidamente passível de trocas, podendo migrar em qualquer direção, dependendo da concentração relativa no fluído extracelular (regulada pela concentração plasmática) e na camada de hidratação. Quando os níveis plasmáticos de F caem, pela redução da ingestão, pois não existe regulação homeostática, ocorre um fluxo de F da camada de hidratação dos cristalitos para o fluido extra-celular, e daí para o plasma, não havendo uma queda imediata nos níveis plasmáticos de F. Uma porção do plasma mobilizado poderia ser incorporado novamente aos tecidos calcificados, mas o restante poderia ser eliminado via excreção urinária (WHITFORD, 1994b).

O F apresenta grande afinidade por tecidos calcificados, estimulando a formação de tecido ósseo, podendo também inibir e/ou reverter também o processo de formação de cárie (FEATHERSTONE et al.1990; FEATHERSTONE, 1999; BUZALAF, 2002). Inicialmente se acreditava que estes efeitos cariostáticos do F fossem devidos à incorporação deste elemento no esmalte dentário, durante a formação dos dentes. Posteriormente, ficou estabelecido que a principal ação cariostática do F envolve a sua presença constante, mesmo que em baixos níveis, nos fluidos da cavidade bucal em contato com o esmalte (ten CATE; DUIJESTERS, 1996, LARSEN, 1973, ROLLA; SAXEGAARD, 1990, OGAARD; ROLLA; CRUZ, 1992).

Com relação à presença de F nos tecidos dentários, estudos indicam que a administração de uma dose aguda alta de F pode afetar especificamente ameloblastos no estágio secretor de formação do esmalte dentário, resultando em um esmalte menos maduro. Entretanto, também é possível que altos níveis administrados antes da formação do dente sejam armazenados como F pobremente ligado tanto no osso como na matriz secretória do esmalte, resultando em níveis elevados de F no ambiente de desenvolvimento de dente (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1985; ANGMAR-MANSSON et al., 1990).

Segundo POSNER (1996), a constituição do osso mineral é similar à hidroxiapatita, um tipo de fosfato básico mineral presente nos dentes, cuja fórmula é dada por $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Algumas vezes, o F pode substituir o radical OH^- (hidroxila), ou até mesmo o grupo CO_3 , caracterizando a fluorapatita. Quando o F substitui a OH^- , ele fica mais firmemente ligado aos três íons cálcio adjacentes, por estar mais próximo a eles do que a OH^- , devido ao seu menor raio. A presença de cristais de hidroxiapatita contribui para que o osso seja um material reativo, satisfazendo a necessidade de reabsorção e redeposição, acompanhando crescimento, reparo e troca óssea. No procedimento de reabsorção e redeposição, que continua no decorrer da vida, os cristais depositados recentemente são menores do que os cristais mais maduros.

A formação imprópria da matriz orgânica, que é ligada à matriz inorgânica, pode resultar em doenças caracterizadas pela mineralização óssea insuficiente. A ingestão de F pode afetar a natureza do cristal ósseo e, quando em grandes quantidades, resultar na má formação do osso, conhecida como fluorose. O F diminui a solubilidade da apatita pela

substituição da OH^- , resultando em uma diminuição do cristal ósseo (POSNER, 1996). Essa mudança estrutural pode afetar sua ligação com os constituintes da matriz orgânica.

Há uma alteração na estrutura química óssea, o osso anormal tem também densidade anormal. O F estimula formação de osso novo nos locais de inserção muscular nos ossos, ocorrendo excrescências ósseas de formas e tamanhos variados, vistos radiologicamente; assim como calcificação da membrana interóssea.

Em 2004, BUZALAF et al. relataram a presença de elevadas concentrações de F na superfície óssea de ratos após administração fluoreto de sódio (50 mg F/Kg de peso) em uma dose única e subletal. A eutanásia dos animais ocorreu após 2, 4, 8, 16, 24 ou 48 horas da aplicação do F. Não foi encontrada diferença significativa na concentração de F na superfície óssea entre os grupos experimentais, somente dos grupos experimentais em relação ao controle, ao qual não foi aplicada a solução de F, mostrando uma concentração de F um pouco mais estável dentro dos períodos experimentais avaliados. Num estudo subsequente (BUZALAF et al., 2005) foi observada a cinética do F no plasma e tecido ósseo (superfície e osso total) em períodos mais longos entre a sua administração e a morte dos animais. Os intervalos de tempo de morte escolhidos foram de 1, 3, 9 e 27 dias após a administração do F, além de um grupo controle, sem aplicação de F. Notou-se um aumento significativo na concentração plasmática de F, bem como na concentração de F presente na superfície óssea 1 dia após a administração de F, voltando aos níveis de baseline no 9º e 3º dias para o plasma e superfície do fêmur, respectivamente. Com relação ao osso total, houve um aumento significativo no 3º dia, permanecendo significativamente elevado até o 27º dia. O modelo farmacocinético fisiologicamente baseado (pbpk) considera que o osso

tem dois compartimentos: o compartimento da superfície óssea, que é pequeno, limitado pelo fluxo e rapidamente passível de trocas e um compartimento do restante do tecido ósseo, mais interno e que virtualmente não é passível de trocas. Este modelo foi validado para exposição crônica ao F (RAO et al., 1995).

Entretanto, é sabido que o F associado ao compartimento interno não se encontra irreversivelmente ligado, de forma que pode, a longo prazo, ser mobilizado através dos contínuos processos de remodelação óssea, no osso jovem, e de reabsorção e remodelação óssea, no osso adulto. O retorno do flúor de um “pool” central, que se presume ser o osso, para o plasma foi investigado em ratos F344/N expostos subcronicamente a vapor de policlorofluoretileno. Uma proporção constante de primeira ordem para o retorno do F do “pool” central (osso) para o plasma foi estimada, através de otimização contra dados de excreção urinária de F coletados 20 a 40 dias pós-exposição (VINEGAR et al., 1992). A constante experimentalmente determinada, $0.0016/(\text{peso corporal})^{0,3}$ por hora, ajustada ao peso corporal e a unidades (hora para dia para semana) foi usada neste modelo. Entretanto, o tempo requerido para eliminação do F do compartimento interno do osso após uma ingestão aguda ainda precisa ser determinado (BUZALAF et al., 2005).

3 - PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar, em um modelo animal, o tempo necessário para a remoção do F incorporado aos fêmures de ratos (superfície óssea e osso total) após a administração de uma dose aguda subletal de F.

Neste estudo, com características de avaliação metabólica, foram avaliados, especificamente:

- a concentração de F ingerida através da ração;
- a concentração de F excretada através da urina e das fezes;
- o tempo necessário para eliminação do flúor incorporado na superfície óssea e no osso total dos animais, bem como o flúor presente no plasma, após a aplicação intra-gástrica da solução de F.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP, sob nº 38/2003.

4.1. Obtenção e tratamento dos animais

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, onde permaneceram em gaiolas metabólicas (Beira Mar, ETG 30 M), em duplas durante todo o período experimental (Fig1). As gaiolas metabólicas foram utilizadas para que houvesse a possibilidade de se controlar a excreção urinária e fecal de F dos animais, no dia da administração de F, e depois a cada duas semanas até a morte dos animais, bem como a ingestão de F a partir da ração, podendo-se chegar ao balanço metabólico do F.



Figura 1 - Vista frontal da gaiola metabólica

Foram utilizados três grupos experimentais e três grupos controle, contendo 10 ratos Wistar machos de 70 dias de idade cada, totalizando 60 ratos. Estes ratos receberam, desde o desmame, água deionizada, e, após jejum por 12 horas, os ratos dos grupos experimentais receberam, por via gástrica, uma dose única de 50 mg F/Kg peso corporal (como NaF), enquanto que os ratos dos grupos controle receberam água deionizada. A média do peso dos animais foi de 224 gramas. Os grupos experimentais e controle foram mortos após 30, 90 ou 180 dias da administração de F. Houve a necessidade de haver 3 grupos controle porque a concentração de F no osso tende a aumentar com a idade, devido à incorporação cumulativa de F em função da mesma (WHITFORD, 1994b).

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados com éter etílico em câmara de vidro fechada. A cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, o coração foi puncionado com agulha, e o sangue colhido com uma seringa plástica heparinizada (uma gota de Heparina contendo 5.000 UI/mL) e transferido para tubos plásticos (tipo Ependorff), homogeneizado e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (Jouan A14) para se obter o plasma. Foram coletados em média 3 mL de sangue para obtenção de 1 mL de plasma. Após divulsão muscular, os fêmures foram também removidos.

Todo o tecido mole foi imediatamente retirado. As epífises foram retiradas e os fragmentos foram lavados com água deionizada.

