

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELA PEREIRA

EFEITOS DA SUSPENSÃO DA ADMINISTRAÇÃO SUB-  
CRÔNICA DE FLUORETO DE SÓDIO EM RATOS E SEUS  
EFEITOS AMNÉSICOS

CURITIBA

2009

MARCELA PEREIRA

EFEITOS DA SUSPENSÃO DA ADMINISTRAÇÃO SUB-  
CRÔNICA DE FLUORETO DE SÓDIO EM RATOS E SEUS  
EFEITOS AMNÉSICOS

Trabalho de monografia apresentado ao departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, como Requisito para a obtenção de título de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Roberto Andreatini

CURITIBA

2009

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me guardado e ajudado a chegar até aqui, por ter guiado meus caminhos e me sustentado a cada dia. Por ter me dado inteligência e capacidade para concluir mais esta etapa de minha vida. Pelo amor e paciência em me ensinar e tirar boas lições e aprendizados até mesmo de meus erros.

A meus pais por todo amor e ajuda que me deram durante todo este tempo. Pela compreensão e esforço para me ajudar a seguir neste difícil caminho. Pela educação que me deram e por terem me ensinado o valor do aprendizado.

A Rosane da coordenação da biologia porque sem a ajuda dela eu não teria vindo para Curitiba para fazer esta faculdade e também porque sem ela eu não teria terminado a faculdade.

A meu orientador, Roberto Andreatini, por toda a paciência em me ensinar o que eu não sabia, por me explicar tantas vezes quanto necessário, principalmente sobre o complicadíssimo mundo da estatística, que é difícil de assimilar. Por ser ético e direito e por ser enfim um orientador exemplar. Obrigada por ter me aceitado como orientada na graduação e agora nesta nova fase do mestrado.

A meus amigos, tanto das horas vagas na faculdade quanto do laboratório, que toleram meu mau humor constante e meus atrasos por nunca conseguir levantar tão cedo quanto deveria. Que me ajudam quando invento de fazer tudo ao mesmo tempo achando que vou de uma semana para outra descobrir todas as respostas do mundo e depois descubro que por ser uma só não vou dar conta. Ao Juliano por me dar força e incentivar a inovar, a encarar as coisas de maneira diferente e por estar sempre presente.

Enfim, a todos que me ajudam nesta caminhada rumo ao conhecimento e a descobertas, obrigada pela paciência, companheirismo, carinho, ajuda e respeito.

*Ele é como árvore plantada junto à corrente de águas, que,  
No devido tempo, dá o seu fruto, e cuja folhagem não murcha;  
E tudo quanto ele faz será bem sucedido.*

Salmo 1:3

## RESUMO

O flúor é amplamente utilizado como medida preventiva para o tratamento de cáries, sendo encontrado na água de abastecimento, produtos dentais, medicamentos e em alimentos. Tal variabilidade de fontes pode levar a uma ingestão elevada de flúor e conseqüentemente a efeitos tóxicos deste no organismo. Estudos prévios de nosso laboratório (Chioca *et. al.*,2008) sugerem que fluoreto de sódio (NaF) podem levar à alterações de memória, sendo que tais conclusões se basearam em testes de habituação em campo aberto. No presente estudo foi avaliado o efeito da administração sub-crônica de NaF na concentração de 100ppm durante 30 dias, seguida da interrupção do tratamento por 15 dias, com intuito de verificar se tal retirada leva a uma melhora na resposta ao teste de habituação em campo aberto. No presente estudo também foi avaliada o nível de monoaminas e seus metabolitos em áreas cerebrais (hipocampo, estriado, amígdala e córtex frontal). Foram utilizados ratos Wistar. Os animais foram divididos em três grupos: controle (tratado apenas com água de abastecimento – 1,54 ppm) por 45 dias; tratamento 1, com 15 dias de água de abastecimento seguidos de 30 dias com NaF (100ppm); tratamento 2, com 30 dias de NaF (100ppm) seguido de 15 dias de água de abastecimento. Outro resultado apresentado foi um aumento no nível de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) no estriado, hipocampo e córtex, bem como um aumento de dopamina (DA) apenas no estriado. Os animais tratados com flúor também apresentaram fluorose leve e não foram apresentadas alterações significantes no peso corporal, consumo de comida ou água durante o tratamento. Os resultados obtidos mostraram que a retirada do flúor (tratamento 2) não leva a uma melhora na atividade de habituação no teste de campo aberto, sendo assim, o período proposto neste estudo não apresentou melhora nos efeitos deletérios do flúor na memória dos animais.

*Palavras-chave:* Memória; Monoaminas; Habitação em campo aberto; Fluoreto de sódio;

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b><u>INTRODUÇÃO.....</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>2.</b>	<b><u>OBJETIVOS.....</u></b>	<b><u>20</u></b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3.</b>	<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
3.1	ANIMAIS.....	21
3.2	TRATAMENTO.....	21
3.3	MODELO COMPORTAMENTAL.....	22
3.3.1	Teste do Campo Aberto .....	22
3.4	DETERMINAÇÃO DE FLUOROSE.....	22
3.5	DOSAGEM DE MONOAMINAS E SEUS METABÓLITOS .....	23
3.6	ANÁLISE DE DADOS.....	23
<b>4.</b>	<b><u>RESULTADOS.....</u></b>	<b><u>25</u></b>
4.1	ANÁLISE DO CONSUMO DE COMIDA, INGESTÃO DE ÁGUA E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS.....	25
4.2	AVALIAÇÃO DA FLUOROSE DENTAL.....	25
4.3	ANÁLISE DO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	26
4.4	ANÁLISE DA DOSAGEM DE MONOAMINAS E SEUS METABÓLITOS.....	28
<b>5.</b>	<b><u>DISCUSSÃO.....</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b>6.</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>36</u></b>

## 1. INTRODUÇÃO

Por seus efeitos anticariogênicos o flúor vem sendo empregado para a prevenção da cárie a muito tempo. A descoberta de tal efeito anticariogênico ocorreu no início do século quando o dentista Frederick McKay observou que em crianças de certas áreas dos Estados Unidos havia baixa ocorrência de cáries e um esmalte dental visivelmente diferente, onde era possível observar manchas brancas (hoje já se sabe que tais manchas são decorrentes da fluorose dental) em comparação com crianças de áreas diferentes. Em seus estudos ele avaliou as crianças das duas áreas e concluiu que a única explicação para essa baixa prevalência seria a água que consumiam que continha uma maior concentração de flúor, e a associaram a baixa prevalência de cáries na população local. A partir de tal descoberta foi proposta a fluoretação da água como medida para a prevenção de cáries. A adição de flúor à água como medida de saúde pública para prevenir a cárie teve início nos Estados Unidos e Canadá onde em 1945 ocorreram três estudos piloto. A partir dos resultados obtidos por estes estudos ficou definida a segurança da utilização de flúor na água para a prevenção de cáries, necessitando, porém ainda de se estabelecer a dose ideal para evitar possíveis quadros de fluorose. No Brasil a primeira menção da adição de flúor a água ocorreu em 1952 no X Congresso Brasileiro de Higiene (NARVAI, 2000).

Em 1951 a American Dental Association/ADA, estabeleceu que a dose ideal seria de 1ppm (ADA, 1951), ou seja, 1 mgF/l . No Brasil, em 1974, a partir da lei nº 6050, que dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas de abastecimento, logradouros onde existia estação de tratamento passaram a oferecer água fluoretada à população. Com a implantação do programa Brasil Sorridente (2005), do Ministério da Saúde, foi apresentada, entre as medidas preventivas, garantia da fluoretação da água em 100% dos municípios com sistema de abastecimento.

Um dado preocupante relacionado a concentrações seguras para a ação do flúor no combate as cáries foi mostrado ao se estudar crianças na fase pré-escolar. Um estudo feito em Piracicaba-SP mostrou que apesar das concentrações ideais na água de abastecimento, o acréscimo de flúor presente no dentifício e ingerido durante a escovação dos dentes e da alimentação, nos faz estar expostos a uma dose significativamente maior que a estabelecida como segura, dose esta maior principalmente quando se trata de crianças que acabam ingerindo dentifício durante

a escovação mais facilmente que adultos. Esse dado foi justificado pelo fato de que, nessa idade as crianças não possuem total controle sobre os músculos da deglutição. De acordo com estudos feito pela Unicamp com 39 crianças observou-se que apesar da concentração de flúor da água do local estar dentro do limite estabelecido, ocorria um aumento na taxa de flúor baseado em outras fontes de flúor que não a água levando a uma exposição a 0,009mgF/Kg em desacordo com a dose aceitável de 0,007 mgF/Kg, sendo que de acordo com este estudo 55% do flúor ingerido é proveniente da deglutição do dentifrício (LIMA *et. al.*, 2001). Corroborando estes dados, Bentley e colaboradores (1999), detectaram ingestão média por escovação de 0,42 mg de dentifrício a 1450 ppm, e 0,10 mg quando o dentifrício era de 400 ppm. Ainda Pessan e colaboradores. (2003), constataram ser o dentifrício a principal fonte de flúor ingerida por crianças de quatro a sete anos de idade, sendo  $0,018 \pm 0,012$  mg/kg/dia proveniente da dieta enquanto  $0,037 \pm 0,038$  mg/kg/dia do dentifrício. Considerado o limite máximo de ingestão diária de flúor de 0,07 mg/Kg de peso corporal, os autores alertam para a participação do dentifrício na extrapolação desse limite.

Por um longo período acreditou-se que a ação do flúor se baseava na formação de fluoroapatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}_{(s)}$ ] por incorporação do flúor ao esmalte ainda na fase pré-eruptiva da dentição, sendo por este motivo receitado a mulheres no período de gestação e a crianças no intuito de tornar o esmalte dos dentes resistentes a desmineralização (ASSIS *et al.*, 1999; MULLENIX *et al.*, 1995). Porém, sabe-se hoje que a ação anticariogênica do flúor é local, pois participa no processo de desmineralização e remineralização a que são submetidos os dentes devido à ação de ácidos bacterianos. Tendo também por esta causa, sua participação nos processos de desmineralização e remineralização, que se formam as manchas características da fluorose dental em pessoas submetidas a altas concentrações de flúor, sendo estas manchas consequência de um aumento da porosidade do esmalte (MALTZ; WANNMACHER, 1999).

A absorção do flúor se dá principalmente em pH ácido, portanto quando em soluções ácidas, ele pode ser absorvido pela mucosa bucal, porém a principal área de absorção do flúor é no trato gastrointestinal, costuma também ocorrer recaptção de flúor quando o pH urinário esta ácido tornando o tempo de ação do flúor no organismo maior. Este íon é absorvido passivamente, principalmente na sua forma molecular, ácido hidrófluorídrico (HF,  $\text{pka} = 3,4$ ) (WHITFORD, 1990). Esta maior

absorção de flúor pelo trato gastrointestinal foi comprovada pelo trabalho de Nopakun *et. al.* (1989), onde ele mostra o estômago e o trato gastrointestinal como áreas importantes de absorção por causa do pH do meio, ou seja, variações no pH destas áreas afetam diretamente a absorção do flúor. No estudo ele mostra que após dez minutos da administração de flúor por intubação na concentração de 50ppm grande parte do flúor já havia sido absorvido, e após 46 a 60 minutos, 75 a 80% do total administrado já havia sido absorvido. Para provar a alta de absorção destas áreas os animais foram sacrificados em intervalos de tempo de 10 a 120 minutos e a concentração de flúor na luz do trato gastrointestinal foi medida. Uma vez que soluções ácidas facilitam a absorção do flúor, um quadro de acidez estomacal pode levar a uma maior absorção e conseqüentemente os efeitos tóxicos (SILVA, 2003).

