

LÉA ROSA CHIOCA

**INGESTÃO CRÔNICA DE FLÚOR INDUZ PREJUÍZO NOS TESTES DE
HABITUAÇÃO E ESQUIVA ATIVA EM RATOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Silva Santos

CURITIBA

2007

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Luiz e Délia, minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, Denize, Raimundo, Ana Paula e Natália; Lorena, Volmir, Rubens, Rodrigo e Marina; e ao meu marido Marcelo.

Por todo apoio, amor, carinho e confiança!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Délia Chioca, pelo apoio, incentivo, confiança e amor a cada dia. Por serem exemplos de vida! Admiro muito vocês! Se cheguei até aqui foi porque sempre tive vocês ao meu lado. Amo vocês!

A toda minha família, especialmente a Denize, Raimundo, Ana Paula e Natália; e a Lorena, Volmir, Rubens, Rodrigo e Marina, pela força, incentivo, confiança e amor constante. Vocês foram fundamentais para a realização de mais essa etapa na minha vida. Amo vocês!

Ao meu marido Marcelo, por todo amor, carinho, ajuda e compreensão, pela presença constante, companheirismo e amizade, por sempre me dar força e cuidar de mim! Amo você!

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Andreatini, e a Prof. Dra. Estela, minha co-orientadora, pelos ensinamentos, compreensão, ajuda e confiança. Pela ótima orientação que permitiu a realização desse trabalho.

Aos demais professores do departamento de Farmacologia pelos ensinamentos.

Ao Centro Universitário Positivo, na pessoa da profa. Dr. Maria Fernandes Torres, responsável pelo biotério da UNICENP, pelos animais cedidos para realização desse trabalho.

Aos funcionários do departamento de farmacologia, pela ajuda.

A todos os amigos que me acompanharam, dando força e ajuda nessa etapa.

*“A verdadeira dificuldade não está em aceitar idéias novas,
mas em fugir das idéias antigas”*

John Maynard Keynes

Nota Explicativa:

Dissertação apresentada em formato alternativo - artigos para publicação - conforme aceito pelas normas do programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

Composta por dois artigos:

Sendo o primeiro, um Artigo de Revisão sobre os Efeitos da Intoxicação com Flúor no Sistema Nervoso Central, correspondente a introdução da dissertação;

O segundo, um Trabalho Original (Chronic fluoride intake induce impairment in habituation and active avoidance tasks in rats), abordando os experimentos realizados e a discussão dos resultados.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. TEXTO 1: “EFEITOS DA INTOXICAÇÃO COM FLÚOR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL”.....	1
1.1. Resumo.....	2
1.2. Abstract.....	2
1.3. Introdução.....	3
1.4. Cinética do Flúor.....	4
1.5. Toxicidade.....	5
1.5.1. Toxicidade Aguda.....	6
1.5.2. Toxicidade Crônica.....	6
1.6. Conclusão.....	13
1.7. Referências.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. TEXTO 2: “CHRONIC FLUORIDE INTAKE INDUCE IMPAIRMENT IN HABITUATION AND ACTIVE AVOIDANCE TASKS IN RATS”.....	20
3.1. Introduction.....	21
3.2. Material and Methods.....	23

3.2.1 Animals.....	23
3.2.2 Fluoride administration.....	23
3.2.3 Food, water and fluoride intake and body weight gain.....	23
3.2.4 Dental fluorosis.....	24
3.2.5 Open-field test.....	24
3.2.6 The two-way active avoidance task.....	25
3.2.7 Statistical analysis.....	26
3.3. Results.....	27
3.3.1 Food, water and fluoride intake and body weight gain.....	27
3.3.2 Open Field.....	27
3.3.3 Two-way active avoidance task.....	28
3.4. Discussion.....	28
3.5. References.....	32
4. CONCLUSÕES.....	40
5. REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE ILIUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico do número de cruzamentos no Campo Aberto para cada grupo, 1.5, 50 e 100 ppm, nas sessões treino e teste.....	38
Figura 2: Gráficos da esquiva ativa de duas vias. Tempo de latência para fuga do choque (A) e número de esquivas (B) para os grupos 1.5, 50 e 100 ppm.....	39
Tabela 1: Média diária da ingestão de água, ração e fluoreto de sódio, ganho de peso e fluorose dental nos incisivos de ratos tratados com 1.5, 50 e 100 ppm de fluoreto de sódio.....	37
Anexo 1: Tabelas de alterações observadas em animais tratados cronicamente com Flúor.....	48