Depois disto, com um disco de carborundum, foi separada a porção média de cada fragmento (comprimento de aproximadamente 1 cm) (Fig 2). Os fragmentos de fêmur foram então colocados em estufa a 60° C e pesados a cada 12 h, até que o seu peso ficasse

constante. Este procedimento foi realizado para a remoção da água, estando os fragmentos prontos para a análise de F e P. Após a análise de F na superfície óssea foi feita análise de F no osso total.



Figura 2 - Fragmento ósseo em tubo de ensaio

5 - DOSAGENS DE FLÚOR

5.1. Plasma

Para a análise do F no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO₂, que deve ser eliminado. Para tanto, 500 µL de plasma foram colocados em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre eles foi colocado o ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996). Na tampa destas placas, foi colocado 50 mL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas.

As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas em mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite.



Figura 3 - Colocação de hexametil-disiloxano

No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota, contendo todo o F, foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um microeletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.



Figura 4 - Combinação das gotas de NaOH

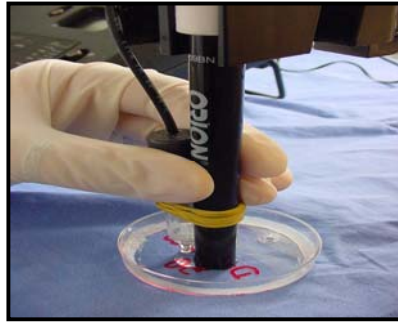


Figura 5 - Leitura da [F] com eletrodo

Validação da análise:

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

As soluções-padrão (contendo $0,0095$, $0,019$, $0,095$ e $0,19 \mu\text{g F}$) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo $0,1 \text{ M F}^-$ (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma que foram analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a

ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já havia sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

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

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

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

5.2. Superfície dos fêmures

Para a realização da biópsia nos fêmures dos animais, foi colocada cera nas suas extremidades para vedá-las e os ossos foram imersos em acetona por alguns segundos para remover a gordura. Sobre a superfície assim preparada foi colocado um pedaço circular de fita adesiva (fita mágica, 3M) com área de $4,52 \text{ mm}^2$ para isolar a área da biópsia e o restante foi selado com esmalte de unhas. A fita adesiva foi então removida, estando a área pronta para sofrer biópsia. Os fragmentos de ossos foram então imersos em 0,25 mL de HCl 0,5 M por 15 segundos (BEZERRA DE MENEZES; VOLPATO; ROSALEN,1996) sob agitação. O extrato ácido assim obtido foi imediatamente neutralizado com 0,25 mL de TISAB II e submetido à análise de F pelo método direto, utilizando-se o eletrodo F-sensível (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA, modelo 9609) acoplado a um potenciômetro Orion, modelo EA 940. Previamente à leitura das amostras, foi feita calibração com padrões contendo concentrações de F variando entre 0,05 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$.

Dosagem de Fósforo

A dosagem de fósforo nas biópsias obtidas a partir dos fêmures foi realizada conforme descrito por FISKE; SUBBAROW (1925), para que se pudesse calcular a concentração de F em ppm ($\mu\text{g F/g}$ osso). Foram empregados os seguintes reagentes:

Reativo Redutor:

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

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

Ácido Molibdico:

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

A reação foi feita de acordo com a figura 6.

	Blanck	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Amostr a
Água deionizada	2,3 mL	2,275 mL	2,25 mL	2,2 mL	2,1 mL	1,9 mL	2,2 mL
Padrão P 3 mg %	-	0,025 mL	0,05 mL	0,1 mL	0,2 mL	0,4 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Molibdico	0,5 mL em todos, agitar e esperar 10 minutos						
Redutor	0,2 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler						
DO 660 nm							
µg P/mL	0	0,75	1,50	3,00	6,00	12,00	

Figura 6 - Dosagem de fósforo de acordo com o método de FISKE; SUBBAROW (1925)

Inicialmente colocou-se água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos no quadro 1. Em seguida foram adicionados, em triplicata, os padrões de P e as amostras. 0,5 mL de ácido molibdico foi colocado em todos os tubos, feita em seguida uma leve agitação e esperaram-se 10 minutos.

Em seguida através da adição de 0,2 mL de reativo redutor a coloração da reação foi desenvolvida. Após 20 minutos da colocação do reativo redutor fez-se a leitura em espectrofotômetro (Cary 50) a 660 nm de absorbância.

5.3. Ossos totais

A análise de F no osso total foi feita após a realização da biópsia da superfície dos fêmures. Os ossos tiveram o esmalte de unha removido, a cera que vedava suas extremidades retiradas e foram seccionados ao lado da região da biópsia, restando fragmentos de aproximadamente 1,0 cm, os quais foram novamente imersos em 0,25 mL de HCl 0,5 M sob agitação por 15 segundos, sendo a solução imediatamente neutralizada com 0,25 mL de TISAB II. Este procedimento foi feito para a remoção de uma camada superficial de osso, já que a análise anterior havia removido uma área restrita de osso superficial que se encontrava exposta.

Os fragmentos foram pesados e calcinados em forno tipo mufla, a 600°C, durante toda a noite. As cinzas foram então novamente pesadas e divididas em frações de aproximadamente 5,00±0,01 mg. O F foi separado por difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968) modificado por WHITFORD (1996). Esta análise foi feita em triplicata, como descrito para o plasma, com exceção da pré-difusão e do uso de padrões difundidos contendo 1,9, 3,8, 19,0 e 38,0 µg de F, conforme anteriormente padronizado em nosso laboratório.

5.4. Fezes

O volume total coletado de fezes em períodos de 24 horas a cada duas semanas durante o período experimental foi armazenado a -20°C . Assim, para os grupos de 30, 90 e 180 dias foram analisadas 2, 7 e 13 amostras, respectivamente. Uma vez que os animais permaneciam em duplas nas gaiolas metabólicas, o n é cinco para cada condição experimental, tendo sido coletado material de cada dupla de animais. Após serem deixadas para descongelar na noite anterior à análise, as fezes foram secas em estufa ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) e pesadas para se determinar o peso seco das amostras. Foram colocadas em recipientes (tipo tubo) plásticos e foram adicionados volumes de água deionizada que variaram de acordo com o volume das fezes (em média 3 mL por g de fezes).. As amostras foram então homogeneizadas (Homogenizador Marconi, modelo MA 102) até que adquirissem consistência pastosa. As amostras foram pesadas e foi colocado 1,0 g de amostra em placas de Petri para análise de F, que foi feita em duplicata, por difusão facilitada por HMDS, como descrita anteriormente para o plasma, com exceção da pré-difusão.

Validação da análise:

A curva de calibração foi feita com os mesmo cuidados descritos para a validação da análise de F no plasma. Foi feita uma curva de calibração com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,19, 0,95, 190, 4,75 e 9,50 μg F. A concordância entre as análises feitas em duplicata foi maior que 90%.

A concentração de F obtida nas amostras foi multiplicada pelo peso total, a fim de se calcular a quantidade total de F excretada em 24 h, em mg.

5.5. Urina

O volume total da urina coletado durante o período experimental foi armazenado a -20°C enquanto aguardava a análise. Para os grupos de 30, 90 e 180 dias foram analisadas, à semelhança das fezes, 2, 7 e 13 amostras, respectivamente. As amostras de urina foram deixadas à temperatura ambiente para descongelar durante a noite anterior à dosagem. Na análise foi utilizado 1,0 mL de amostra adicionado de 1,0 mL de água deionizada. Algumas amostras apresentaram concentração elevada de F. Por isso, durante a leitura, foi necessário realizar diluição da amostra previamente à análise.

A concentração de F presente nas amostras de urina foi determinada em triplicata, usando-se o eletrodo Orion 9609, após terem sido tamponadas com um volume idêntico de TISAB II (Tampão de ajuste da força iônica total) (Fig. 3)



Figura 7 - Eletrodo para determinação da [F]

Validação da análise:

A curva de calibração foi realizada com os mesmo cuidados descritos para a validação da análise de F no plasma. Foi feita uma curva de calibração com 0,5 mL de soluções-padrão contendo 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 µg F. Em adição, medições de F em 10% das amostras foram repetidas para se determinar a reprodutibilidade das análises. A concordância entre as análises feitas em duplicata foi superior a 95%.

A concentração de F obtida nas amostras foi multiplicada pelo volume total, a fim de se calcular a quantidade total de F excretada em 24 h, em mg.

5.6. Ração

Juntamente com as coletas de fezes e urina, realizadas a cada duas semanas durante o período experimental, foram coletadas também amostras da ração que era fornecida aos animais. Para que pudesse ser utilizada na gaiola metabólica, a ração industrial da marca Purina, originalmente em “pellets”, foi moída. As amostras de ração permaneceram juntamente com as amostras de fezes e urina, a – 20° C, até a realização das análises.