Outra característica do flúor iônico é de não se ligar a proteínas plasmáticas, embora exista uma pequena fração de flúor ligada à macromolécula no plasma que aparentemente não é intercambiável com o flúor iônico; por isto, se torna possível a mensuração da quantidade de flúor presente no organismo, ou seja, as concentrações extracelulares, com base na concentração encontrada no plasma e fluido intersticial (WHITFORD,1990; SPITTLE, 1994).

No que concerne à toxicidade do produto em termos gerais o flúor presente na água de abastecimento não se encontra em níveis tóxicos, porém, sendo este presente na natureza e também sendo utilizados em muitos produtos industrializados, a soma de todos estes fatores pode levar à intoxicação tanto crônica (intoxicação a longo prazo baseada no acúmulo da substância no organismo levando a efeitos deletérios) ou aguda (contato único cuja concentração é suficiente para provocar os efeitos deletérios ou até mesmo morte). (MULLENIX *et al.*, 1995; MALTZ; WANNMACHER, 1999).

Quando o flúor não se encontra em quantidades elevadas no organismo, após sua absorção o flúor vai para corrente sanguínea, parte se acumula nos ossos e o restante é excretado principalmente pela urina, fezes, leite materno e suor (WHITFORD, 1990). Porém quando em quantidades elevadas ele pode se acumular em outros tecidos, como fígado, glândulas, cérebro (por conseguir atravessar a barreira hematoencefálica que não é totalmente impermeável ao flúor), pulmão e rim. Neste último pode levar a formação de cálculos bem como, por ser um elemento muito negativo, pode levar a uma acidificação do filtrado (urina) e, por conseqüência,

ser reabsorvido permanecendo muito mais tempo no organismo e levando a efeitos deletérios ao indivíduo (SILVA, 2003; WHITFORD, 1990).

Dentre os sinais e sintomas de uma intoxicação aguda por flúor, encontram-se: vômito, diarreia, broncoespasmo, fibrilação ventricular, pupilas dilatadas, hemoptise, câimbras, colapso cardíaco, hipercalcemia, hipocalcemia e comprometimento da função renal (LITOVITZ *et. al.*, 1990; TAKASE *et al.*, 2004). A literatura apresenta estimativas muito variadas a respeito das doses tóxicas de flúor. Whitford (1990) estimou, pela média de quatro casos fatais, que em uma intoxicação aguda a dose provavelmente tóxica (DPT) sugerida para humanos seria de 5mg/kg, baseando-se nas alterações renais, gástricas e metabólicas que a exposição ao íon causa (WHITFORD, 1990).

Em uma revisão, Spittle (1994), relata aspectos clínicos de intoxicações crônicas pelo flúor em humanos e entre os sinais e sintomas relatados encontram-se, enxaqueca, distúrbios visuais e depressão para indivíduos que estavam recebendo 1 mg de F diariamente; fluorose esquelética, depressão, apatia mental e distúrbios de memória em trabalhadores de uma mina de alumínio. Outras alterações citadas por Spittle (1994) por tal intoxicação foram fadiga progressiva generalizada associada a declínio mental, quadros de esquecimento, problemas para coordenar os pensamentos e redução na habilidade de escrever.

O flúor em baixas doses pode levar à intoxicação (intoxicação crônica). Tal intoxicação se dá tanto em tecidos como ossos e dentes quanto de tecidos moles, como cérebro, rins, glândulas, fígado entre outros (MICHAEL *et al.*, 1996). O flúor apresenta afinidade com o fosfato, formando a fluoroapatita, e com o cálcio (elemento essencial a várias funções fisiológica), formando o fluoreto de cálcio, esta ligação forma substâncias pouco solúveis que terão um efeito deletério em ossos e dentes, por estes apresentarem concentrações elevada de cálcio e fosfato. Os efeitos deletérios do flúor nestes tecidos são: alterações dentárias, como fluorose; e óssea, como a hipercalcificação, chamada osteopetrose ou osteosclerose, tornando os ossos frágeis (FABRE; TRUHAUT, 1971; HARINARAYAN *et. al.*, 2006).

Em relação às alterações teciduais causadas pelo flúor, pode-se dizer que em tecidos como ossos e dentes sua ação é bifásica, ou seja, em baixas doses ele apresenta efeito benéfico, porém em altas doses seu efeito é deletério. Em estudo feito em tecido ósseo por Pay *et. al.* (1995) foi mostrado que o flúor em baixas doses pode ter efeitos proveitosos como estimulação de osteoblastos e em altas doses,

porém leva a supressão dos mesmos e alteração na matriz óssea por erros no processo de mineralização que levam a uma diminuição de resistência óssea (OZSVATH, 2009). A ingestão excessiva de fluoreto durante o período de formação dentária leva ao desenvolvimento da fluorose dentária. Este é um efeito de uma toxicidade crônica do fluoreto que afeta os ameloblastos, células responsáveis pela formação do esmalte dental, quando se encontram em fase de secreção e/ou de maturação. Nesta fase as substâncias necessárias para a formação do esmalte dentário chegam pelos vasos sanguíneos e o aumento do conteúdo mineral no esmalte é dependente da perda de proteína e de fluído, assim, acredita-se que nos quadros de fluorose ocorra alteração de esmalte em decorrência de alteração enzimática e conseqüente alteração na taxa de degradação de proteínas por ação enzimática na área, sendo esta a responsável pelas alterações na estrutura do esmalte. A formação de esmalte fluorótico pode ocorrer então, para os dentes permanentes, por um período que compreende desde o nascimento até os 5 e 6 anos de idade que é o período de amelogênese da maioria dos elementos dentários. O esmalte fluorótico formado irá apresentar hipomineralização e porosidade quando comparado a um dente normal. A fluorose em uma condição dose e tempo dependente, sendo que clinicamente pode ser identificada em diversos graus. O índice de fluorose proposto por Thylstrup e Fejeskov (1978) baseado no aspecto clínico do esmalte dental apresenta 9 graus diferentes de severidade, sendo 0 (sem fluorose) e o grau 9 a fluorose mais severa, pois apresenta alteração da anatomia dentária e de cor. (BROWNE *et al.*, 2005; BUZALAF, 2008). Quanto aos efeitos em outros tecidos, podem ser citados, por exemplo, o efeito na glândula tireóide, onde a intoxicação por flúor leva a uma hipofuncionalidade da glândula por prejudicar sua capacidade na utilização do iodo (HARRIS *et al.*, 1954). Foi também demonstrado um comprometimento hepático por intoxicação por flúor, uma vez que este está intimamente relacionado ao metabolismo das substâncias que entram na corrente sanguínea. Estudos feitos por Chinoy *et al.* (1993) e por Bouaziz *et al.* (2006) mostraram alterações funcionais, bioquímicas, degenerativas e inflamatórias no fígado. Em termos moleculares foram também observadas alterações no DNA por intoxicação por flúor. No trabalho foi utilizada cultura de tecido hipocampal e demonstrado que o flúor apresenta efeito neurotóxico por alterar a fase S do ciclo celular, causando também alteração na regulação de NF- $\kappa$ B e alterações a nível de DNA, feita por ensaio cometa (ZHANG *et al.*, 2008).

A barreira hematoencefálica é relativamente impermeável ao flúor, porém se este estiver em concentrações muito altas, seja por finalidades terapêuticas ou por estar disponível em grandes quantidades no meio ambiente, pode transpô-la (SPITTLE, 1994). A exposição ao flúor não tem mostrado efeitos óbvios no sistema nervoso central, porém, tal elemento pode estar ligado a disfunções mais sutis no cérebro e tal questão é ainda muito pouco explorada (MULLENIX *et al.*, 1995).

Estudos têm sido realizados, em animais e *in vitro*, com o propósito de tentar esclarecer os possíveis mecanismos pelos quais o flúor estaria exercendo seus efeitos neurotóxicos, resultando em alterações comportamentais e bioquímicas em animais (MULLENIX *et al.*, 1995; PAUL *et al.*, 1998; TRABELSI *et al.*, 2001; EKAMBARAM; PAUL, 2001; BHATNAGAR *et al.*, 2006) e danos de cognição e memória em humanos (SPITTLE, 1994; LU *et al.*, 2000; XIANG *et al.*, 2003). Estudos mencionam alterações também na membrana lipídica em consequência da intoxicação por flúor, levando a alterações na fluidez, estabilidade e permeabilidade da membrana (GUAN *et al.* 1998). Outros mecanismos propostos foram: aumento do estresse oxidativo (SHIVARAJASHANKARA *et al.*, 2002b); redução da atividade de enzimas, como a acetilcolinesterase cerebral e colinesterase plasmática (PAUL *et al.*, 1998; EKAMBARAM; PAUL, 2001; EKAMBARAM; PAUL, 2003) e redução nos receptores nicotínicos cerebrais (SHAN *et al.*, 2004; LONG *et al.*, 2002).

Evidências têm mostrado que a neurotoxicidade pode ser um dos principais mecanismos de ação do flúor e que tal efeito tóxico é ainda mais acentuado quando o flúor (F) se encontra em associação com o alumínio, formando  $\text{AlF}_3$ . Neste caso a toxicidade esta relacionada à geração de radicais livres (ROS e RNS), inibição de enzimas antioxidantes, alterações em atividade mitocondrial com decréscimo na produção de energia, alterações no transporte de glutamato, decréscimo da atividade da superóxido desmutase (SOD), ativação alterada de proteína G, apoptose em algumas áreas cerebrais como o hipocampo e alterações a nível de DNA e sinapses (BLAYLOCK, 2004). Ênfase deve ser dada às alterações que o flúor acarreta na homeostase do glutamato e, por conseguinte de seus receptores no organismo, uma vez que estes receptores se encontram em abundância tanto no cérebro quanto em outros locais, como pâncreas, pulmão, coração, células endoteliais, células imunes e ovários. No sistema nervoso central, o glutamato esta relacionado a atenção, alerta e aprendizado, bem como na formação de sinapses entre neurônios, direcionando o crescimento dos cones neuronais.

Varner *et al.* (1998) realizaram um trabalho, procurando comparar as alterações decorrentes de exposição a fluoreto de alumínio e fluoreto de sódio. Foram utilizados 27 ratos machos Long-Evans que foram divididos em três grupos, um recebendo  $AlF_3$  (2,1ppm de NaF), um recebendo NaF (2,1ppm) e o grupo controle; o tratamento teve duração de 52 semanas. Neste estudo ocorreu uma maior taxa de mortalidade entre os animais tratados com  $AlF_3$  do que com os tratados com NaF. Ainda em relação aos animais tratados com  $AlF_3$ , nas análises bioquímicas foi observada uma maior concentração de Al em tecidos como cérebro e rim e nas análises de microscopia foram observadas alterações morfológicas no rim e córtex e hipocampo. Porém é importante ressaltar que estas diferenças também estão presentes se comparados os animais dos NaF com o controle. Outra forma possível de ação do flúor para levar à toxicidade mencionada é alteração no nível de proteínas no organismo ou formação de proteínas anômalas. A ponte de hidrogênio flúor amida é a segunda mais forte conhecida, tornando o flúor um potente competidor dos íons H nas ligações N-H, sendo assim, o flúor poderia interferir nos sítios chaves dos sistemas biológicos (SPITTLE, 1994).