LISTA DE BREVIATURAS

C.A - Campo Aberto

CS - Conditioned stimulus

DPT - Dose Provavelmente Tóxica

F - Flúor

HF - Ácido Hidrofluorídrico

MFP - Monofluorofosfato Dissódico

NaF - Fluoreto de Sódio

SNC - Sistema Nervoso Central

UCS - Uncoditioned stimulus.

RESUMO

Baseado em relatos de casos clínicos sugerindo que intoxicação com fluoreto de sódio (NaF) pode causar prejuízos no aprendizado e na memória, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do NaF em ratos submetidos a dois testes de memória: habituação ao campo aberto esquiva ativa de duas vias. Ratos machos adultos foram expostos, durante 30 dias, a fluoreto de sódio na água de beber em três concentrações: 1.5 (controle), 50 e 100 ppm de NaF (correspondendo a ingestão de 0.04 ± 0.002 , 2.33 ± 0.06 , e 4.87 ± 0.17 mg/kg de flúor, respectivamente). Ao final dos trinta dias de tratamento os ratos foram expostos ao campo aberto e re-expostos após 24h (sessão teste). Na esquiva ativa de duas vias, diferentes grupos de ratos passaram por uma sessão de treino composta por trinta tentativas de esquiva, em que os ratos devem cruzar de um lado para outro do aparato para evitar um choque nas patas que é precedido por um sinal sonoro. Estes ratos foram testados após 24h (sessão teste) no mesmo protocolo. Fluorose dental também foi avaliada. Os grupos 50 e 100 ppm de NaF apresentaram prejuízo na habituação, o que não ocorreu com o grupo 1.5 ppm de NaF. Além disso, o NaF a 100 ppm provocou redução no número de esquivas no teste de esquiva ativa. Os animais não apresentaram prejuízo locomotor. Fluorose dental leve foi observada nos dentes incisivos dos animais tratados com 50 e 100 ppm de NaF. Portanto, esses resultados sugerem que mesmo uma intoxicação moderada com fluoreto de sódio pode ter um efeito potencialmente deletério sobre o aprendizado e memória.

Palavras-chaves: flúor, memória, ratos, neurotoxicidade, água.

ABSTRACT

Since clinical case reports suggest that sodium fluoride (NaF) intoxication may impair learning and memory, the objective of the present study was to evaluate the effect of NaF in rats submitted to two memory tasks: open-field habituation and two-way active avoidance. Adult male rats were exposed for 30 days to NaF in the drinking water in three concentrations: 1.5 (control), 50 and 100 ppm NaF (corresponding to intake of 0.04 ± 0.002 , 2.33 ± 0.06 , and 4.87 ± 0.17 mg/kg of fluoride, respectively). At day 30, the rats were exposed to an open-field and re-exposed to it after 24h (test session) to measure habituation. In the two-way active avoidance task, three different groups of rats were trained in a 30-trial avoidance training session, in which the rats must cross from one side to another of the apparatus to avoid a footshock preceded by a sound cue. These rats were tested again 24h later (test session) by the same protocol. Dental fluorosis was also evaluated. Habituation was impaired by 50 and 100 ppm, but not by 1.5 ppm NaF. Moreover, NaF 100 ppm reduced the number of avoidance response in the active avoidance task. No locomotor impairment was seen. Mild dental fluorosis in rat incisor teeth was found in 50 and 100 ppm NaF groups. Overall, these results suggest that a moderate intoxication with sodium fluoride has potential deleterious effect in learning and memory.

Key words: fluoride, memory, rat, neurotoxicology, drinking water

1 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO COM FLÚOR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

(EFFECTS OF FLUORIDE INTOXICATION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM)

Autores:

Léa Rosa Chioca. Aluna de Mestrado em Farmacologia.¹

Estela Maris Losso. Professora Dra. em Odontopediatria²

Roberto Andreatini. Professor Dr. em Ciências (Psicobiologia) ¹

1. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia.