Para a quantificação de F na ração, foram colocados 0,025 g de ração moída em placa de Petri e a análise prosseguiu de acordo com descrito por difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968), modificado por WHITFORD (1996). Esta análise foi feita como descrito

para o plasma, com exceção da pré-difusão e do uso de padrões difundidos contendo 0,095, 0,19, 0,95 e 1,9 $\mu\text{g F}$.

A concentração de F obtida nas amostras foi multiplicada pelo peso total de ração consumido, a fim de se calcular a quantidade total de F consumida em 24 h, em μg .

Cabe ressaltar que, uma vez que os animais foram acondicionados nas gaiolas metabólicas em duplas, os dados obtidos para excreção (urinária e fecal) e consumo de F em 24 horas, são para 2 animais.

6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software GraphPad InStat. Inicialmente foi checada a normalidade (teste de Kolmogorov and Smirnov) e a homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados. Para o plasma, a superfície do fêmur, fêmur total e razão entre superfície do fêmur e fêmur total, os dados tiveram distribuição normal, mas não apresentaram homogeneidade, conforme detectado pelo teste de Bartlett. Procedeu-se então ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais. Para a ingestão de F através da ração, houve normalidade e homogeneidade dos dados, que foram submetidos então à ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparações individuais. Para os períodos em que só havia 2 grupos (controle e F, 180 dias) foi empregado o teste t de Student. Para a excreção de F através das fezes, foi calculada a média, para cada coleta, entre os animais do grupo controle, que foi comparada com a média dos animais do grupo experimental através do teste de Mann-Whitney para a primeira coleta, e do teste t de Student para as coletas seguintes. Para a excreção de F através da urina, foi calculada a média, para cada coleta, entre os animais do grupo controle, que foi comparada com a média dos animais do grupo experimental através do teste t de Student ou do teste de Mann-Whitney, dependendo da existência ou não, respectivamente, de homogeneidade entre os desvios-padrão dos 2 grupos.

Também foi verificada a ocorrência de correlação entre as dosagens de F obtidas a partir das amostras de plasma e superfície do fêmur, plasma e fêmur total e superfície do fêmur e fêmur total, usando o coeficiente de correlação de Pearson.

Um nível de significância de 5% foi pré-estabelecido em todos os testes estatísticos.

7 - RESULTADOS

A tabela 1 e a figura 8 mostram a concentração média de F no plasma (\pm EP) em função do tratamento e do tempo de morte. Houve diferença significativa entre os grupos (KW = 30,552, $p < 0,0001$), sendo que o teste de Dunn revelou que as diferenças só foram significativas para os grupos experimentais que foram mortos após 90 e 180 dias, quando comparados com os grupos controle ($p < 0,0001$).

Tabela 1 - Concentração média de F (\pm EP) no plasma ($\mu\text{g/mL}$) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)

Tratamento	Tempo de morte (dias)		
	30	90	180
Água deionizada (controle)	$0,049 \pm 0,004^a$	$0,046 \pm 0,004^a$	$0,047 \pm 0,005^a$
F (50 mg/Kg peso corporal)	$0,036 \pm 0,002^{a,b}$	$0,024 \pm 0,004^b$	$0,022 \pm 0,001^b$

Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

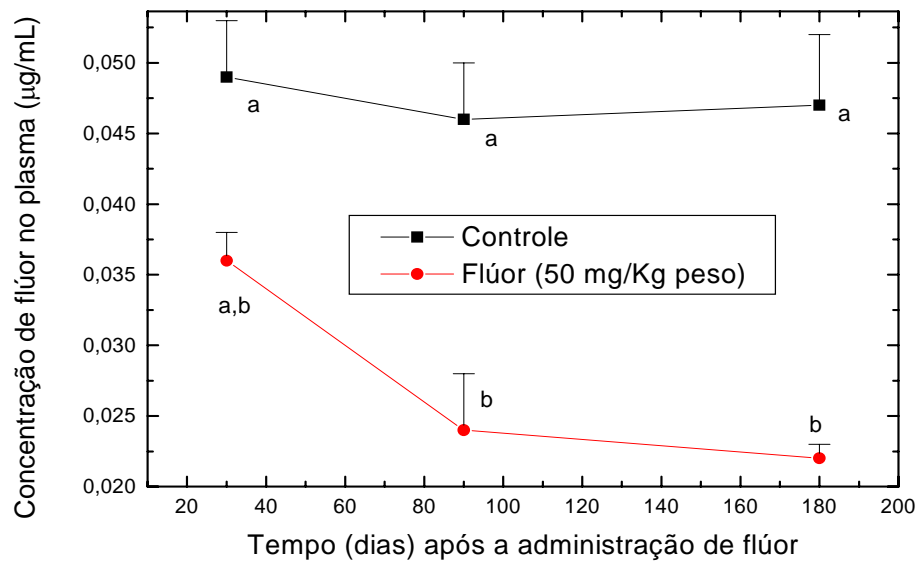


Figura 8 - Concentração média de F no plasma em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal). As barras indicam o erro-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Com relação à superfície óssea, a tabela 2 e a figura 9 mostram a concentração média de F (\pm EP) em função do tratamento e do tempo de morte. Houve diferença significativa entre os grupos (KW = 42,337, $p < 0,0001$), e o teste de Dunn revelou que, para o grupo experimental, a concentração de F foi significativamente maior em relação ao grupo controle no tempo de morte de 30 dias apenas ($p < 0,05$). Para os demais períodos experimentais, apesar de a concentração de F ser maior no grupo experimental quando comparado ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Concentração média de F (\pm EP) na superfície óssea dos ratos ($\mu\text{g/g}$) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)

Tratamento	Tempo de morte (dias)		
	30	90	180
Água deionizada (controle)	204,8 \pm 7,8 ^a	231,2 \pm 13,6 ^{a,c}	598,9 \pm 32,0 ^b
F (50 mg/Kg peso corporal)	388,7 \pm 15,6 ^{b,c}	364,8 \pm 49,9 ^{a,b,c}	630,7 \pm 62,2 ^b

Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

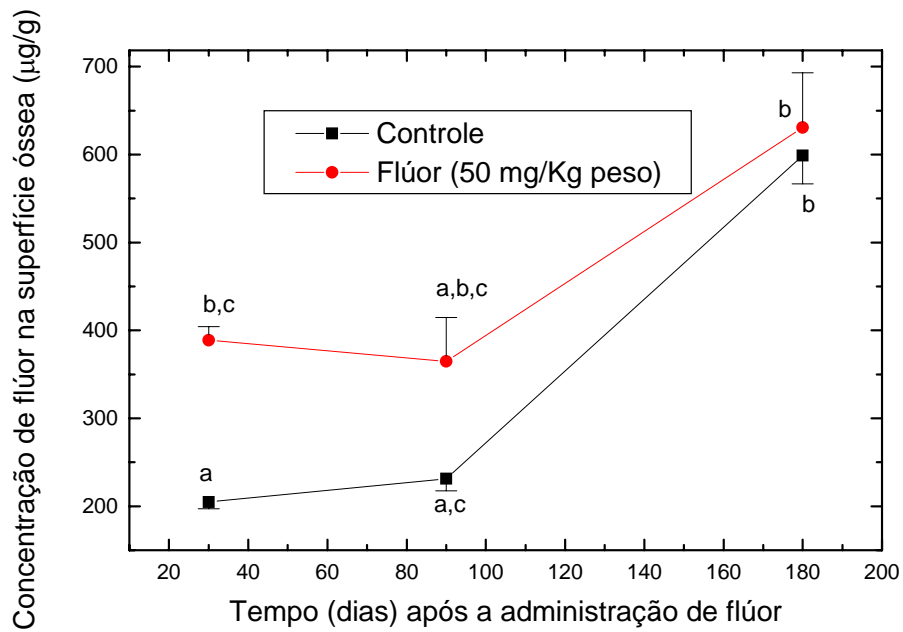


Figura 9 - Concentração média de F na superfície óssea em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal). As barras indicam o erro-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para o osso total, a tabela 3 e a figura 10 mostram a concentração média de F (\pm EP) em função do tratamento e do tempo de morte. Houve diferença significativa entre os grupos (KW = 42,337, $p < 0,0001$). O grupo que recebeu F apresentou concentrações similares de F no osso total nos diferentes tempos de morte, e estes níveis foram similares aos encontrados para o grupo controle, no tempo de morte 180 dias, não havendo significância estatística ($p > 0,05$). O grupo controle, nos tempos de morte 30 e 90 dias, apresentou valores significativamente menores quando comparado às demais situações ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Concentração média de F (\pm EP) no osso total dos ratos (μ g/g) em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)