Em trabalho feito sobre a neurotoxicidade do flúor, foi observado um aumento significativo nos níveis de flúor no plasma e cérebro por exposição ao fluoreto de sódio em ratos Sprague-Dawley, de ambos os sexos. Os animais que receberam 75 a 125 ppm de flúor por 6 semanas, após um intervalo de 3 semanas, apresentaram níveis plasmáticos de 0.059 a 0.640 ppm flúor, similar aos relatados em humanos expostos a 5-10 ppm de flúor a qual gira em torno de 0.076-0.25. Os animais tratados com concentrações mais elevadas de NaF também apresentaram uma ruptura do padrão comportamental quando expostos a um novo ambiente, sendo este efeito observado de maneira mais pronunciada nas fêmeas, que também apresentaram uma maior concentração de flúor plasmático que nos machos. Estas diferenças podem ser decorrentes das interações do flúor com os diferentes padrões hormonais existentes entre machos e fêmeas (MULLENIX *et al.*, 1995).

Considerando que o desenvolvimento do SNC pode sofrer distúrbios causados por alterações hormonais, Trabelsi *et al.* (2001), pesquisaram a possível influência do flúor no desenvolvimento e funcionamento da glândula tireóide e no desenvolvimento cerebelar. Esta proposta fundamenta-se na premissa da participação dos hormônios tireoidianos na maturação pós-natal do sistema nervoso central e periférico e esquelético, ressaltando a influência desses hormônios sobre a

maturação do córtex cerebelar. Para este estudo foram usadas ratas Wistar tratadas com 0,5g NaF/L do décimo quinto dia de gestação até o nascimento dos filhotes, que por sua vez foram tratados até o décimo quarto dia de vida. Após este período os filhotes foram sacrificados para estudos nos tecidos em questão (cerebelo e tireóide) e para medição de concentração de hormônio tireoidiano no sangue. Em comparação com o grupo controle foi observada uma diminuição de 75% do hormônio T4 (tiroxina) livre no plasma dos animais que receberam tratamento com NaF. A análise histológica do cerebelo mostrou, nos animais tratados, forte redução ou ausência da camada granular externa, com uma pobre diferenciação das células de Purkinje, as quais estavam dispostas em uma camada simples na superfície da camada granular interna e que também apresentavam aumento na apoptose. Sendo assim, os autores concluíram que o NaF, foi capaz de causar forte redução no hormônio tiroxina e que isso poderia estar relacionado com as alterações histológicas e apoptoses observadas no cerebelo desses animais e que também pode haver alterações devido a formação de radicais livres causada pela ação do flúor.

Estudos também procuraram verificar uma possível ação teratogênica do flúor. Nesta linha Collins e colaboradores (1995), propuseram que o flúor nos níveis a que humanos normalmente são expostos não apresenta ação teratogênica. Neste estudo, ratas fêmeas foram tratadas com de 10 a 250 ppm de flúor até o vigésimo dia de gestação e as crias não apresentaram alterações estatisticamente significativa nos grupos de 10 a 175 ppm. Entretanto alterações significativas foram observadas no grupo de 250 ppm, tais como alterações do consumo de água e ósseas (três ou mais) nas crias, além de diminuição no peso das ratas. Whitford e colaboradores (2009), mostraram em estudos feitos sobre alterações em peso, consumo de água e comida e também avaliação de atividade motora, que ratas tratadas com 1mg, 5,7mg e 11,5mg/kg de flúor, por quatro semanas, apresentaram decréscimo no ganho de peso e consumo de água. Neste trabalho ele ainda conclui que para estas concentrações de flúor não ocorreram alterações significativas na resposta a atividade proposta como forma de análise de alterações em aprendizagem, bem como não houve alterações significativas a nível cerebral.

Somados todos os possíveis efeitos do flúor até aqui citados e dando ênfase aos efeitos neuronais é possível se constatar que, associado às características farmacocinéticas e ao estágio de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central,

crianças são mais suscetível aos efeitos cognitivos do flúor, como dificuldades de aprendizado e memória quando administrado em altas concentrações ou por tempo prolongado (SPITTLE, 1994). Estudo feito com 190 crianças indianas, entre doze e treze anos de idade, mostrou que crianças expostas a uma alta concentração de flúor na água apresentaram uma diminuição considerável de QI em comparação com aquelas de áreas onde a concentração de flúor na água era mais baixa, (diferença de 12,2% na média de QI entre grupos). O mecanismo para a diminuição no QI das crianças não foi estabelecido, porém os autores teorizam que pode estar relacionado a alterações de membrana e diminuição da ação da colinesterase no cérebro (TRIVEDI *et al.*, 2007). Outros três estudos feitos na China corroboram os achados de Trivedi, pois em todos estes estudos foi mostrada uma relação entre o aumento da concentração de flúor no organismo e uma diminuição do QI das crianças estudadas (LU *et al.*, 2000; XIANG *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 1996).

Para medições laboratoriais de efeitos cognitivos e na memória alguns trabalhos foram feitos em modelos animais. Paul *et al.* (1998) demonstraram que ratas fêmeas tratadas com 20 ou 40mg/kg de F por 60 dias apresentavam diminuição dose dependente da atividade motora espontânea, analisada por teste de movimentação em caixa com receptores de movimento, o autor propõe que tal alteração pode ser relacionada a uma diminuição na motivação do animal e conseqüentemente a déficits comportamentais, uma vez que atividade motora espontânea, exploração e grooming são considerados atividades relacionadas a um estado de maior motivação do animal em relação ao ambiente novo. Esta redução da atividade locomotora não foi acompanhada de alteração na coordenação motora, analisada por teste de "rota-rod", mostrando que a diminuição da colinesterase por ação do flúor não levou a alteração na função neuromuscular. Outros dados observados foram: alterações no peso (aumento de peso foi inversamente proporcional à ingestão de flúor) e na concentração de proteínas e colinesterase no plasma; diminuição de proteínas no fígado e músculo esquelético, sendo estes últimos diretamente proporcionais à ingestão de flúor. Apesar da diminuição da colinesterase no sangue, não houve alteração da acetilcolinesterase nas áreas do cérebro estudadas (córtex cerebelar, tronco encefálico e cerebelo). Estes dados foram corroborados por experimentos feitos em nosso laboratório. No trabalho foram utilizados 54 ratos Wistar, divididos em três grupos, grupo controle, 50ppm e 100ppm. Não foram observadas alterações nos pesos ou no consumo de água entre

os grupos decorrentes da exposição ao flúor. Porém foi observada diminuição da habituação, em relação ao dia de teste e em relação à sessão correlacionada ao tratamento, nos diferentes grupos durante a atividade locomotora em campo aberto, sendo tal diferença dose-dependente da concentração de flúor administrada. No trabalho também foi observada a taxa de fluorose dental entre os animais, sendo que nos animais expostos ao flúor a maioria apresentou fluorose branda. O trabalho propõe então a ocorrência de diminuição da memória em decorrência da administração de flúor por diminuição na habituação ao teste de campo aberto (CHIOCA *et. al.*, 2008). Outros trabalhos sobre alterações no aprendizado em animais corroboram com os dois acima citados, sendo que tais trabalhos apontam para alterações em níveis e ação da colinesterase, bem como para um aumento no estresse oxidativo como mecanismo de ação para as alterações (ZHANG *et. al.*, 2008; WU *et. al.* 2006; WANG *et. al.*, 2004). No trabalho de Wu e colaboradores (2006) foram ratos Wistar que foram submetidos aos seguintes tratamentos: NaF (100ppm), As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (50mg) e NaF+As<sub>2</sub> (com mesma concentração F e As dada aos grupos anteriores), além do grupo controle. O trabalho apresentou como resultado relevante uma diminuição na ação da acetilcolinesterase (ChE) após 10 dias de tratamento com flúor e uma diminuição também significativa nos dias 10 e 90 de tratamento para o grupo NaF+As<sub>2</sub>, além de decréscimo significativo na capacidade antioxidante no cérebro. Os autores sugerem então que a habilidade de aprendizado e memória e as funções cerebrais nos animais foram afetadas pela ação do flúor, bem com a de arsênico e que o estresse oxidativo pode ser uma das causas de tal dano. O trabalho de Zhang e colaboradores (2008) por sua vez, foi feito utilizando camundongos tratados com flúor (0 a 10 mg/L) e o teste em labirinto em T elevado para análise de memória e aprendizado nos animais, seguida de visualização de densidade de tecido no hipocampo por microscopia eletrônica. Os resultados obtidos neste estudo foram que: a capacidade de aprendizado em animais tratados com a maior concentração de flúor foram bem diminuídas; e que a densidade pós-sináptica da área avaliada também apresentou diminuição para o grupo com 10mg de flúor. Tais resultados sugerem que alterações na capacidade de aprendizado dos animais tratados com flúor se encontram intimamente relacionadas a alterações nas estruturas sinápticas no cérebro. Por ultimo, no trabalho de Wang e colaboradores (2004), foram utilizados também ratos Wistar divididos em quatro grupos: controle, NaF (100ppm), iodo (0,085mg/kg) e flúor+iodo (com concentrações similares aos

dois grupos anteriores). Nos três grupos tratados ocorreu diminuição na capacidade de aprendizado e memória, sendo, porém que tal diminuição foi maior no grupo tratado com iodo que no tratado com flúor. A alteração mais evidente no grupo tratado com flúor para este trabalho foi a da acetilcolinesterase, tendo diminuição significativa nas análises feitas para 10, 20 e 30 dias de tratamento.

As alterações em memória e aprendizado acima citadas podem estar relacionadas a alterações no nível de neurotransmissores no cérebro, isto porque os neurotransmissores no cérebro apresentam um padrão de ação bifásico, em baixas concentrações ou em concentrações elevadas eles levam a prejuízos de memória, tendo, portanto que se apresentar em concentrações ótimas para atuarem de maneira satisfatória nos mecanismos envolvidos na aquisição da memória. Como é sabido a aquisição e retenção de memória envolve diferentes mecanismos e fases, assim sendo, caso o animal se encontre em estado alterado (em condições de experimentação laboratorial e tratado com uma droga), ele pode apresentar comprometimento na aquisição de informações do meio, que iriam influenciar em sua memória de curta duração e conseqüente resposta deste ao meio, por outro lado, caso o animais respondesse bem ao meio porém não consigam reter a informação, a alteração causada pela droga pode ser dita mais em termos de consolidação e/ou retenção da memória, ou seja, na transformação de memória de curta para memória de longa duração, sendo que tal transformação é feita por ação de vários neurotransmissores (bem como aumento ou diminuição de concentração destes nas áreas cerebrais referentes a consolidação de memória), enzimas, proteínas e outros fatores relevantes para tal consolidação da informação.