Endereço: Centro Politécnico, Jardim da Américas, Curitiba - PR, Caixa Postal: 190-31,
CEP: 81531-980.

2. Centro Universitário Positivo, Curso de Odontologia

Endereço: Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Campo Comprido - Curitiba
- PR - CEP 81280-330.

e-mail do responsável: leachioca@yahoo.com.br

1.1 RESUMO

O flúor é um elemento químico com ação anticariogênica, que tem sido adicionado à água de abastecimento público, a produtos dentais (dentifrício e soluções para bochecho), alimentos, medicamentos (complexos vitamínicos) e que pode estar presente naturalmente na água. A variação dos níveis na água e a variedade de fontes de flúor podem proporcionar um consumo elevado, o que pode atingir nível tóxico. Exceto em relação a fluorose dentária e óssea, a literatura a respeito da toxicidade do flúor é restrita, existindo poucos relatos de intoxicação em humanos, que sugerem que a exposição crônica ao flúor pode afetar funções cerebrais, particularmente a memória. Estudos pré-clínicos observaram alterações comportamentais (prejuízos locomotor, na coordenação motora e na memória), bioquímicas e histológicas (como diminuição da atividade enzimática da colinesterase plasmática, diminuição das células de Purkinje cerebelares e de receptores nicotínicos cerebrais) e redução na ingestão de comida e água, com prejuízo no ganho de peso. Considerando que o flúor sistêmico é um método de prevenção de cárie adequado que atinge um grande número de pessoas, a determinação da sua segurança é indispensável, pois mesmo eventos de baixa frequência podem acarretar um número significativo de pessoas afetadas. Portanto existe a necessidade de mais estudos pré-clínicos dos reais efeitos do flúor sobre o sistema nervoso central.

Palavras-chaves: Flúor, toxicidade, neurotoxicidade, memória.

1.2 ABSTRACT

The fluoride have anticariogenic action and it is added public water supplies, to the dental products, foods, vitamins and it can be present naturally in water. A variation of the levels in the water and the multiple fluoride sources can provide a toxic level for the organism. Except for dental and bone fluorosis, the literature related to fluoride toxicity is restricted, and the few case reports of human poison available suggest that the chronic exposition to fluoride can affect cerebral functions, memory particularly. Experimental studies had show behavioral alterations (impairment of locomotor, motor coordination

and memory), biochemistry and histological (reduction in the activity of blood cholinesterase, reduction of the Purkinje cells and decrease of brain neuronal nicotinic acetylcholine receptors), reduction of food and water consume leading to reduced body weight gain. Considering that the systemic fluoride is an adequate preventive method for caries that is applied to a great number of people, the determination of its security is indispensable because even adverse events with low frequency may correspond to a great number of affected people. Thus, additional experimental studies about the effect of fluoride on the central nervous system are necessary.

Key-words: Fluoride, toxicity, neurotoxicity, memory.

1.3 INTRODUÇÃO

As primeiras descobertas do efeito anticariogênico do flúor se originaram no início do século passado a partir da observação da diminuição da prevalência de cárie e o aparecimento de manchas brancas no esmalte dos dentes em crianças de determinadas regiões dos Estados Unidos que apresentavam altas concentrações de flúor na água (NARVAI, 2000). Essas manchas em forma de linhas ou pontos esbranquiçados no esmalte, conhecidas por fluorose dentária, são resultantes da hipomineralização e aumento da porosidade do esmalte em consequência da ingestão excessiva de flúor durante o período de formação do esmalte (MALTZ; WANNMACHER, 1999).

A partir disso tentou-se estabelecer uma concentração tal de flúor na água que fosse capaz de atuar na prevenção de cáries com o mínimo tolerável de fluorose nas populações expostas. Por volta de 1951 a American Dental Association/ADA recomendou oficialmente a fluoretação da água em 1 ppm como estratégia de saúde pública para prevenir cárie dentária (ADA, 1951). Segundo a Organização Pan-Americana de saúde vinculada a Organização Mundial de Saúde a concentração ótima de flúor na água é de 1 ppm ou seja, 1 mgF/l (OPAS/OMS, 2001). No Brasil, em 1974, foi lançada a lei nº 6050, a qual dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas de abastecimento quando existir estação de tratamento. Atualmente a implantação do

programa Brasil Sorridente, do Ministério da Saúde, apresenta entre as medidas preventivas garantia da fluoretação da água em 100% dos municípios com sistema de abastecimento, atualmente 60% das cidades já tem o serviço (Diário do Senado Federal, 2005).