Tratamento	Tempo de morte (dias)		
	30	90	180
Água deionizada (controle)	158,4 \pm 19,8 ^a	191,0 \pm 22,7 ^a	445,4 \pm 56,6 ^b
F (50 mg/Kg peso corporal)	421,4 \pm 32,8 ^b	479,0 \pm 35,0 ^b	411,6 \pm 54,6 ^b

Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

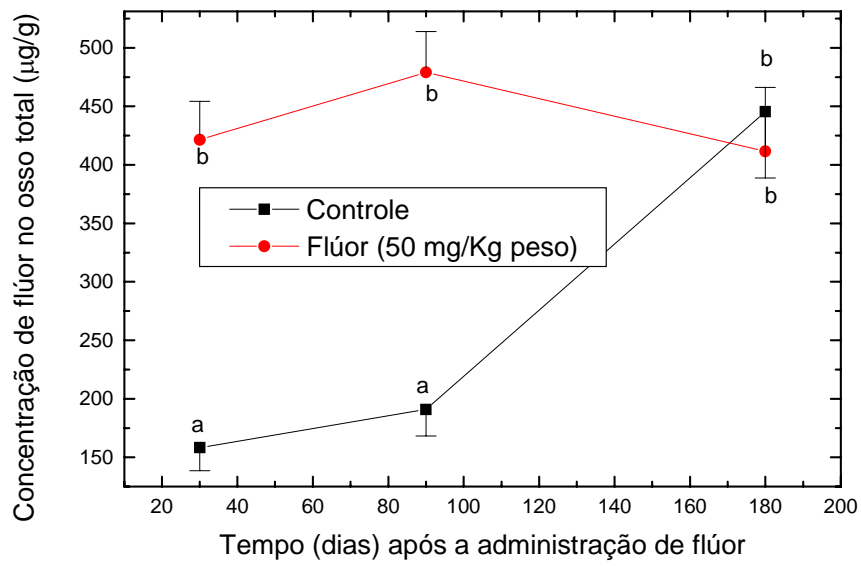


Figura 10 - Concentração média de F no osso total em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal). As barras indicam o erro-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

A tabela 4 mostra razão média (\pm EP) entre a concentração de F na superfície óssea e osso total, em função do tratamento e do tempo de morte. Houve diferença significativa entre os grupos (KW = 20,814, $p < 0,001$). Os maiores valores foram encontrados para o tempo de morte de 180 dias para os grupos controle e experimental ($1,519 \pm 0,178$ e $1,706 \pm 0,282$, respectivamente), enquanto que o menor valor foi encontrado para o grupo experimental, tempo de morte 90 dias ($0,758 \pm 0,082$), havendo diferenças significativas, conforme revelado pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). As demais situações apresentaram razões intermediárias, não havendo significância estatística ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Razão média (\pm EP) entre a concentração de F na superfície óssea e no osso total dos ratos em função do tratamento e do tempo de morte após a administração da dose aguda de F (50 mg/Kg peso corporal)

Tratamento	Tempo de morte (dias)		
	30	90	180
Água deionizada (controle)	$1,368 \pm 0,367^{a,b}$	$1,321 \pm 0,135^{a,b}$	$1,519 \pm 0,178^a$
F (50 mg/Kg peso corporal)	$0,972 \pm 0,085^{a,b}$	$0,758 \pm 0,082^b$	$1,706 \pm 0,281^a$

Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Não houve correlação significativa entre a concentração de F presente na superfície óssea e no plasma ($r=-0,245$, $p=0,083$), enquanto que a correlação entre a concentração de F presente no osso total e na superfície óssea foi positiva e significativa ($r=0,581$, $p<0,0001$). Quando se relacionou a concentração de F presente no osso total com aquela presente no plasma, encontrou-se uma correlação negativa fraca, mas significativa ($r=-0,373$, $p=0,008$).

A tabela 5 mostra a quantidade média (\pm EP) de F ingerido (μ g) através da ração para as duplas de animais, nas diferentes coletas, que se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada, e foram realizadas a cada 14 dias, até a morte dos animais.

Os grupos que receberam a dose aguda de F tiveram na primeira coleta uma diminuição na quantidade de F ingerido através da ração, embora esta diferença só tenha sido significativa para o grupo que recebeu F e foi morto após 30 dias, quando comparado ao grupo controle, que recebeu água deionizada e foi morto também após 30 dias. Esta diferença aconteceu pelo fato de que o consumo médio (\pm EP) de ração das duplas de animais do grupo controle ter sido de $30,45\pm 3,41$ mg/24 horas, comparado a apenas $12,63\pm 2,54$ mg/24 horas para os animais dos grupos experimentais, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($t=4,186$, $p=0,0003$).

Tabela 5 - Quantidade média (\pm EP) de F ingerido (μ g) através da ração em 24 h para as duplas de animais, a cada 14 dias, após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada

Coletas	Condições experimentais						
	Controle 30 dias	Controle 90 dias	Controle 180 dias	F 30 dias	F 90 dias	F 180 dias	p
1	1,06 \pm 0,14*	0,71 \pm 0,16	0,97 \pm 0,22	0,32 \pm 0,13**	0,45 \pm 0,13	0,44 \pm 0,18	0,015
2	1,34 \pm 0,05	1,21 \pm 0,12	1,20 \pm 0,06	1,27 \pm 0,03	1,10 \pm 0,12	1,33 \pm 0,11	0,390
3	–	0,57 \pm 0,10	0,59 \pm 0,05	–	0,55 \pm 0,09	0,62 \pm 0,02	0,914
4	–	0,20 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03	–	0,24 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,653
5	–	0,53 \pm 0,07	0,53 \pm 0,01	–	0,43 \pm 0,05	0,56 \pm 0,20	0,794
6	–	0,50 \pm 0,07	0,60 \pm 0,07	–	0,61 \pm 0,07	0,54 \pm 0,05	0,616
7	–	0,57 \pm 0,15	0,63 \pm 0,17	–	0,67 \pm 0,19	0,72 \pm 0,20	0,938
8	–	–	1,45 \pm 0,06	–	–	1,28 \pm 0,11	0,182
9	–	–	1,28 \pm 0,06	–	–	1,24 \pm 0,10	0,743
10	–	–	0,63 \pm 0,03	–	–	0,65 \pm 0,02	0,683
11	–	–	2,20 \pm 0,14	–	–	2,29 \pm 0,17	0,690
12	–	–	1,47 \pm 0,11	–	–	1,40 \pm 0,20	0,761

* As coletas se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada por gavagem gástrica, e procederam a cada 14 dias até a morte dos animais.

** diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais (ANOVA, $p < 0,05$). n=5

A tabela 6 mostra a concentração de F presente na ração consumida pelos animais nas diferentes coletas. Os valores variaram entre 6,0 e 33,2 $\mu\text{g F/g}$ de ração, sendo que a média foi 23,9 $\mu\text{g F/g}$. Esta variação influenciou na diferente ingestão de F a partir da ração nas diferentes coletas, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 6 - Concentração de F presente na ração consumida pelos animais das diferentes coletas.

Coletas	Concentração de F na ração ($\mu\text{g/g}$)
1	30,0
2	30,2
3	15,4
4	6,0
5	18,7
6	15,1
7	23,9
8	36,0
9	33,2
10	14,5
11	32,7
12	31,7

Na tabela 7 pode-se observar a quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através das fezes para as duplas de animais, nas diferentes coletas, que se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada, e foram realizadas a cada 14 dias, até a morte dos animais. Na primeira coleta, para todos os tempos de morte analisados (30, 90 e 180 dias), a excreção fecal de F foi maior para os grupos experimentais, quando comparados com o controle. Quando se calculou a média dos grupos experimentais, e se comparou com a média dos grupos controle, observou-se que a excreção fecal de F foi significativamente maior no grupo experimental quando comparado ao controle ($p=0,0002$). Nas outras coletas, os valores para o grupo experimental e controle foram similares, não havendo diferenças significativas entre ambos ($p>0,05$).

Os valores presentes na tabela 7 indicam um aumento na excreção fecal de F na oitava coleta, quando comparada às demais, tanto para o grupo controle quando para o experimental. Este fato pode deve ter sido causado pela maior concentração de F presente na ração (36,0 mg/Kg) utilizada neste período (Tabela 6).

Tabela 7 - Quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através das fezes para as duplas de animais, a cada 14 dias após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada.