Alguns estudos tem sido feitos com o intuito de demonstrar alterações na concentração de neurotransmissores e conseqüente déficit na capacidade de memória e aprendizado em animais. Tais estudos são principalmente referentes a alterações nos níveis de dopamina, serotonina e noradrenalina. No trabalho de Chinumori e Reddy (2007) por exemplo, o hipocampo foi o principal afetado, com alterações nos níveis de dopamina e serotonina, sendo que o hipocampo tem função central na resposta do animal a testes comportamentais, como o campo aberto por exemplo (THIEL et. al., 1998; VIANNA et. al., 2000; PEDRAZZA et. al., 2007). No presente trabalho não foram apresentadas alterações significativas a nível de estriado, porém este, comprovadamente esta intimamente relacionado a aprendizado não associativo e memória não declarativa. Tal ausência de alterações

em nível de estriado e corroborada por estudos feitos por Tsunoda e colaboradores (2005), que em seus estudos também não tiveram alteração significativa no estriado.

O flúor se liga a cálcio no organismo, sendo assim, tanto a taxa de absorção quanto a biodisponibilidade de ambos se encontra intimamente correlacionada. Em estudo feito por Ekambaram; Paul (2001) foi analisado o possível efeito preventivo do cálcio contra as ações deletérias do flúor. Ratas Wistar (n=32) foram divididas nos seguintes grupos: controle, tratadas com fluoreto de sódio (NaF) a 500ppm na água de consumo, tratadas com  $\text{CaCO}_3$  a 50 mg/Kg administrado por gavagem ou com a combinação de NaF e  $\text{CaCO}_3$  (mantendo as concentrações de NaF). Todos os animais tratados com NaF apresentaram aumento da concentração do flúor no plasma, diminuição de ingestão de comida com conseqüente redução no ganho de peso, prejuízo na atividade motora exploratória e coordenação motora, fluorose dental, inibição da atividade da colinesterase total no sangue e acetilcolinesterase cerebral e hipocalcemia. A administração de carbonato de cálcio apenas, não apresentou modificações significantes em nenhum dos parâmetros avaliados; porém o grupo que recebeu carbonato de cálcio juntamente com NaF apresentou prevenção significativa dos efeitos tóxicos do flúor nos parâmetros avaliados. A concentração plasmática de flúor diminuiu e os níveis de cálcio foram restabelecidos nesses animais. Tal resultado sugere que o cálcio não somente atua prevenindo a hipocalcemia como também o efeito tóxico do flúor, isso possivelmente porque ele diminuía a biodisponibilidade do flúor por interação no trato gastrintestinal, bem como por diminuir a taxa de absorção de flúor (altamente dependente da acidez do meio) por diminuição da acidez do trato gastrintestinal.

Posteriormente, em 2003, os mesmos pesquisadores analisaram o efeito da vitamina D em animais submetidos a fluoreto de sódio, isto porque a vitamina D aumenta a absorção gastrintestinal do cálcio. Ratas fêmeas tratadas durante 60 dias com: NaF a 500 ppm na água de consumo ou em combinação com vitamina D 200UI/Kg administrada por gavagem, um grupo tratado apenas com vitamina D (para demonstrar que esta não tem ação sobre os parâmetros estudados) e o grupo controle. Os resultados do tratamento com NaF foram similares aos do experimento anterior e no tocante ao tratamento com vitamina D, não houve resultado significativo nos parâmetros avaliados. O grupo que recebeu vitamina D e NaF apresentou alteração apenas nos quesitos de prevenção de hipocalcemia e de diminuição no ganho de peso, sem porém apresentar qualquer alteração significativa

quanto a prevenção de efeitos tóxicos do flúor, melhora na coordenação motora, melhora no quadro de fluorose ou na concentração de AchE. Tal resultado mostra que a vitamina D não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de flúor, apenas restabelecendo os níveis de cálcio no plasma. Portanto, a reversão dos efeitos tóxicos observados no estudo anterior, foi devida a uma quelação do fluoreto pelo cálcio, impedindo a absorção do flúor; enquanto que os animais tratados com vitamina D apresentaram reversão para alguns parâmetros devido ao restabelecimento dos níveis de cálcio plasmático.

Assim sendo, se torna necessário um estudo mais aprofundado sobre as ações do flúor no organismo e sua possível toxicidade, uma vez que a literatura carece de tais informações, sendo comuns apenas estudos que tratem de fluorose dentária e óssea. Considerando o flúor um agente muito útil e eficaz na prevenção de cáries, a determinação da dose segura de tal substância é indispensável, pois sua ação no sistema nervoso é ainda pouco entendida. Outro aspecto relevante em relação aos efeitos neurotóxicos do fluoreto de sódio é a sua reversibilidade (ou não) com a suspensão de sua administração.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL:**

Avaliar o efeito da intoxicação sub-crônica de flúor no comportamento e cognição, correlacionando-o com o nível de fluorose dental e de monoaminas no sistema nervoso central.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Foram avaliados os efeitos do tratamento por 30 dias e da suspensão por 15 dias do tratamento com flúor em ratos tratados sub-crônicamente (30 dias), em relação aos seguintes parâmetros: ingestão de comida, água e flúor, ganho de peso, habituação à atividade locomotora utilizada para testar capacidade de aprendizado dos animais e grau de fluorose dental. Bem como foi feita a análise da concentração de monoaminas e metabólitos nas seguintes áreas do cérebro: hipocampo, estriado, amígdala e córtex frontal.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS:

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (machos, com cerca de 90 dias) provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR e mantidos em gaiolas individuais, em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), com comida e água à vontade. Água foi fornecida à vontade, mas com diferentes concentrações de flúor segundo protocolo experimental.

#### 3.2. Tratamento

Os animais foram tratados com água com 1,54 ppm de NaF (concentração na água de consumo de Curitiba, a qual os animais estão expostos desde o nascimento – e intra-útero) ou 100 ppm de NaF. O consumo de água foi avaliado as segundas, quartas e sextas, sendo calculando o consumo médio diário. Portanto, obtivemos a dose administrada a cada animal, dado pouco freqüente na literatura da área, que geralmente informa apenas a concentração de NaF administrada por via oral. O consumo de água foi realizado pela pesagem dos bebedouros. Também foi feita a mensuração do consumo diário de ração para uma posterior análise entre o consumo e os grupos utilizados no tratamento.

Foi avaliado o efeito do flúor em ratos tratados sub-crônicamente (30 dias) com fluoreto de sódio (100 ppm), sendo que o tempo de tratamento durou 45 dias, onde além do grupo controle (tratado apenas com água de abastecimento que apresenta concentração de 1,54ppm) , tivemos um primeiro grupo sendo tratado com NaF (100ppm) pelos primeiros 30 dias e posteriormente com água de abastecimento (1,54ppm) pelos 15 dias restantes e um segundo grupo que recebeu primeiro água de abastecimento (1,54ppm) durante 15 dias e depois a água acrescida de NaF (100ppm) pelos próximos 30 dias. Ao final dos 45 dias estes animais passaram por duas sessões de campo aberto, com duração de 2 minutos por sessão, sendo que a primeira teve por objetivo avaliar a atividade motora e a segunda avaliar a capacidade de memorização dos animais (Tabela 1).

TABELA DE TRATAMENTO			
Grupo	Tratamento		
	15 dias	15 dias	15 dias
H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	Água de consumo (1,54ppm)	Água de consumo (1,54ppm)	Água de consumo (1,54ppm)
NaF + H <sub>2</sub> O	NaF (100 ppm)	NaF (100 ppm)	Água de consumo (1,54ppm)
H <sub>2</sub> O + NaF	Água de consumo (1,54ppm)	NaF (100 ppm)	NaF (100 ppm)

Tabela 1 – Quadro de administração de água acrescida de flúor (NaF) ou água de abastecimento durante o período de tratamento sub-crônico dos animais.

### 3.3. Modelo Comportamental

#### 3.3.1. Teste do Campo Aberto

Este modelo permite a avaliação de diversos parâmetros comportamentais (locomoção central e periférica, tempo de imobilidade, levantar nas patas traseiras, etc.) que permitem uma avaliação da emocionalidade dos animais. A repetição do teste 24 h após a primeira sessão permite ainda avaliar a habituação (Mello e Souza et al., 2000), representada pela diminuição destes comportamentos, que pode ser relacionada aos processos mnemônicos. O campo aberto utilizado consiste em uma arena quadrada com 50cmx40cm de comprimento e 63cm de altura, divididos em unidades periféricas e centrais, quadrados de 10cmx10cm de comprimento. O início do teste se dá quando o rato é colocado no centro do campo aberto, e a partir deste momento começa a contagem do tempo estabelecido: 2 minutos. Durante este tempo foram contabilizados o número de quadrantes cruzados, o número de fezes e o número de vezes que o animal se levantou (*“rearing”*). A análise de quadrante cruzado se dá pela observação do animal durante sua movimentação no campo aberto, é considerado cruzamento de quadrante quando as patas traseiras do animal passam para o quadrante seguinte. Estes dados permitiram a avaliação das possíveis alterações locomotoras dos três grupos. O teste foi filmado e analisado posteriormente.

#### 3.4. Determinação de Fluorose

Após o término do tratamento a análise do grau de fluorose foi feita pela avaliação da estrutura dental dos dentes incisivos dos animais. As mudanças

observadas foram classificadas usando a pontuação de 0 a 5 proposta por Ekambaram e Paul (2003):

0: dente com forma normal, liso e polido, com esmalte na cor amarelo-laranja.

1: leve branqueamento do esmalte.

2: esmalte com faixas horizontais superficiais com aspecto de manchas salpicadas de giz e erosão leve.

3: esmalte esbranquiçado, manchas com aspecto de giz, erosões moderadas nas pontas.

4: extremidades fragmentadas (quebradiças) e corrosivas, perda da coloração do esmalte e manchas fortes.

5: extremidades inclinadas e desgastadas com curvatura anormal.

### 3.5. Dosagem de monoaminas e seus metabólitos

Os animais foram mortos por decaptação e as regiões de interesse (hipocampo, córtex frontal, amígdala e estriado) dissecadas em gelo. As amostras foram homogeneizadas por ultra-som em ácido perclórico 0,1M e injetadas em uma estação de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) Shimadzu (Japão) com uma coluna C18 de fase reversa Fusion RP C-18 (Phenomenex, EUA), dimensões 150 x 4,6 mm, partículas de 4 $\mu$ m, detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector). Nesse sistema, foi feita a dosagem da monoaminas, como descrito por FERRO (2005). A fase móvel para catecolaminas foi ajustada para fluxo de 1 ml/min., possuindo a seguinte composição: ácido cítrico 20 g; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL água de miliQ; metanol 10 %; pH ajustado em 4,0; fluxo de 1,0 mL/min. A altura dos picos das amostras, comparadas às alturas dos padrões externos, foi usada para quantificar os picos das amostras. O ácido 2-4-dihidroxibenzoico (DHBA) foi adicionado às amostras para funcionar como padrão interno das análises cromatográficas (Bergquist *et. al.*, 2002).

### 3.6. Análise dos dados

Empregou-se análise paramétrica para analisar a locomoção no campo aberto: ANOVA de dois fatores (sendo estes tratamento e sessão), seguido do teste de Newman-Keuls.

A dosagem de monoaminas, assim como consumo de água e ração, ganho de peso e dose de NaF , foram analisados por ANOVA de um fator seguido do teste de Newman-Keuls.