Por muito tempo prevaleceu o conceito de que seria necessário o uso sistêmico (pré-eruptivo, ou seja, no período de formação dos dentes) de flúor, e que a ação anticariogênica se dava pela incorporação do flúor ao esmalte durante a fase de mineralização dentária sob forma de fluorapatita, o que deixaria o esmalte mais resistente a desmineralização. Conseqüentemente, o flúor foi muito indicado como medicamento para crianças e gestantes na forma de suplementos (ASSIS *et al.*, 1999; MULLENIX *et al.*, 1995). Na realidade o efeito anticariogênico do flúor ocorre por sua ação local, interferindo no processo de desenvolvimento da doença cárie de forma ativa. Desde que presente constantemente no ambiente bucal, atua nos processos de desmineralização e remineralização a que são submetidos os dentes devido à produção de ácidos bacterianos. Deve ser enfatizado que, embora o flúor seja extremamente eficaz, ele isoladamente só reduz perdas de minerais, sendo importante à associação com outras medidas preventivas, como a ação conjunta da escovação para remoção da placa bacteriana (ASSIS *et al.*, 1999; MULLENIX *et al.*, 1995; SILVA, 2003).

1.4 CINÉTICA DO FLÚOR.

O flúor pode ser absorvido através da mucosa bucal, especialmente em soluções ácidas; porém a maior taxa de absorção do flúor ocorre no trato gastrintestinal. A passagem do flúor se dá principalmente de forma passiva na sua forma molecular, ácido hidrófluorídrico (HF, $pK_a = 3,4$) (WHITFORD, 1990). A redução do pH acelera a absorção, logo a acidez estomacal facilita a absorção e conseqüentemente os efeitos tóxicos (SILVA, 2003). O monofluorofosfato dissódico (MFP), principal ingrediente ativo dos dentífrícios, é absorvido após hidrólise enzimática das moléculas por fosfatases, sendo esse processo de absorção a única diferença importante entre os metabolismos do MFP e do flúor iônico, por esse motivo também o MFP causa menos irritação a mucosa gástrica se comparado ao fluoreto de sódio (WHITFORD *et al.*, 1990).

Após a absorção do flúor, seja em pequenas quantidades pela mucosa bucal ou em quantidades maiores pelo trato gastrointestinal, 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 *et al.*, 1990). Na excreção renal existe a possibilidade de ocorrer reabsorção tubular de parte do flúor, então, se a urina estiver neutra ou alcalina praticamente todo o flúor permanece na forma iônica, logo é mais facilmente excretado por não atravessar a parede tubular; o contrário ocorre em urina ácida, a qual favorece a formação de HF, que é permeável a parede do túbulo e, por difusão, o flúor volta ao fluido intersticial (SILVA, 2003; WHITFORD, 1990). Outra característica do flúor iônico é de não se ligar a proteínas plasmáticas, embora exista uma fração de flúor ligada à macromolécula no plasma que aparentemente não é intercambiável com o flúor iônico; logo as concentrações encontradas no plasma e fluido intersticial podem ser consideradas idênticas. Portanto, os estudos de distribuição do flúor podem usar os níveis de concentração plasmática como referência para concentração extracelular (WHITFORD, 1990; SPITTLE, 1994).

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).

1.5 TOXICIDADE

Embora estudos demonstrem pouco ou nenhum efeito pré-eruptivo no controle da cárie, não há dúvida de que a fluoretação da água de abastecimento é uma medida coletiva efetiva na prevenção da cárie dentária, já que assim o flúor se apresenta acessível a população e permitindo dessa forma, contado constantemente com a cavidade bucal. Porém, o flúor se encontra disponível na natureza, assim como em vários produtos industrializados, podendo ser ingerido em quantidades variadas. Portanto, ao somar todas estas fontes, as pessoas podem estar expostas a concentrações tóxicas de flúor (MULLENIX *et al.*, 1995; MALTZ; WANNMACHER, 1999).