Coletas	Condições experimentais								
	Controle 30 dias	Controle 90 dias	Controle 180 dias	F 30 dias	F 90 dias	F 180 dias	Média controle	Média F	p
1	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,08 \pm 0,03	0,15 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04	0,23 \pm 0,05	0,073 \pm 0,014	0,191 \pm 0,024	0,0002
2	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,058 \pm 0,007	0,066 \pm 0,007	0,4431
3	–	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	–	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,026 \pm 0,005	0,027 \pm 0,010	0,9223
4	–	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	–	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,028 \pm 0,003	0,027 \pm 0,004	0,8657
5	–	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	–	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,013 \pm 0,002	0,019 \pm 0,005	0,0761
6	–	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	–	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	0,040 \pm 0,006	0,039 \pm 0,009	0,9133
7	–	0,07 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	–	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,054 \pm 0,008	0,036 \pm 0,009	0,1391
8	–	–	0,15 \pm 0,02	–	–	0,14 \pm 0,05	0,151 \pm 0,021	0,136 \pm 0,048	0,7669
9	–	–	0,10 \pm 0,03	–	–	0,13 \pm 0,01	0,099 \pm 0,028	0,127 \pm 0,013	0,4875
10	–	–	0,03 \pm 0,00	–	–	0,06 \pm 0,02	0,028 \pm 0,005	0,060 \pm 0,016	0,0663
11	–	–	0,01 \pm 0,00	–	–	0,03 \pm 0,01	0,012 \pm 0,001	0,030 \pm 0,009	0,0643
12	–	–	0,05 \pm 0,01	–	–	0,08 \pm 0,01	0,048 \pm 0,008	0,081 \pm 0,007	0,0294
13	–	–	0,07 \pm 0,01	–	–	0,08 \pm 0,01	0,074 \pm 0,010	0,076 \pm 0,010	0,8974

* As coletas se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada por gavagem gástrica, e procederam a cada 14 dias até a morte dos animais.

n=5 por condição experimental

Com relação à excreção de F pela urina, houve dificuldade na coleta das amostras, pois, muitas vezes, o volume presente era muito pequeno, o que o deixava sujeito à evaporação. Em alguns casos não foi possível coletar amostras. Por este motivo, os dados não estão apresentados para cada período experimental separadamente, como no caso das fezes, mas sim foram compilados apenas em grupo controle e grupo experimental. A tabela 8 mostra a quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através da urina para as duplas de animais, nas diferentes coletas, que se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada, e foram realizadas a cada 14 dias, até a morte dos animais.

Na primeira coleta, observou-se que a excreção urinária de F foi significativamente maior no grupo experimental quando comparado ao controle ($p=0,0005$), o que indica que a dose de F excessiva administrada estava sendo eliminada também pela urina, à semelhança das fezes. Na segunda coleta, os volumes de urina coletados foram bastante reduzidos, e em alguns casos houve evaporação das amostras durante a coleta, impossibilitando a análise. Nesta coleta, foi observada uma diminuição na excreção urinária de F quando comparada à primeira coleta, e embora o grupo experimental tenha apresentado o dobro da excreção quando comparado ao controle, esta diferença não foi significativa. No entanto, devido ao problema mencionado acima, os dados da excreção urinária da segunda coleta devem ser interpretados com cautela. Nas outras coletas, os valores para o grupo experimental e controle foram similares, não havendo diferenças significativas entre ambos ($p>0,05$), à semelhança do que ocorreu para as fezes.

Tabela 8 - Quantidade média (\pm EP) de F excretado (mg) através da urina para as duplas de animais, a cada 14 dias após a administração de F (50 mg/Kg peso corporal) ou água deionizada

Coletas*	Controle	Experimental	p
1	0,016 \pm 0,010	0,120 \pm 0,022	0,0005
2	0,005 \pm 0,002	0,010 \pm 0,004	0,4645
3	0,037 \pm 0,004	0,043 \pm 0,004	0,3218
4	0,047 \pm 0,002	0,047 \pm 0,005	0,4897
5	0,020 \pm 0,003	0,028 \pm 0,004	0,0902
6	0,033 \pm 0,004	0,032 \pm 0,006	0,9496
7	0,023 \pm 0,005	0,016 \pm 0,005	0,3554
8	0,152 \pm 0,009	0,157 \pm 0,023	0,8344
9	0,021 \pm 0,003	0,041 \pm 0,014	0,2857
10	0,107 \pm 0,008	0,112 \pm 0,009	0,6733
11	0,036 \pm 0,021	0,021 \pm 0,003	0,2893
12	0,079 \pm 0,017	0,083 \pm 0,005	>0,9999

* As coletas se iniciaram 14 dias após a administração de F ou água deionizada por gavagem gástrica, e procederam a cada 14 dias até a morte dos animais.

8 - DISCUSSÃO

Os valores de concentração de F encontrados no presente trabalho para o plasma dos grupos controle e experimental foram bastante semelhantes aos relatados por BUZALAF et al. (2005), onde foram avaliadas as concentrações plasmáticas de F em ratos 1, 3, 9 e 27 dias após a administração de uma dose única de F de 50 mg/Kg peso corporal.. Os valores médios (\pm EP) encontrados foram respectivamente: $0,260\pm 0,010$, $0,072\pm 0,027$, $0,045\pm 0,006$ e $0,034\pm 0,008$, enquanto para o grupo controle, que recebeu água deionizada, o valor encontrado foi de $0,029\pm 0,010$ $\mu\text{g/mL}$. A diferença entre o grupo controle e os animais que foram mortos após 27 dias não foi significativa.

No presente estudo, os níveis plasmáticos de F encontrados para o grupo controle foram significativamente maiores que aqueles encontrados para o grupo experimental, nos tempos de morte de 90 e 180 dias. As possíveis hipóteses para explicar esta redução na concentração de F no plasma dos animais do grupo ao longo do tempo seriam: a) erro analítico, uma vez que quantidade insuficiente de amostras não possibilitou a realização de leituras em duplicatas; b) continuidade de remoção do F do plasma pelo esqueleto, após a ingestão de uma dose alta de F. Esta segunda hipótese também foi observada por LEITE et al. (2006), em um trabalho de ingestão crônica de flúor a longo prazo, onde o grupo que recebeu dose de F ($50 \mu\text{gF/mL}$) na água de beber e foi morto depois de 30, 90 ou 180 dias, apresentou níveis de F no plasma decrescentes ao longo do tempo ($0,032\pm 0,004$, $0,019\pm 0,004$ e $0,017\pm 0,001$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Assim, a segunda hipótese realmente parece plausível. Convém ressaltar que houve diferenças significativas entre os grupos controle e experimental porque os erros-padrão foram baixos para ambos os grupos, embora

em todos os casos os níveis de F plasmáticos tenham sido baixos, de forma que não parece existir uma significância clínica nesta diferença.

Com relação às concentrações de F encontradas na superfície óssea (Tabela 2 e Figura 2), observou-se que, nos grupos experimentais, a concentração de F só foi significativamente maior que aquelas encontradas para o grupo controle no tempo de morte de 30 dias, sendo que para os demais períodos experimentais, apesar de a concentração de F ser maior no grupo experimental quando comparado ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A observação da tabela 2 permite ver a importância, no delineamento do presente estudo, de se ter realizado um grupo controle para cada tempo de morte, pois, também no grupo controle, foi observado um aumento nos níveis de F incorporado na superfície óssea ao longo do tempo, de forma que no tempo de morte de 180 dias, as concentrações de F na superfície do fêmur se tornaram semelhantes para ambos os grupos. Tem sido relatado um aumento nos níveis de F no osso com a idade, pelo fato deste elemento se acumular nos tecidos mineralizados (WHITFORD, 1996). Isto foi comprovado no presente estudo, onde para ambos os grupos pôde ser observado um aumento nos níveis de F na superfície óssea ao longo do tempo. Isto pode ter sido reflexo da elevada concentração de F presente na ração dos animais (Tabela 6). Para o grupo controle, este aumento foi observado nos períodos de 90 e 180 dias, quando comparado a 30 dias. Para o grupo experimental, entretanto, no período de 90 dias houve uma ligeira diminuição nos níveis de F na superfície óssea, o que poderia ser atribuído ao fato de ainda estar acontecendo uma eliminação do excesso de F incorporado a partir da exposição aguda, mas em 180 dias pôde ser notado um grande aumento nos níveis de F encontrados na superfície óssea. Assim, estes dados parecem sugerir que os sítios para incorporação de

F na superfície óssea e/ou a estabilidade dos compostos de F formados com a superfície óssea parecem se alterar com a idade, o que provavelmente deve ser fruto da constante remodelação óssea. Acredita-se que isto ocorra pelo fato de quando foi administrada a dose aguda de F, houve aos 30 dias um aumento na concentração de F incorporado na superfície óssea (fruto desta exposição aguda), uma ligeira diminuição aos 90 dias (balanço entre a eliminação do F incorporado pela exposição aguda e incorporado pela ingestão de F da ração) e finalmente um grande aumento aos 180 dias. Se os sítios para ligação ao F fossem constantes ao longo do tempo, a tendência seria haver uma contínua diminuição nos níveis de F incorporados à superfície óssea ao longo do tempo, o que não ocorreu. Por outro lado, se a afinidade dos complexos de F formados com a superfície óssea fosse constante, o esperado seria um contínuo aumento nos níveis de F incorporados no osso ao longo do tempo, o que também não aconteceu. Outro fato que pode ter contribuído para a cinética do F observada na superfície óssea foi a presença de uma elevada concentração de F na ração consumida pelos animais, que chegou a ter 36 $\mu\text{gF/g}$ (Tabela 6). Isto pode ter contribuído para o aumento na concentração de F na superfície óssea com a idade, devido à contínua ingestão de F. De qualquer forma, os dados sugerem que o F incorporado à superfície óssea de ratos a partir de uma exposição aguda não é irreversivelmente ligado, mas vai sendo perdido ao longo do tempo, parecendo ser completamente perdido entre 90 e 180 dias após a exposição, já que neste último período os níveis foram similares aos do grupo controle.