Para avaliação da fluorose, como observou-se apenas grau 0 (ausente ou normal) ou 1 (presente, porém baixa), os animais foram classificados em: com (1) ou sem (0) fluorose. A análise se fez por Qui-quadrado.

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise do consumo de comida, ingestão de água e ganho de peso dos animais:

Não ocorreram alterações quanto à ingestão de comida ou de água durante o experimento. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos. Quanto ao ganho de peso também não foram encontradas variações significativas entre os diferentes grupos. (Tabela 2).

Como esperado a ingestão de fluoreto de sódio (NaF) aumentou proporcionalmente à concentração de flúor na água, sendo esta a única diferença existente entre os grupos quanto à dieta durante o período de experimentação, (Tabela 2).

Grupo	Consumo de água/ dia (ml)	Consumo de comida/ dia (g)	Fluoreto de sódio (mg/kg)		Variação média no peso		
			100ppm	1,54ppm	Peso inicial	Peso final	Média de diferença
H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	29±2	26±3	xx	0,043±0,01	269,75	348,90	79,14±19,82
NaF+ H <sub>2</sub> O	28±1	27±3	7,77±0,48 <sup>a</sup>	0,039±0,02	271,03	347,09	76,06±31,77
H <sub>2</sub> O +NaF	29±1	27±3	8,04±0,26 <sup>a</sup>	0,045±0,02	291,07	356,79	65,71±12,71

Tabela 2 – Médias de consumo de água, ração, ganho de peso e fluorose entre os animais.

n= 14-15 animais/grupo

a - p < 0.05 comparando para o grupo controle (H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O )

### 4.2. Avaliação da fluorose dental:

Foi observado um pequeno grau de fluorose nos animais no presente estudo, sendo que em nenhum deles o grau de fluorose foi maior que 1. O grau de fluorose foi analisado segundo a tabela proposta por Ekambaram e Paul (2003) (Tabela 3).

A diferença apresentada entre os grupos tratamento e controle em ambos os casos se mostraram estatisticamente significativas.

Grupo	Grau de fluorose	
	0	1
H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	12	2
NaF+ H <sub>2</sub> O <sup>a c</sup>	5	10
H <sub>2</sub> O +NaF <sup>b c</sup>	3	11

Tabela 3 – Grau de fluorose dental nos animais submetidos ao teste.

n= 14-15 animais/grupo

a –  $p < 0,0001$  comparando para o grupo H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O

b --  $p < 0,004$  comparando para o grupo H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O

c –  $p < 0,47$  comparando entre grupos que receberam água e flúor (NaF+H<sub>2</sub>O x H<sub>2</sub>O+NaF)

#### 4.3. Análise do teste de campo aberto:

Em relação ao campo aberto a ANOVA de duas vias, indicou resultados significantes quanto ao fator sessão [ $F(1, 40) = 8.94, P < 0.01$ ] e quanto à interação sessão versus tratamento [ $F(2, 40) = 3.85, P < 0.05$ ], não ocorrendo no entanto valor significativa para o fator tratamento [ $F(2, 40) = 0.30, NS$ ] entre grupos.

Em relação à variação entre os dias de teste somente o grupo controle mostrou alteração estatisticamente significativa [ $t(14) = 3.80, P < 0.01$ ], mostrando com isso uma habituação à tarefa estabelecida. Nos dois grupos teste não ocorreu diferença significativa entre os dias [grupo H<sub>2</sub>O+NaF [ $t(14) = -0.11, NS$ ]]; e para o grupo NaF+H<sub>2</sub>O de [ $t(14) = 1.33, NS$ ]. Em relação à ocorrência de variação entre os grupos não foi apresentada variação estatisticamente significativa (Fig.1A). Estes dados sugerem que a ingestão de flúor leva a uma diminuição na habituação ao campo aberto e que a retirada da administração de flúor não apresentou reversão de quadro, ao menos nesta duração utilizada pelo trabalho.

A análise da habituação entre as sessões também foi avaliada pela comparação da diferença entre a movimentação na primeira e na segunda sessão (delta = número de cruzamentos na primeira sessão x número de cruzamentos na segunda sessão). A ANOVA de um fator indicou uma diferença entre o grupo controle (H<sub>2</sub>O+ H<sub>2</sub>O) e H<sub>2</sub>O+NaF [ $F(2,40) = 3.85, p < 0.03$ ; H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O:  $12.7 \pm 3.3$ ; NaF+ H<sub>2</sub>O:  $5.0 \pm 3.8$ ; H<sub>2</sub>O+NaF:  $-0.3 \pm 3.1$ ; média  $\pm$  SEM].

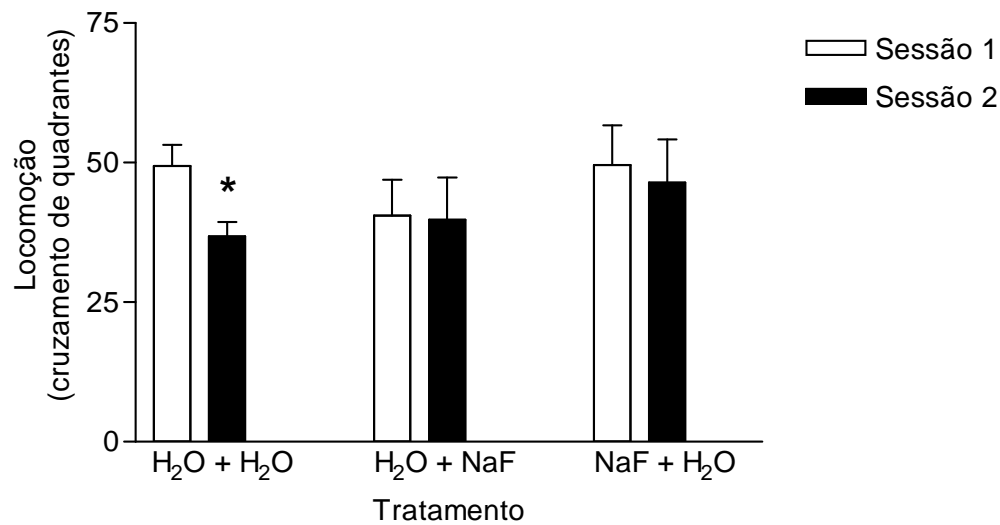


Fig.1A – Efeito do tratamento sub-crônico com fluoreto de sódio (NaF100ppm) na habituação ao campo aberto (\*  $p < 0,05$  sessão 1 vs sessão 2)

H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O : água+água (por 45 dias)

H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [(NaF 100ppm) 30 dias]

NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [(NaF 100ppm) 30 dias] + água (15 dias)

(n = 14-15 animais)

Outra análise feita no campo aberto foi referente a uma possível alteração na resposta de habituação dentro da mesma sessão, medida pela comparação do número de cruzamentos entre quadrantes diferentes (ou seja, movimentação), dos animais entre o primeiro e o segundo minuto de teste nos diferentes grupos.

O teste T de medidas repetidas indicou diferença significativa entre o primeiro e o segundo minuto em todos os grupos em ambos os dias de teste [H<sub>2</sub>O+ H<sub>2</sub>O: dia 1  $t(14) = 5.19$ ,  $p < 0.01$  e dia 2  $t(14) = 5.27$ ,  $p < 0.01$ ; H<sub>2</sub>O+NaF: dia 1  $t(14) = 4.62$ ,  $p < 0.01$  e dia 2  $t(14) = 5.14$ ,  $p < 0.01$ ; NaF+H<sub>2</sub>O: dia 1  $t(14) = 5.96$ ,  $p < 0.01$  e dia 2  $t(14) = 5.27$ ,  $p < 0.01$ ]. Tal dado sugere a ocorrência de aprendizado da tarefa dentro da mesma sessão, entre os dois minutos diferentes de teste. Por último, ocorre também diferença significativa entre o número de quadrantes cruzados, no primeiro minuto do primeiro dia comparado ao segundo dia, entre os grupos H<sub>2</sub>O+ H<sub>2</sub>O somente [H<sub>2</sub>O+ H<sub>2</sub>O:  $t(14) = 3.88$ ,  $p < 0.01$ ; H<sub>2</sub>O+NaF:  $t(14) = -0.27$ , NS; NaF+H<sub>2</sub>O: dia 1  $t(14) = 0.53$ , NS]. (Fig.1B), o que seria indicativo de um prejuízo na retenção da habituação no grupo tratado com NaF.

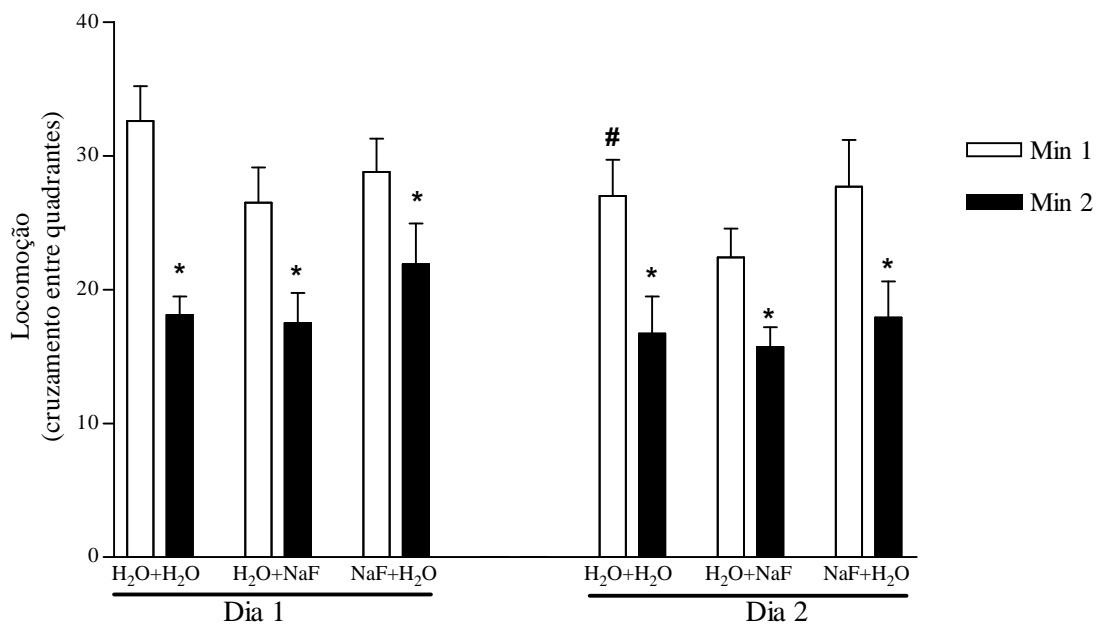


Fig.1B – Efeito do tratamento sub-crônico com fluoreto de sódio (NaF100ppm) na habituação ao campo aberto (\*  $p < 0,05$  minuto1 vs minuto 2 na mesma sessão)  
 (#  $p < 0,05$  minuto1 sessão 1 vs minuto i sessão 2)  
 H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O : água+água (por 45 dias)  
 H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [NaF (100ppm) 30 dias]  
 NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [NaF (100ppm) 30 dias] + água (15 dias)  
 (n = 14-15 animais)

#### 4.4. Análise da dosagem de monoaminas e seus metabólitos:

Quanto a análise de monoaminas foi encontrada alteração significativa para serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) no hipocampo, córtex e estriado; valores estatisticamente significativos de alteração em DA somente foram encontrados no estriado. Nenhuma alteração significativa na taxa de metabólitos foi encontrada e também não houve alteração nos metabólitos na amígdala.