1.5.1 TOXICIDADE AGUDA

Há relatos de casos de intoxicação com flúor, por ingestão de produtos dentais, que levaram a morte. Desde 1978 houve quatro casos fatais, com as doses variando entre 4 a 30mg/kg, sendo que três vítimas eram crianças (WHITFORD, 1992). Dentre os sinais e sintomas de uma intoxicação aguda por flúor, encontram-se, vômito, diarreia, broncoespasmo, fibrilação ventricular, pupilas dilatadas, hemoptise, câimbras, colapso cardíaco, hipercalemia, 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 (1992) estimou, pela média de 4 casos fatais, que em uma intoxicação aguda a dose provavelmente tóxica (DPT) sugerida para humanos seria de 5mg/kg (WHITFORD, 1990) Considerando-se que a DPT para uma criança de 25kg seja 125mg e que um tubo de dentifrício contém 130,5 mg de flúor, a DPT para uma criança de seis anos ou menos pode ser encontrada em produtos dentais. Isto leva-nos a pensar sobre a falta de conhecimento sobre as doses toleráveis que deveriam estar explícitas nos produtos que contém flúor.

1.5.2 TOXICIDADE CRÔNICA

O flúor ingerido em baixas doses, por período prolongado, está relacionado com alterações nas estruturas dentais e ósseas. O íon flúor atua de maneira tóxica precipitando o cálcio, elemento essencial a várias funções fisiológicas, em particular aos tecidos musculares e nervosos. Na toxicidade crônica do flúor, pela sua afinidade com os fosfatos, forma a fluorapatita; e com o cálcio forma o fluoreto de cálcio, pouco solúvel. Sendo assim, os tecidos ósseo e dentário portadores de uma elevada porcentagem de cálcio e fosfato, podem sofrer os efeitos tóxicos do flúor, resultando em alterações dentárias, como fluorose; e óssea, como a hipercalcificação, chamada osteopetrose ou osteosclerose, tornando os ossos frágeis (FABRE; TRUHAUT, 1971; HARINARAYAN *et al.*, 2006). No caso da fluorose as células responsáveis pela formação e secreção do esmalte, os ameloblastos, são sensíveis ao flúor, principalmente nos estágio iniciais, da maturação do esmalte (BROWNE *et al.*, 2005).

Dentre os possíveis mecanismos da ação do flúor sobre os ameloblastos estão incluídos: efeitos sistêmicos do flúor sobre a homeostasia do cálcio, alteração na secreção de proteínas, dano na biossíntese da matriz, efeitos diretos sobre proteínas extracelulares e proteinases, alteração na formação e morfologia dos cristais de hapatita e efeitos específicos sobre o metabolismo e funcionamento celular (BROWNE *et al.*, 2005; DENBESTEN; THARIANI, 1992). Kubota *et al.* (2005) em um estudo “in vitro” com ameloblastos, constataram que o flúor, nas concentrações de 1.9 a 3.8 ppm, inibiu o crescimento celular e que doses mais altas provocaram estresse ao retículo endoplasmático, o que pode ser a causa do prejuízo na síntese de proteínas, além de notarem também fragmentação do DNA. Outra alteração óssea que pode ser causada é a descalcificação, que conduz a osteoporose, tornando os ossos porosos e friáveis. Apesar de as duas alterações nos tecidos ósseos apresentarem características opostas, elas se encontram associadas ao mesmo fator causal, uma perturbação no metabolismo fosfo-cálcico (FABRE; TRUHAUT, 1971; HARINARAYAN *et al.*, 2006).