Uma cinética de eliminação do F incorporado diferente foi observada para o fêmur total. Na verdade, os níveis de F presentes no fêmur total do grupo experimental permaneceram praticamente constantes ao longo do tempo, de forma que aos 180 dias,

devido ao aumento sofrido pelo grupo controle, os valores tornaram-se semelhantes para ambos os grupos. Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa (BUZALAF et al., 2005), foi observado que, após a ingestão aguda de uma dose de F similar à do presente estudo (50 mg/Kg peso corporal), ocorreu um aumento nos níveis de F no osso total logo nos 3 primeiros dias após a administração, com uma estabilização nestes níveis a partir de então, até um período de 27 dias, que foi o maior tempo observado. Os achados do presente estudo corroboram esta hipótese de que após a ingestão de uma dose aguda subletal de F, os aumentos na concentração de F no osso total ocorrem nos primeiros dias, já que em todos os períodos testados (30, 90 e 180 dias), os níveis de F no osso total dos grupos experimentais foram relativamente constantes. Em adição, uma observação importante é que os níveis de F incorporados no osso total 30 dias após uma ingestão aguda subletal não são perdidos ao longo do tempo, parecendo ser este estoque irreversível. De fato, um modelo farmacocinético fisiologicamente baseado (pbpk) considera que o osso tem dois compartimentos: um pequeno, limitado pelo fluxo e rapidamente passível de trocas, que é o compartimento da superfície óssea, e outro bem maior, correspondente ao osso mais interno, virtualmente não passível de trocas. Este modelo foi validado para exposição crônica ao F (RAO et al., 1995).

Um outro achado interessante foi que no grupo controle, houve um aumento progressivo na concentração de F no osso total ao longo do tempo, sendo que em 180 dias os níveis ficaram bastante similares aos do grupo experimental. Tem sido relatado que os níveis de F no osso total tendem a aumentar ao longo da vida, porque pelo menos 99% do F retido no organismo está associado ao esqueleto (WHITFORD, 1996). Este aumento progressivo parece ter sido devido à ingestão contínua de F através da ração (Tabela 5). Se

tivesse sido utilizada uma ração de baixo conteúdo de F tivesse sido empregada, é possível que este aumento não tivesse sido observado. Da mesma forma, seria esperado que houvesse um aumento nos níveis de F incorporados no osso total nos animais do grupo experimental ao longo do tempo, devido à ingestão de F a partir da ração. A não ocorrência deste aumento sugere fortemente que existe um limite para a incorporação de F no osso total, limite este provavelmente relacionado ao número de sítios possíveis para ligação irreversível do F. Num trabalho prévio desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, onde se procurou determinar o intervalo de tempo necessário para eliminação do F incorporado ao osso após a ingestão crônica deste elemento através da água de beber (LEITE et al., 2006), a existência deste limite de incorporação de F no osso também foi sugerida, já que para o grupo que recebeu água contendo 15 µgF/mL por 60 dias e foi morto após 30, 90 e 180 dias depois do término da exposição ao F, os níveis de F presentes no osso total (em torno de 500 µg/g) foram similares em todos os períodos.

Os achados para as razões entre a concentração de F na superfície óssea e osso total (Tabela 4) refletem a diferente cinética e tipo de ligação do F nestes dois compartimentos, conforme estabelecido pelo modelo farmacocinético fisiologicamente baseado (RAO et al., 1995). Assim, na superfície óssea a incorporação de F seria lábil, e haveria um maior número de sítios de ligação possíveis por grama de osso, enquanto que no osso total esta incorporação seria irreversível, havendo um menor número de sítios de ligação possíveis por grama de osso.

Neste estudo longitudinal, não houve correlação estatisticamente significativa entre a concentração de F presente na superfície óssea e no plasma ($r=-0,245$, $p=0,083$). Uma

correlação positiva significativa entre os níveis de F presentes na superfície do fêmur e os níveis plasmáticos havia sido relatada anteriormente, em estudos de curta duração por BUZALAF et al. (2004, 2005). De fato, no presente estudo, as cinéticas de F no plasma e na superfície do fêmur ao longo do tempo se mostraram bastante diferentes. Esta diferença entre os dois compartimentos poderia ser explicada quando se considera a existência de um “pool” de F rapidamente passível de trocas na superfície óssea (WHITFORD, 1994b). Assim, o F acumulado na superfície óssea devido à ingestão aguda seria mobilizado para o plasma ao longo do tempo. Entretanto, o F presente no plasma é rapidamente excretado pela urina (conforme pode ser constatado na Tabela 8), já que o clearance renal do F é extremamente elevado (WATERHOUSE et al., 1980; SCHIFFL; BINSWANGER, 1982). Em adição, no presente estudo também foi observada uma excreção aumentada de F através das fezes no grupo experimental (Tabela 7). Há ainda que se considerar que o F presente na superfície óssea também vai sendo incorporado nas camadas mais internas do osso, embora isto seja observado em curto prazo e não deva ter influído no presente estudo (BUZALAF et al., 2005). Tudo isto poderia explicar a menor sensibilidade da análise plasmática para a detecção de níveis significativamente aumentados de F em estudos com este tipo de delineamento, bem como a ausência de correlação entre as concentrações de F no plasma e na superfície óssea.

Quando se relacionou a concentração de F presente no osso total com aquela presente no plasma, encontrou-se uma correlação negativa fraca, mas significativa ($r=-0,373$, $p=0,008$). Isto pode ser devido ao fato de que o F incorporado no osso vem do plasma. Tendo sido o presente estudo longitudinal, esta correlação negativa poderia refletir o clearance extra-renal do F (remoção do F do plasma pelo esqueleto).

A correlação entre a concentração de F presente no osso total e na superfície óssea foi positiva e significativa ($r=0,581$, $p<0,0001$). Esta correlação significativa indica que existe troca de F entre estes dois compartimentos (osso total e superfície óssea) com cinéticas diferentes, e tinha sido previamente relatada para exposições agudas (BUZALAF et al., 2004) e crônicas ao F (LEITE et al., 2006).

Com relação ao estudo metabólico realizado, os dados observados para o consumo de ração (Tabela 5) mostram que a administração da dose aguda subletal de F (50mg/Kg peso corporal) interferiu na quantidade de ração ingerida pelos animais até o período de 30 dias, tendo havido uma redução significativa para os animais do grupo experimental. Isto era esperado, devido às alterações causadas pela ingestão da dose aguda subletal de flúor (WHITFORD, 1996). Nos demais períodos experimentais, esta diferença não foi mais observada, indicando um retorno à normalidade no nível de ingestão de ração dos animais do grupo experimental. Este menor consumo de ração influenciou diretamente na ingestão de F a partir da ração, que também diminuiu no mesmo período, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Já a excreção fecal de F sofreu um aumento significativo nos animais do grupo experimental na primeira coleta (Tabela 7). A maior excreção fecal nos animais do grupo experimental na primeira coleta de fezes pode ter acontecido devido às alterações causadas pela ingestão da dose aguda subletal de F, conforme também foi observado para a quantidade de ração ingerida. Nos demais períodos experimentais, esta diferença não foi mais observada, indicando um retorno à normalidade no nível de excreção fecal de F dos animais do grupo experimental. Estes dados sugerem que a excreção fecal aumentada de F após a ingestão de uma dose aguda subletal pode ser um mecanismo protetor, acelerando a

remoção de F do organismo. A excreção fecal de F geralmente é baixa, em torno de 10-15% da dose de F ingerida (WHITFORD, 1996). Tem sido relatada uma excreção fecal de F aumentada em duas situações: quando existe um aumento na concentração plasmática de F ou um aumento na presença de cálcio na dieta (WHITFORD, 1994a). Conforme sugerido por WHITFORD (1994a), devido ao aumento dos níveis de F no plasma, o F passaria do plasma para a luz intestinal, sendo então excretado pelas fezes. No presente estudo, a coleta de fezes se iniciou 14 dias após a administração aguda subletal de F. A concentração de F plasmática 14 dias após a dose aguda de F não foi medida no presente estudo, mas é possível que estivesse ainda aumentada, o que elevaria a excreção fecal de F, indo de encontro aos achados de WHITFORD (1994a). Seria interessante monitorar a excreção fecal de F, bem como sua concentração plasmática, em períodos de tempo mais curtos após a ingestão de uma dose aguda subletal de F.