Quanto ao hipocampo, a ANOVA de uma via mostrou que os animais tratados com flúor apresentaram aumento no nível de 5-HT [ $F(2,25) = 4.264$ ,  $p < 0.05$ ] e de NA [ $F(2,25) = 11.616$ ,  $p < 0.001$ ], sendo tais valores significativos para os dois grupos de tratamento em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Porém não ocorreu alteração significativa nem para DA nem para metabólitos (5-HIAA, DHPG, HVA e DOPAC) nesta área do cérebro [ $F(2,25) < 1.858$ ,  $p > 0.05$ ] para todos. (fig.2A)

Em relação ao estriado, a ANOVA de uma via, indicou aumento significativo para 5-HT [ $F(2,25) = 3.966$ ,  $p < 0.05$ ], NA [ $F(2,25) = 4.403$ ,  $p < 0.05$ ] e DA [ $F(2,25) = 7.433$ ,  $p < 0.01$ ], sendo tais diferenças igualmente significativas para os grupos tratados em relação ao grupo controle (todos  $p < 0.03$ ). Não ocorreu alteração

significativa para os metabolitos neste grupo também [F (2,25)< 2.050, p > 0.05 para todos]. (Fig.2B).

Em relação à amígdala, ocorreu alteração significativa na concentração somente para DHPG [F(2,11)= 4.091, p<0.05], caracterizada por uma diminuição no grupo tratado com água+NaF (p<0,03). Ocorre tendência de redução de DA [F(2,11)= 3.682, p=0.059], em relação aos grupos NaF+água e água+NaF. Em relação as outras monoaminas ou a seus respectivos metabolitos, nenhuma alteração significativa foi encontrada [F (2,11)< 3.682, p > 0.05]. (Fig.2C).

Por ultimo, em relação ao córtex, ocorre alteração significativa para NA [F(2,11)= 8.512, p<0.01], com diminuição em ambos os tratamentos quando comparados ao controle (ambos p<0,03). Ocorre também uma tendência de redução de DA [F(2,11)= 3.898, p=0.052]. Em relação às outras monoaminas e metabolitos não ocorrem alterações estatisticamente significativa [F (2,11)< 1.177, p > 0.05]. (Fig.1D).

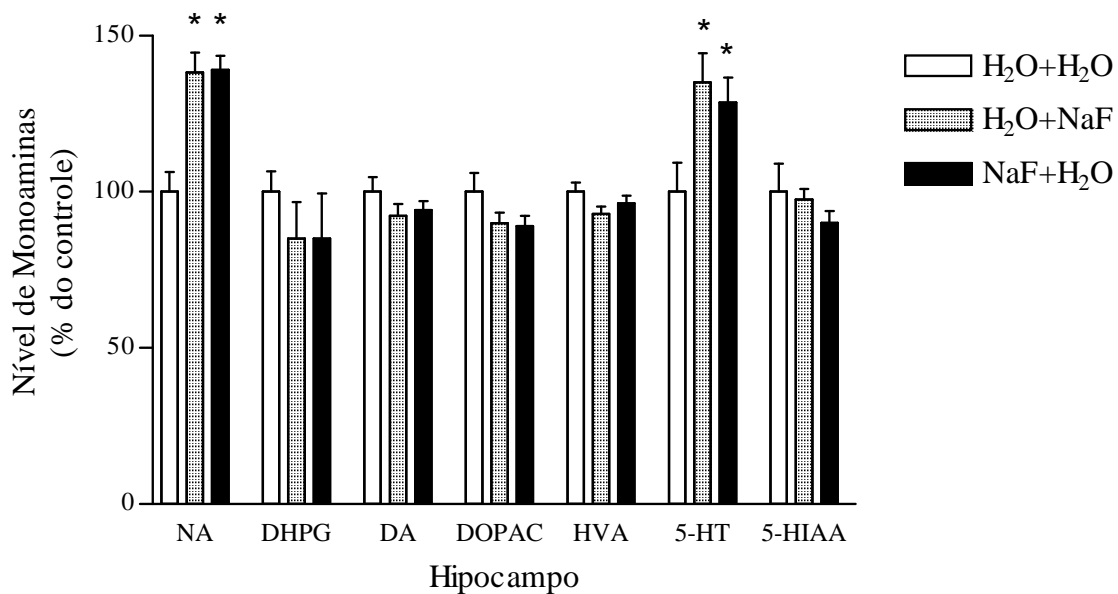


Fig 2A- Efeito de administração sub-crônica de NaF (100ppm) em relação ao nível de monoaminas no hipocampo. (p<0,05 em comparação com controle).

H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O: água+água (por 45 dias)

H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [NaF (100ppm) 30 dias]

NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [NaF (100ppm) 30 dias] + água (15 dias)

(n = 9-10 animais)

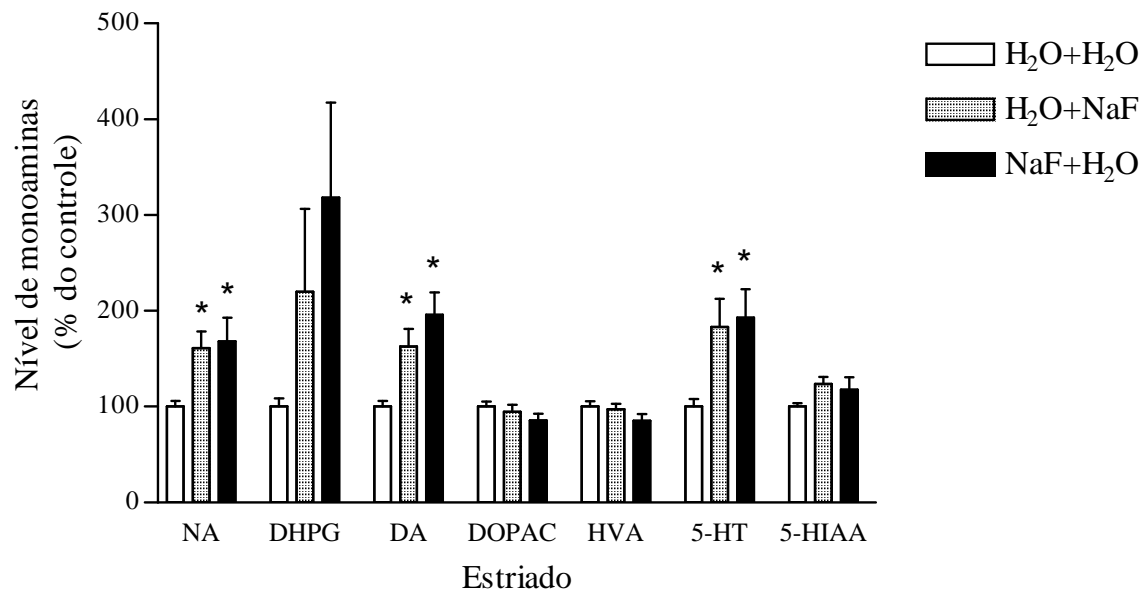


Fig 2B- Efeito de administração sub-crônica de NaF (100ppm) em relação ao nível de monoaminas no estriado. ( $p < 0,05$  em comparação com controle).

H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O: água+água (por 45 dias)

H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [NaF (100ppm) 30 dias]

NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [NaF (100ppm) 30 dias] + água (15 dias)

(n = 9-10 animais)

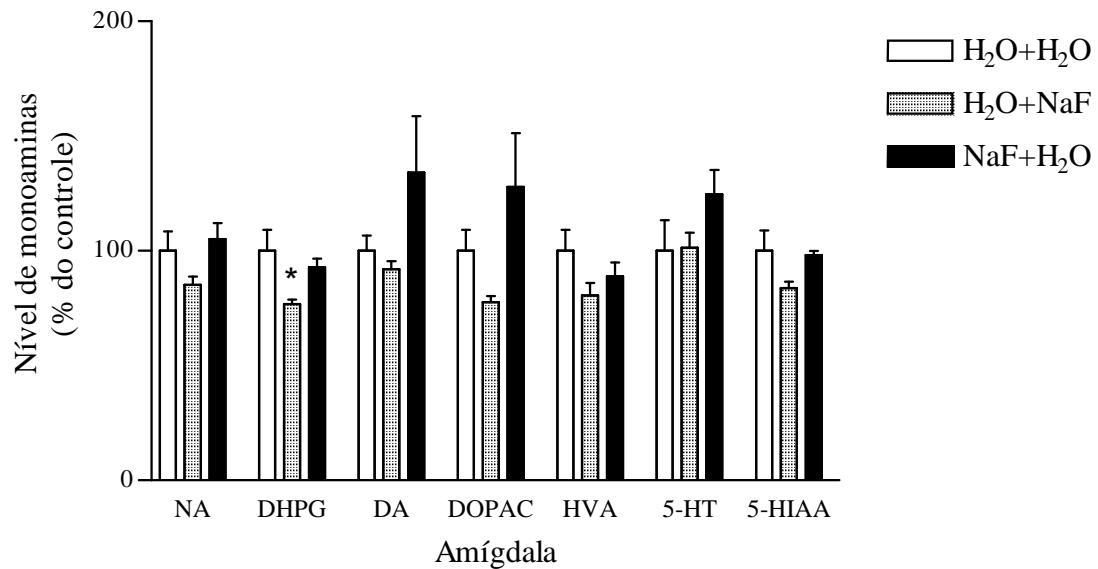


Fig 2C- Efeito de administração sub-crônica de NaF (100ppm) em relação ao nível de monoaminas na amígdala. ( $p < 0,05$  em comparação com controle).

H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O: água+água (por 45 dias)

H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [NaF (100ppm) 30 dias]

NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [NaF (100ppm) 30 dias] + água (15 dias)

(n = 9-10 animais)

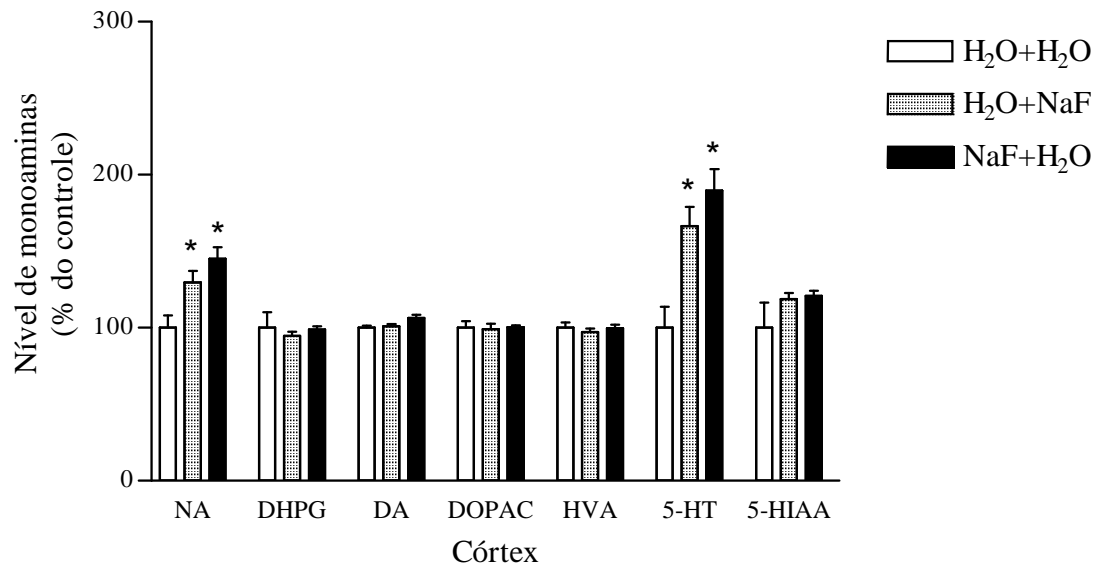


Fig 2D- Efeito de administração sub-crônica de NaF (100ppm) em relação ao nível de monoaminas no amígdala. ( $p < 0,05$  em comparação com controle).