Um outro aspecto da intoxicação por flúor é a neurotoxicidade, ou seja, danos tóxicos ao sistema nervoso central causados pelo flúor. A barreira hematoencefálica é relativamente impermeável ao flúor, mas quando usado com finalidade terapêutica em grandes quantidades ou disponível em altas concentrações no meio ambiente pode transpô-la (SPITTLE, 1994). Nesse sentido a presença de flúor no fluido cerebrospinal foi relatada por Yu-Huan e Si-Shung (1988), que mediram os níveis de flúor no fluido cerebrospinal de pacientes expostos a concentrações normais de flúor na água de abastecimento (menos de 1 ppm) e pacientes com fluorose, expostos a níveis elevados de flúor (10 ppm). Foi constatado que o nível de flúor no fluido cerebrospinal foi mais baixo que no sangue para os dois grupos, os quais não tiveram diferença significativa.

Muitos anos de exposição ao flúor não têm resultado em problemas óbvios ao sistema nervoso central (SNC), tais como apreensão, letargia, salivação, tremores, paralisia ou deficiência sensorial. Entretanto, existe a possibilidade de que a exposição ao F esteja ligada a sutis disfunções cerebrais, campo ainda inexplorado (MULLENIX *et al.*, 1995).

Experimentos em animais de laboratório tem sido realizados com o intuito de se obter uma melhor compreensão dos efeitos neurotóxicos do flúor. Por exemplo, após a administração fluoreto de sódio a 20 ou 40 mg/kg 60 dias em ratas fêmeas, Paul *et al.* (1998), observaram que o fluoreto de sódio diminuiu a atividade motora espontânea de maneira dose dependente; já a coordenação motora não apresentou alterações; podendo indicar uma ação central do flúor, através da inibição de motivação desses animais. Também foi observado que os animais tratados tiveram um prejuízo no ganho de peso (dependente da dose de fluoreto de sódio) e que houve diminuição na concentração total de proteínas no plasma, fígado e músculo esquelético desses animais. Além disso, relataram que o fluoreto de sódio nesses animais causou diminuição da atividade da colinesterase no sangue, embora a atividade da acetilcolinesterase nas regiões do cérebro avaliadas (córtex cerebral, tronco encefálico e cerebelo) não sofreu alteração.

Com propósito de avaliar o potencial tóxico do NaF sobre o desenvolvimento fetal, Collins *et al.* (1995) trataram ratas com flúor de 10 a 250 ppm na água de beber até o 20º dia de gestação. Concluíram que não houve diferenças em relação aos grupos controle, exceto para os animais que receberam 250 ppm de NaF, que apresentaram diminuição da ingestão de comida e água. Embora esse grupo tenha apresentado um maior número de fetos com três ou mais variações ósseas, este resultado não foi estatisticamente significativo. Portanto nesse estudo o NaF não apresentou teratogenicidade.

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. 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. Ratas Wistar foram tratadas com NaF 500 mg/l na água de beber a partir do 15º dia de gestação até o nascimento dos filhotes, os quais continuaram a receber o tratamento até o 14º dia de vida. Ao final desse período, animais tratados foram comparados com animais controle, sendo

observado que os animais que receberam NaF apresentaram diminuição de 75% do hormônio T4 (tiroxina) livre no plasma. 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, nos animais estudados, 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.

Observando-se os efeitos tóxicos do flúor, administrado cronicamente, sobre o comportamento e estrutura dental, Ekambaram; Paul (2001), analisaram o possível efeito preventivo do cálcio. Ratas fêmeas adultas Wistar foram tratadas durante 60 dias com fluoreto de sódio (NaF) 500 ppm na água de beber apenas ou em combinação com carbonato de cálcio 50 mg/kg administrado através de gavagem. Todos os animais tratados com NaF apresentaram aumento da concentração do mesmo no plasma, diminuição de ingestão de comida com conseqüente redução no ganho de peso corporal, prejuízo na atividade motora exploratória e coordenação motora, lesões dentais, 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. 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. Estes dados sugerem, então, que o cálcio esteja prevenindo não apenas a hipocalcemia induzida pelo flúor, mas também a toxicidade do flúor sobre a estrutura dental e comportamento locomotor, provavelmente por diminuir a biodisponibilidade do flúor por interação no trato gastrintestinal. Após essa observação do possível efeito preventivo do cálcio na intoxicação crônica por flúor, Ekambaram; Paul (2003), analisaram o efeito da vitamina D em animais submetidos a fluoreto de sódio. Isso porque a vitamina D aumenta a absorção gastrintestinal do cálcio. Ratas fêmeas