Um fato interessante quando se observa a tabela 7 é o aumento na excreção fecal de F na oitava coleta, quando comparada às demais, tanto para o grupo controle quando para o experimental. Este fato pode deve ter sido causado pela maior concentração de F presente na ração (36,0 mg/Kg) utilizada neste período (Tabela 6). Nas coletas 10, 11 e 12, observou-se uma tendência de aumento na excreção fecal de F no grupo experimental quando comparado ao controle, embora a diferença só tenha sido estatisticamente significativa na coleta 12. A razão deste aumento não pode ser respondida pelo protocolo do presente estudo. Pode-se especular que nesta faixa etária estaria acontecendo um pico de remodelação óssea, promovendo então uma remoção do F incorporado no osso, que seria eliminado em parte pelas fezes. De fato, no grupo experimental houve uma ligeira redução na concentração de F incorporado ao osso total de 90 para 180 dias, além de ter

havido um aumento na concentração de F incorporada na superfície óssea, o que de certa forma poderia sugerir uma remodelação óssea. No entanto, à primeira vista isto também deveria ocorrer no grupo controle, o que não foi observado. Assim, estes achados, bem como suas possíveis causas, precisam ser melhor investigados.

Com relação à excreção de F pela urina, na primeira coleta observou-se que a excreção urinária de F foi significativamente maior no grupo experimental quando comparado ao controle, o que indica que a dose de F excessiva administrada estava sendo eliminada também pela urina, à semelhança das fezes. Na segunda coleta, os volumes de urina coletados foram bastante reduzidos, e em alguns casos houve evaporação completa das amostras durante a coleta, impossibilitando a análise. Nesta coleta, foi observada uma grande diminuição na excreção urinária de F quando comparada à primeira coleta, e embora o grupo experimental tenha apresentado o dobro da excreção quando comparado ao controle, esta diferença não foi significativa. No entanto, devido ao problema mencionado acima, os dados da excreção urinária da segunda coleta devem ser interpretados com cautela. Nas outras coletas, os valores para o grupo experimental e controle foram similares, não havendo diferenças significativas entre ambos, à semelhança do que ocorreu para as fezes.

Chama a atenção o grande aumento na excreção urinária de F na oitava coleta. Este aumento ocorreu para ambos os grupos controle e experimental e, curiosamente, também foi observado para a excreção fecal de F. Conforme já foi mencionado anteriormente, durante a oitava coleta, foi utilizada a ração com maior conteúdo de F de todo o experimento, o que certamente contribuiu para estes achados. Todavia, quando se compara a concentração de F presente na ração utilizada na sétima coleta com a da oitava,

há uma diferença de 50% apenas, enquanto que o aumento nas excreções fecal e urinária de F foi da ordem de 5-8 vezes. Desta maneira, o aumento na concentração de F presente na ração sozinho não poderia explicar estes achados. Poder-se-ia sugerir que, em adição, poderia estar ocorrendo, neste período, uma remodelação óssea mais extensa, de forma que o F poderia estar sendo liberado do osso e excretado, tanto pela urina quanto pelas fezes. Em trabalho realizado com humanos, SPENCER et al. (1975) também relataram que quantidades apreciáveis de F previamente retidas no esqueleto, continuam a ser liberadas e excretadas através dos rins por períodos prolongados de tempo. A utilização de uma ração com baixo conteúdo de F num experimento com protocolo similar ao do presente estudo poderia ser elucidativo com relação a este aspecto.

9 - CONCLUSÕES

- Os grupos que receberam a dose aguda de F tiveram na primeira coleta uma diminuição na quantidade de F ingerido através da ração, embora esta diferença só tenha sido significativa para o grupo que recebeu F e foi eutanasiado após 30 dias, quando comparado ao grupo controle, que recebeu água deionizada e foi eutanasiado também após 30 dias. Nas coletas seguintes, não foi observada diferença significativa entre quantidade de ração consumida pelos grupos controle e experimental.
- A excreção fecal de F foi significativamente maior no grupo experimental quando comparado ao controle na 1^a e na 12^a coletas. Nas demais coletas, os valores para o grupo experimental e controle foram similares, não havendo diferenças significativas entre ambos.
- A excreção urinária de F foi significativamente maior no grupo experimental quando comparado ao controle na 1^a coleta. Nas demais coletas, os valores para o grupo experimental e controle foram similares, não havendo diferenças significativas entre ambos.
- Os níveis plasmáticos de F do grupo controle foram constantes ao longo do tempo, e similares aos do grupo experimental que foi eutanasiado aos 30 dias. Para os grupos experimentais que foram eutanasiados após 90 e 180 dias, houve uma redução significativa nos níveis plasmáticos de F em relação ao grupo controle.
- Para o grupo experimental, a concentração de F na superfície do fêmur foi significativamente maior em relação ao grupo controle no tempo de eutanásia de 30 dias apenas, sendo que para os demais períodos experimentais, apesar de a

concentração de F ser maior no grupo experimental quando comparado ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Para ambos os grupos pôde ser observado um aumento nos níveis de F na superfície óssea ao longo do tempo. Os dados sugerem que o F incorporado à superfície óssea de ratos a partir de uma exposição aguda não é irreversivelmente ligado, mas vai sendo perdido ao longo do tempo, parecendo ser completamente perdido entre 90 e 180 dias após a exposição.

- O grupo experimental apresentou concentrações similares de F no osso total nos diferentes tempos de morte, e estes níveis foram similares aos encontrados para o grupo controle, no tempo de eutanásia 180 dias, não havendo significância estatística. O grupo controle, nos tempos de morte 30 e 90 dias apresentou valores significativamente menores quando comparados aos demais. Assim, os níveis de F incorporados no osso total 30 dias após uma ingestão aguda subletal não parecem ser perdidos ao longo do tempo, parecendo ser este estoque irreversível. A não ocorrência de aumento ao longo do tempo nos níveis de F no osso total do grupo experimental sugere que existe um limite para a incorporação de F no osso total, provavelmente relacionado ao número de sítios possíveis para ligação irreversível do F.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGMAR-MANSSON, B.; WHITFORD, G.M. Single fluoride doses and enamel fluorosis in the rat. *Caries Res*, v.19, p.145-152, 1985.
2. ANGMAR-MANSSON, B.; LINDH, U.; WHITFORD, G.M. Enamel and dentine fluoride levels and fluorosis following single fluoride doses: a nuclear microprobe study. *Caries Res*, v. 24, p.258-262, 1990.
3. ASSIS, G.F. et al. Mecanismos biológicos e influência de fatores ambientais na fluorose dentária e participação do flúor na prevenção da cárie. Revisão de literatura. *Rev Fac Odontol Bauru*, v. 7, n. ¾, p. 63-70, 1999.
4. BAUD, C.A.; BANG, S. Electron probe and x-ray diffraction microanalysis of human enamel treated in vitro by fluoride solution. *Caries Res*, v. 4, p. 1013-4, 1970.
5. BEZERRA DE MENEZES, L.M.; VOLPATO, M.C.; ROSALEN, P.L. F incorporado na superfície óssea como indicador de intoxicação aguda. In: Anais da XIII Reunião Anual da SBPqO, 1996. p. 194.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 76.872 de dezembro de 1975. Regulamente a lei nº 6050 de 24 de maio de 1974. Brasília, DF, D.O U, 1975.
7. BURT, B.A. The changing patterns of systematic fluoride intake. *J Dent Res*, v.71, n.5, p.1228-37, 1992. Special Issue.