H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O: água+água (por 45 dias)

H<sub>2</sub>O+NaF: água (15 dias) + flúor [NaF (100ppm) 30 dias]

NaF+H<sub>2</sub>O: flúor [NaF (100ppm) 30 dias] + água (15 dias)

(n = 9-10 animais)

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suspensão no tratamento com fluoreto de sódio (NaF), após sua administração por um período de trinta dias em seus efeitos amnésicos e neuroquímicos. Foi possível observar que a administração de NaF levou a uma perda na capacidade de habituação nos animais, corroborando resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (CHIOCA *et al.*, 2008). Esta diminuição na capacidade de habituação, em ambos os grupos expostos ao NaF, se caracteriza por uma não diminuição de locomoção dos animais (cruzamento de quadrantes no campo aberto). Caso os animais apresentassem tal diminuição na locomoção, e conseqüente habituação nos testes, este seria tomado como um indicativo de aprendizado, como observado no grupo controle. Portanto é possível estabelecer que no presente estudo a suspensão no tratamento com NaF não levou a uma reversão do quadro neurotóxico do flúor. É importante salientar que a não habituação dos animais ocorreu somente entre testes (dia 1 e dia 2), ou seja, os animais tratados com NaF apresentaram diminuição na taxa de retenção de memória de longa duração, sendo que o tipo de memória mensurado neste experimento é a memória espacial para aprendizado não associativo (VIANNA *et al.*, 2000). Em outra análise em que foram avaliadas as diferenças apresentadas entre os minutos um e dois do mesmo teste, não se observou alteração entre grupos, ou seja, todos os grupos apresentaram uma significativa diminuição na locomoção no campo aberto no segundo minuto. O tipo de memória que se acredita ser avaliada neste tipo de situação é a memória de curta duração. Assim sendo, pode-se dizer que NaF atua nos mecanismos de armazenamento da memória, ou seja, no armazenamento das informações obtidas no meio, que a princípio são guardadas como memória de curta duração, sob as quais o NaF não atua, mas que posteriormente são transformadas em memória de longa duração. A diferença básica que poderia ser estabelecida entre estas é que na memória de curta duração, o organismo avalia o ambiente e responde a ele, guardando informações e pistas úteis para uma melhor interação com estes no momento, posteriormente vários neurotransmissores e mecanismos intracelulares são acionados para que esta memória seja retida e possa posteriormente ser evocada (IZQUIERDO, 2006). Esta dissociação entre as duas formas de memória

(curta e longa duração) são corroborados por trabalhos de Carey e colaboradores (1998) e De Groot e colaboradores (2005). No primeiro trabalho a substância utilizada foi dizolcipina e para o segundo camundongos com mutação para M4. Outros trabalhos que corroboram com os resultados obtidos neste trabalho quanto a alterações na memória são os de Wang e colaboradores (2004), Zhang e colaboradores (2008) e Wu e colaboradores (2006), que trabalharam com animais de laboratório e o trabalho de Spittle (1994) que analisou casos clínicos, pois ambas as abordagens indicam que a exposição crônica ao flúor leva a uma diminuição na capacidade de memorização das informações.

Não ocorreram alterações significativas no ganho de peso dos animais, no consumo de ração e nem no consumo de água. Esta informação mostra que os animais não apresentaram diminuição do apetite ou no impulso alimentar, por causa do tratamento, e que a concentração de 100ppm de NaF, não alterou o sabor da água, a tornando desagradável. A não alteração de peso é corroborada por estudos de Collins e colaboradores (1995) e Chioca e colaboradores (2007). No trabalho de Collins e colaboradores, apenas doses acima de 250ppm apresentaram alteração no peso e no trabalho de Chioca e colaboradores, que utilizou 50 e 100ppm, esta alteração não ocorreu. A alteração no peso dos animais tratados com doses maiores que 100ppm de NaF foram observados nos trabalhos de Paul e colaboradores (1998) e Whitford e colaboradores (2009).

Em relação à utilização de concentrações mais altas de flúor do que a comumente presente em água de abastecimento, devemos considerar que: ratos parecem ser mais resistentes a ação do flúor (SMITH et. al., 1993); humanos são normalmente expostos a variadas fontes de flúor além da água, como produtos dentais, comida, medicamentos e outros (BUZALAF et al., 2003). Voltando à questão da resistência, em estudo feito por Smith e colaboradores (1993), foi demonstrado que ratos submetidos a 100ppm de flúor apresentavam efeitos de intoxicação similares aos de humanos submetidos a 5-10ppm, o que pode ser observado pela fluorose apenas branda que os animais apresentaram. No presente estudo é importante salientar que a fluorose por ser uma característica típica da intoxicação por flúor, e observada com certa frequência no homem, é um parâmetro útil para validar a real condição de intoxicação dos animais, ou seja, para a qualificação de caso (SPITTLE, 1994). No presente estudo, o grau de fluorose foi analisado segundo a tabela proposta por Ekambaram e Paul (2003). A presença de

aparente fluorose em dois animais do grupo controle pode ser considerada como erro em avaliação, ou uma maior vulnerabilidade do animal em questão ao flúor, mesmo este estando em doses tão baixas (1,54ppm) da mesma. Já em relação à comparação grupo controle e animais tratados, os dados de fluorose se mostram estatisticamente significativos, levando a crer que todos os animais em questão sofriam dos efeitos tóxicos do flúor e por conseguinte apresentavam alterações na homeostasia geral características do quadro de intoxicação por flúor. Os dados de fluorose aqui presentes são similares aos encontrados em trabalhos de Brudevold e colaboradores (1978) e Chioca e colaboradores (2008), o que reforça a veracidade de tais achados.

As alterações na memória apresentadas neste trabalho podem ser correlacionadas às alterações observadas nos níveis de monoaminas no estriado, hipocampo e córtex. As alterações apresentadas são referentes aumento de a noradrenalina, dopamina e serotonina no estriado; de noradrenalina e serotonina no hipocampo e córtex e não havendo alteração significativa na amígdala. A habituação em campo aberto esta intimamente relacionada à atuação hipocampal (THIEL et. al., 1998; VIANNA et. al., 2000; PEDRAZZA et. al., 2007), sendo esta estrutura afetada pela ação do flúor em nosso estudo.

Entretanto, os dados apresentados no presente trabalho contrastam com os de outros pesquisadores quanto à determinação de monoaminas. No trabalho de Chinumori e Reddy (2007), foi encontrado aumento nos níveis de dopamina e serotonina (bem como de seus metabólitos) no hipocampo, não havendo alteração no estriado, esta não alteração em nível de estriado e corroborada por trabalhos de Tsunoda e colaboradores (2005). Tal discrepância em termos de resultados pode ser atribuída a variações no método de experimentação, por exemplo: via de administração e concentração de flúor a que o animal foi submetido; também pode estar relacionada a características do próprio animal, como sexo, idade e espécie. Porém, nossos dados são compatíveis com a diminuição na retenção da habituação, dado relacionado a vários estudos já citados acima, o que pode estar relacionado a um efeito bifásico das monoaminas sobre a memória: um pequeno aumento destas está relacionado à melhora na capacidade de memorização e um aumento maior acarretaria efeitos deletérios. Esta alteração no nível de monoaminas e conseqüente efeito deletério foram demonstrados no trabalho de Sudha e colaboradores (1995), onde ele propõe que o sistema colinérgico é muito importante na retenção da

memória e que alterações nos níveis de serotonina comprometem a ativação do sistema colinérgico e posterior retenção de aprendizado. Neste trabalho ele cita que em outro estudo feito por Jackson e colaboradores (1988) foi demonstrado que neurônios serotoninérgicos do núcleo medial da rafe atuam, entre outras funções, inibindo neurônios colinérgicos do córtex e hipocampo, e os provenientes do núcleo dorsal da rafe atua na inibição de neurônios colinérgicos córtex, hipocampo e estriado. Em relação a alterações nos níveis de dopamina, o trabalho de Sudha e colaboradores (1995) propõe que mecanismos dopaminérgicos estão relacionados a uma melhora do aprendizado e memória e que os seus achados de diminuição da capacidade de aprendizado podem ser relacionadas a uma interação entre vias dopaminérgicas e colinérgicas alteradas, ou seja, ambas estavam com nível de neurotransmissores alterados e isto levou ao efeito deletério, sendo que tal interação pode estar relacionada ao estriado principalmente, uma vez que este está intimamente relacionado a aprendizado espacial (SUDHA.1995). Em suma alterações tanto no sistema colinérgico quanto catecolinérgico estão relacionadas a alterações nos padrões de aprendizado e memória, sendo que já foram demonstradas alterações em nível de déficit comportamental em animais e de alteração cognitiva em humanos pelo não funcionamento adequado de tais vias (DECKER, 1991).

No presente trabalho os dados comportamentais e neuroquímicos mostram que a retirada do tratamento com NaF pelo período de quinze dias não foi suficiente para reverter os efeitos deletérios do flúor no sistema nervoso central, o que mostra uma certa estabilidade de quadro. Sendo então necessário que trabalhos posteriores sejam feitos utilizando períodos maiores de retirada do tratamento para comprovar se tal estabilidade é ou não existente. Também foi possível correlacionar alterações em nível de monoaminas e uma alteração não na resposta ao meio e padrão de atuação em relação a este, que seria mais relacionada à memória de curta duração, mas sim de retenção da informação e posterior evocação que seria relacionada à memória de longa duração e sua evocação. Trabalhos posteriores, porém se tornam necessários para uma melhor avaliação de tais alterações em níveis de monoaminas e uma possível correlação destas com alterações em níveis de acetilcolina e mecanismos neuronais de memória e aprendizado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALLAIN, P.; GAUCHARD, F.; KRARI, N. Enhancement of aluminum digestive absorption by fluoride in rats. **Res Commun Mol Pathol**, v.91, n.2, p.225-31, 1996.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Fluoridation in the prevention of dental caries. **J Am Dent Assoc**, v.43, n.2, p.16, 1951.

ASSIS, G.F.; BUZALAF M.A.R.; FARIA F.A.C.; GRANJEIRO J.M.; TORRES S.A.; LARA V.S.; OLIVEIRA D.T.; Mecanismos biológicos e influência de fatores ambientais na fluorose dentária e a participação do flúor na prevenção da cárie. **Rev Fac Odontol Bauru**, v.7, n.3/4, p.63-70, 1999.

BENTLEY, E.M.; ELLWOOD, R.P.; DAVIES, R.M.; Fluoride ingestion from toothpaste by young children. **Braz Dent J**, v.186, n.9, p.460-2, 1999.

BERGQUIST, J.; SCIUBISZ, A.; KACZOR, A.; SILBERRING, J. Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. **J Neurosci Meth** 113:1-13, 2002.

BHATNAGAR, M.; RAO, P.; SAXENA, A.; BHATNAGAR, R.; MEENA, P.; BARBAR, S.; CHOUHAN, A.; VIMAL, S. Biochemical changes in brain and other tissues of Young adult female mice from fluoride in their drinking water. **Fluoride**. 39(4)280-84. 2006.

BLAYLOCK, R. Excitotoxicity: a possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. **Fluoride** 37(4):301-314. 2004.

BOUAZIZ, H.; KETATA, S.; JAMMOUSSI, K.; BOUDAWARA, T.; AYEDI, F.; ELLOUZE, F.; ZEGHAL, N. Effects of sodium fluoride on hepatic toxicity in adult mice and their suckling pups. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 86 (2006) 124-130.

BROWNE, D.; WHELTON, H.; O'MULLANE D. Fluoride metabolism and fluorosis. **J Dent** v.33, p.177-86, 2005.

BRUDEVOLD, F., BAKHOS, Y., AASENDEN, R. Dental fluorosis as related to the concentration of fluoride in teeth and bone. **JADA** 96, 459-463. 1978.

BUZALAF, M.A.R. Fluoretos e saúde bucal. **Ed. Santos**, São Paulo-SP cap.5 p. 87-106, 2008.

COLLINS, T.F.X.; SPRADO, R.L.; SHACKELFORD, M.E.; BLACK, T.N.; AMES, M.J.; WELSH, J.J.; BALMER, M.E.; OLEJNIK, N.; RUGGLES, D.I. Developmental toxicity of sodium fluoride in rats. **Food Chem Toxicol**, V.33, n.11, p.951-60, 1995.

Chinumori, K., Reddy, P.K, 2007. Dose-dependent effects of fluoride on neurochemical milieu in the hippocampus and neocortex of rat brain. **Fluoride** 40(2): 101-110.

CHINOY, N.J., SHARMA, M. MICHAEL, M.. Beneficial effects of ascorbic acid on reversal of fluoride toxicity in male rats, **Fluoride** 26 45-46, 1993.

CHIOCA, L.R.; RAUPP, I.; CUNHA, C.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Subchronic fluoride intake induces impairment in habituation and active avoidance tasks in rats. **J. Pharmacology** 579. 196-201. 2008.

DECKER, M.W.; MCGAUGH, J.L. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. **Synapse** 7:151-168; 1991.

DIÁRIO DO SENADO FEDERAL, 25 agosto 2005. Secretaria Especial de Editoração e Publicação do Senado Federal – Brasília-DF. (OS:15782/2005). Disponível em: <[http://www.senado.gov.br/ordemdodia/arquivos/avulso/2005/PLS200500297\\_01.pdf](http://www.senado.gov.br/ordemdodia/arquivos/avulso/2005/PLS200500297_01.pdf)>  
> Acesso em: 01 junho 2009.

DE GROOT C., ARNTZ A., KINDT A. Emotional memory is perceptual. **Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry** 36 (2005) 19–34.

EKAMBARAM, P.; PAUL, V. Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.9, p.141-6, 2001.

EKAMBARAM, P.; PAUL, V. Effect of vitamin D on chronic behavioral and dental toxicities of sodium fluoride in rats. **Fluoride**, v.36, n.3, p.189-97, 2003.

FABRE, R.; TRUHAUT, R. Tóxicos Fixos de Natureza Mineral. In:\_\_\_\_\_. **Toxicologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1971. p 630-642.

GUAN, Z; WANG, Y.; XIAO, K.; DAI, D.; CHEN, Y.; LIU, J.; SINDELAR, P.; DALLNER, G. Influence of chronic fluoride on membrane lipids in rat brain. **Neurotoxicology Teratology**, v.10, n.5. 537-42. 1998.

HARINARAYAN, C.V.; KOCHUPILLAI, N.; MADHU, S.V.; GUPTA, N.; MEUNIER, P.J. Fluorotoxic metabolic bone disease: An osteo-renal syndrome caused by excess fluoride ingestion in the tropics. **Bone**, v.39, p.907-14, 2006

HARRIS, N.O.; DENT, M.Sc.; HAYES, R.L. A tracer study of the effect of acute and chronic exposure to sodium fluoride on the thyroid iodine metabolism of rats. **J Dent Res** 1954;34:470.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed. 19-57. 2006.

LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. **Rev. Saúde Pública**, 35(6)576-81, 2001.

LITOVITZ, T.L.; SCHMITZ, B.F.; BAILEY, K.M. 1989 annual report of the American Association of Poison Control Centers National Data Collection System. **Am J Emerg Med**, v.8, p.394-442, 1990.

LONG, Y.G.; WANG, Y.N.; CHEN, J.; JIANG, S.F.; NORDBERG, A.; GUANA, Z.Z. Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. **Neurotoxicol Teratol**, v.24, p.751-57, 2002.

LU, Y.; SUN, Z.R.; WU, L.N.; WANG, X.; LU, W.; LIU, S.S. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. **Fluoride**, v.33, n.2, p.74-8, 2000.

MALTZ, M.; WANNMACHER, F.F. Fluoretos como medicamentos. In: WANNMACHER, L. e CARDOSO, M.B. **Farmacologia Clínica Para Dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.181-193.

MELLO e SOUZA, T.; ROHDEN, A.; MEINHARDT, M.; GONCALVES, C.A.; QUILLFELDT, J.A. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. **Physiol Behav**, v.71, n.1-2, p.29-33, 2000.

MICHAEL, M., BAROT, V.V., CHINOY, N.J. Investigation of soft tissue functions in fluorotic individual of North Gujarat. **Fluoride** 29,63, 1996.

MULLENIX, P.J.; DENBESTEN, P.K.; SCHUNIOR, A.; KERNANS, W.J. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. **Neurotoxicol Teratol**, v.17, n.2, p.169-77, 1995.

NARVAI, P.C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Rev C S Col**, v.5, n.2, p.381-92, 2000.

NOPAKUN, J.; MESSER, H.H.; VOLLER, V. Fluoride Absorption from the Gastrointestinal Tract of Rats. **Journal of Nutrition**, 119: 1411-17 (1989).

OZSVATH, D.L. Fluoride and environmental health: a review. **Rev. Environ. Sci Biotechnol.** 8:59-79. 2009

PAK, C.Y.C; ZERWEKH, J.E.; ANTICH P. Anabolic Effects of fluoride on bone. **Trends in endocrinology and Metabolism** v. 6; n.7,229-34. 1995.

PAUL, V.; EKAMBARAM, P.; JAYAKUMAR, A.R. Effects of sodium fluoride on locomotor behavior and a few biochemical parameters in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.6, p.187-91, 1998.

PEDRAZZA E.L., RIBOLDI G.P., PEREIRA G.S., IZQUIERDO I., BONAN C.D., Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience Letters.** 413 (2007) 21-24.

PESSAN, J.P.; SILVA, S.M.B.; BUZALAF, M.A.R. Avaliação da ingestão total de flúor de crianças entre 4 e 7 anos de idade através da dieta e dentifrício. **J Appl Oral Sci**, vol.11, no.2, p.150-156, 2003.

SHAN, K.R.; QI, X.L.; LONG, Y.G.; NORDBERG, A.; GUAN, Z.Z. Decreased nicotinic receptors in PC12 cells and rat brains influenced by fluoride toxicity—a mechanism relating to a damage at the level in post-transcription of the receptor genes. **Toxicology**, v.200, n.2-3, p.169–77, 2004.

SHIVARAJASHANKARA, Y.M.; SHIVASHANKARA, A.R.; GOPALAKRISHNA BHAT, P.; HANUMANTH RAO, S. Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. **Fluoride**, v.35, n.3, p.197-203, 2002. b

SILVA, M.F.A. Flúor: Metabolismo, Toxicologia, Fluorose e Cárie. In: KRIGER L. **Promoção de Saúde Bucal.** São Paulo: Artes Médicas, 2003. p.153-179.

SPITTLE, B. Psychopharmacology of fluoride: a review. **Int Clin Psychopharmacol**, v.9, p.79-82, 1994.

SUDHA, S. ; MADEPALLI, K. L.; PRADHAN, N. Chronic Phenytoin induced impairment of learning and memory with associated changes in brain acetylcholine esterase activity and monoamine levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** Vol.52,n.1, pp.119-124, 1995.

TAKASE, I.; KONO, K.; TAMURA, A.; NISHIO, H.; DOTE, T.; SUZUKI, K. Fatality due to acute fluoride poisoning in the workplace. **Leg Med**, v.6, p.197–200, 2004.

THIEL, C.M., HUSTON, J.P., SCHWARTING, R.K.W., Hippocampal acetylcholine and habituation learning. **Neuroscience** 4, 1253-1262. 1998.

TRABELSI, M.; GUERMAZI, F.; ZEGHAL, N. Effect of fluoride on thyroid function and cerebellar development in mice. **Fluoride**, v.34, n.3, p.165-73, 2001.

TRIVEDI, M.H.; VERMA, R.J.; CHINOY, N.J.; PATEL, R.S.; SATHAWARA, N.G.; Effect of high fluoride water on intelligence of school children in India. **Fluoride** 40(3)178-83. 2007.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. **Comm Dent Oral Epidemiol** 6:315-328, 1978.

VARNER, J.A.; JENSEN, K.F.; HORVATH, W.; ISAACSON, R.L. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. **Brain Res**, v.784, n.1-2, p.284-98, 1998.

XIANG, Q.; LIANG, Y.; CHEN, L.; WANG, C.; CHEN, B.; CHEN, X.; ZHOUC, M. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. **Fluoride**, v.36, n.2, p.84-94, 2003.

WANG, J.; GE, Y.; NING, H.; WANG, S. Effects of high fluoride and low iodine on biochemical indexes of the brain and learning-memory of offspring rats. **Fluoride**, v.37, n.3, p.201-8, 2004.

WHITFORD, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J Dent Res**, v.69, p.539-49, 1990.

WHITFORD, G.M. Acute and chronic fluoride toxicity. **J Dent Res**, v71, n.5, p.1249-54, 1992.

WHITFORD, G.M.; STODDARD, J.L.; HOBBS, S.H. Appetitive-based learning in rats: lack of effect of chronic exposure to fluoride. **Neuroxicology and Teratology**, 1-6. 2006.

WU, C.; GU, X.; GE, Y.; ZHANG, J.; WANG, J. Effects of high fluoride arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. **Fluoride**. 39(4)274-79. 2006.

ZHANG, M.; WANG, A.; XIA, T.; HE, P. Effects of fluoride on DNA damage, s-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kB in primary culture rat hippocampal neurons. **Toxicology Letters**, 179 (2008) 1-5.

ZHANG, Z.; XU, X.; SHEN, X.; XU, X. Effect of fluoride exposure on synaptic structure of brain areas related to learning-memory in mice. **Fluoride**. 41(2)139-43. 2008.

ZHAO, L.B.; LIANG, G.H.; ZHANG, D.N.; WU, X.R. Effect of a high fluoride water supply on children' s intelligence. **Fluoride**. v.29,n.4, 190-92. 1996.