8. BUZALAF, M.A.R. Fatores de risco para fluorose dentária e biomarcadores de exposição ao F. Dissertação (Livre-Docente) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2002.
9. BUZALAF, M.A.R. et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol*, v. 28, n.4, p.249-52, 2004.
10. BUZALAF, M.A.R. et al. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. *J. Analyt. Toxicol*, v. 29, p. 810-3, 2005.
11. CASLAVSKA, V.; MORENO, E.C.; BRUDEVOLD, F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Archs Oral Biol*, v. 20, p. 333-9, 1975.
12. CURY, J.A. Fluoretação da água: benefícios, riscos e sugestões. *ROBRAC*, v.2, n.5, p.32-33, 1992.
13. DEAN, H.T.,ARNOLD, F.A Jr, ELVOVE, E.Domestic water and dental caries. Additional studies of relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14 years. *Public Health Rep (U.S)*, v.57, p. 1155-60, 1942.
14. DenBESTEN, P. K., THARIANI, H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. *J Dent Res*, v. 71, n. 5, p.1238-1243, 1992.

15. FEATHERSTONE, J.D.B. et al. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res*, v.69, p.620-5, 1990
16. FEATHERSTONE, J. D. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dental Epidemiol.* v. 27, n. 1, p. 31-40, 1999.
17. FEJERSKOV, O. et al. Dental tissue effect of fluoride. *Adv Dent Res*, v. 8, p. 15-31, 1994.
18. FEJERSKOV, O., EKSTRAND, J., BURT, B. A. *Fluoride in dentistry*. 2.ed: Copenhagen: Munksgaard Int Publ, 1996. 363p.
19. FISKE, C.H., SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, v. 66, p. 375-400, 1925.
20. HARINARAYAN, C.V. et al. Fluorotoxic metabolic bone disease: an osteo-renal syndrome caused by excess fluoride ingestion in the tropics. *Bone*, v. 39, n. 4, p. 907-914, 2006.
21. HERMAN, J.R.; MASON, B.; LIGHT, I. Fluoride in urinary tract calculi. *J Urol*, v.80, p. 263-68, 1958.
22. HERMAN, J.R.; PAPADAKIS, L. The relationship of sodium fluoride to nephrolithiasis in rats. *J Urol*, v.83, p.799-800, 1960.
23. HODGE, H.C. Metabolism of fluorides. *J Am Dent As*, v. 177, p. 313-6, 1961.

24. HOROWITZ, H.S. The effectiveness of community water fluoridation in the United States. *J Publ Hlth Dent*, v.56, n.5, p.258-8, 1996. Special Issue.
25. JACKSON, D.; WEIDERMAN, S.M. Fluorine in human bone related to age and the water supply of different regions, *J Path Bact*, v. 76, p. 451-9, 1958.
26. KOSKINEN-KAINULAINEN, H.; LUOMA, H. Excretion, serum, bone and kidney levels of F in rats after a high single dose of F and Mg + F. *Magnesium*, v. 6, n.4, p.212-19, 1987.
27. KRISHNAMACHARI, K.A.V.R. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. *Prog. Food Nutr. Sci*, v. 10, p. 279-314, 1986.
28. LARSEN, M.J. Dissolution of enamel, *Scand J Dent Res*, v. 81, p. 518-22, 1973
29. LEITE, A.L. et al. Cinética de remoção do flúor incorporado ao esqueleto de ratos expostos cronicamente a diferentes doses de flúor. *Pesq. Odontol. Bras*, v. 20, supl., p. 127 (Res. Ic061).
30. LEWIS, D.W. et al. Recommendations regarding total daily fluoride intake for Canadians. *J Can dent Assoc*, v.60, p. 1050-60, 1994
31. LOTT, H.V. Fluorine release from enamel, *Odontol Acta*, v. 6, p.10-4, 1962.

32. MELBERG, J.R.; LAAKSO, P.V.; NICHOLSON, C.R. The acquisition and loss of fluoride by topically fluoridated human tooth enamel. *Arch Oral Biol*, v. 11, p. 1213-20, 1966.
33. MELSEN, F.; ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L. Clinical Aspects of Fluoride in Bone In: FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B.A. *Fluorides in Dentistry* 2. ed. Copyright: Munksgaard, 1996, p. 96-111.
34. MESSER, H.H.; OPHAUG, R.H. Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. *J Dent Res*, v. 72, n.3, p. 619-22, 1993.
35. OGGARD, B.; CRUZ, R.; ROLLA, G. Fluoride dentifrices: a possible cariostatic mechanism. In: EMBERY, G, ROLLA, G. *Clinical and biological aspects of dentifrices*. Oxford Medical publications 1992, p.305-12
36. PARSONS, V. et al. Renal excretion of fluoride in renal failure and after renal transplantation. *Br Med J*. v.1, p. 128-30, 1975.
37. PERKINSON, J.D. et al. Metabolism of fluorine -18 in domestic animals. *Am J Anat*, v. 182, p. 383-9, 1955.
38. POSNER, A.S. The effect of fluoride on bone mineralization. In: FEJERSKOV, O; EKSTRAND, J; BURT, B.A. *Fluoride in dentistry*. 2 ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996, p. 88-95.

39. RAO, H.V. et al. A physiologically based pharmacokinetic model for fluoride uptake by bone. *Reg. Toxicol. Pharmacol*, v. 20, p. 30-42, 1995.
40. ROLLA, G.; SAXEGAARD, D. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. *J Dent Res*, v. 69, p. 780-5, 1990.
41. SAMPAIO, F.C. Fluoride exposures and biomarkers in humans. Thesis. Faculty of Dentistry, University of Oslo, Norway, 2000.
42. SCHIFFL, H.; BINSWANGER, L. Renal Handling of fluoride in healthy man. *Renal Physiol*, v.5, p. 192-195, 1982.
43. SMITH, F .A.; EKSTRAND, J. The occurrence and the chemistry of fluoride. In: FEJERSKOV, O; EKSTRAND, J; BURT, B.A. *Fluoride in dentistry*. Copenhagen, Munksgaard. 2 ed. 1996. p. 17-23
44. SPENCER, H. et al. Excretion of retained fluoride in man. *J. Appl. Physiol*, v.38, n.2, p. 282-287, 1975.
45. TAVES, D.R. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta*, v. 15, p. 1015-23, 1968.
46. Ten CATE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.B. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: FEJERSKOV, O; EKSTRAND, J; BURT, B.A. *Fluoride in Dentistry*. Copenhagen, Munksgaard. 2. ed. 1996, p. 252-72

47. THYLSTRUP, A; FEJERSKOV, O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological changes. *Communit Dent Oral Epidemiol*, v.6, p.329-37, 1978.
48. VIEGAS, A.R. Fluoretação da água de abastecimento público. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, v.41, n.4, p.202-4, 1987.
49. VINEGAR, C.S. et al. Polychlorotrifluoroethylene (PCTFE) oligomer pharmacokinetics in Fisher 344 rats: development of a physiologically based model. *Fund. Appl. Toxicol*, v.18, p. 504-514, 1992.
50. WALLACE-DURBIN, P., The metabolismo f fluorine in rat using F-18 as a tracer, *J Dent Res*, v.33, p. 789-800, 1954.
51. WATERHOUSE, C.; TAVES, D.R.; MUNZER, A. Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and resorption. *Clin Sci*. v.58, p.145-152, 1980.
52. WEATHERELL, J.A.; WEIDMANN, S.M. The distribution of organically bound sulphate in bone and cartilage during calcification. *Biochem J*. v. 89, p. 265-7, 1963.
53. WHITFORD, G.M; PASHILEY, D.H.; REYNOLDS, K.E. Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. *Amer J Physiol*, v.236, p.F141-8, 1979.

54. WHITFORD, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res*, v.69, p.539-49, 1990. Special Issue
55. WHITFORD, G.M. Effects of plasma fluoride and dietary calcium concentrations on GI absorption and secretion of fluoride in the rat. *Calcif Tissue Int*, v.54, n.5, p 421-5, 1994a.
56. WHITFORD, G.M. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.*, v. 8, n.1, p.5-14, 1994b.
57. WHITFORD, G. M. Acute Fluoride Toxicity In: The Metabolism and Toxicity of Fluoride, Monographs in oral science 16., 2 ed, Basel: Karger. 1996a, cap. VII, p. 112-136.
58. WHITFORD, G.M. Fluoride toxicology and health effects. In: FEJERSKOV, O.;EKSTRAND, J; BURT, B.A. *Fluoride in Dentistry*. Copenhagen, Munksgaard. 2. ed. 1996b. p. 167-181
59. WHITFORD, G.M. et al. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res* v.36, p.256-65, 2002.
60. ZIPKIN, I.; LEE, W. A., LEONE, N. C. Fluoride content of urinary and biliary tract calculi. In: McClure, F. J. *Fluoride in drinking waters*, PHS Publ, 1962, p. 435-37.
61. ZIPKIN, I.; SCHAER, H.; LEE, W.A. The effect of fluoride on the citrate content of bones of growing rat. *Arch Oral. Biol*, v. 8, p. 119-26, 1963.