adultas Wistar foram tratadas durante 60 dias com NaF 500ppm na água de beber apenas ou em combinação com vitamina D 200UI/Kg administrada através de gavagem. Todos os animais tratados com NaF tiveram os mesmos resultados do experimento anterior. A administração de vitamina D apenas, não apresentou modificações significantes em nenhum dos parâmetros avaliados. O grupo que recebeu vitamina D juntamente com NaF apresentou prevenção da hipocalcemia e da diminuição ingestão de comida e ganho de peso; enquanto que os demais parâmetros se mantiveram iguais aos animais tratados apenas com NaF. Isso ocorreu provavelmente porque a vitamina D não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de flúor, mas conseguiu restabelecer 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 o restabelecimento dos níveis de cálcio plasmático.

Aumento significativo nos níveis de flúor no plasma e cérebro após exposição ao fluoreto de sódio em ratos Sprague-Dawley foi observado por MULLENIX *et al.* (1995). 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.

Em uma revisão, Spittle (1994), relata aspectos clínicos de intoxicações crônicas pelo flúor em humanos, 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. A interação entre flúor e alumínio foi estudada por Allain *et al.* (1996), os quais constataram que o complexo formado por flúor e alumínio aumenta a absorção de alumínio, mas diminui a absorção de flúor. Então, Varner *et al.* (1994), demonstraram que em certos níveis o alumínio pode diminuir a

captação de flúor, reduzindo os efeitos tóxicos do flúor, porém, concentrações baixas de alumínio, na forma de fluoreto de alumínio, causou maiores alterações neuronais e prejuízos à integridade cerebrovascular que o fluoreto de sódio, em ratos tratados cronicamente, ambos com a mesma concentração de flúor.

Outros casos relatados por Spittle (1994), também apresentaram, fadiga progressiva generalizada associada com um declínio mental, quadros de esquecimento, problemas para coordenar os pensamentos e redução na habilidade de escrever. Em geral, dificuldades de concentração e prejuízos na memória não ocorrem de maneira isolada, são acompanhados por outros sintomas, como mal estar geral, fadiga, e outros envolvidos com o trato gastrointestinal, trato urinário e sistema muscular (SPITTLE, 1994).

Estudos estimam a quantidade de flúor ingerido por crianças em idade pré-escolar. Bentley *et al.* (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. Lima; Cury (2001) constataram, que do total, em média 55% do flúor ingerido é proveniente da deglutição do dentifrício durante a escovação, esse dado foi justificado pelo fato de que, nessa idade as crianças não possuem total controle sobre os músculos da deglutição. Ainda Pessan *et al.* (2003), contataram 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. Sendo 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.

Este fato, associado às características farmacocinéticas e ao estágio de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, podem tornar esta faixa etária mais suscetível aos efeitos cognitivos do flúor como dificuldades de aprendizado e memória quando administrado em altas concentrações ou por tempo prolongado (SPITTLE, 1994). Sendo assim, Lu *et al.* (2000), observaram diminuição significativa do QI (Intelligence Quotient) através da aplicação do Chinese Combined Raven's Test em 60 crianças expostas a altas concentrações de flúor na água de beber (3.15 ± 0.61 ppm)

quando comparadas a 58 crianças, sob as mesmas condições socioeconômicas, expostas a concentrações mais baixas (0.37 ± 0.04 ppm). Resultado semelhante também foi observado por Xiang *et al.* (2003), ao aplicar o mesmo teste a 222 crianças expostas a uma concentração média de flúor de 2.47 ± 0.79 ppm, quando comparadas a 290 crianças expostas a uma concentração média de flúor de 0.36 ± 0.15 ppm. Porém existem críticas em relação à metodologia desses trabalhos, questionando sua validade (POLLICK, 2006). Apesar de estudos experimentais não detectarem teratogenicidade do flúor em ratos (COLLINS *et al.*, 1995), Wang *et al.* (2004) observaram prejuízo significativo na memória e aprendizado de ratos, tratados com flúor desde a sua gestação até o 30º dia de vida, comparados com ratos controles, quando submetidos ao teste de esQUIVA inibitória. Este possível efeito deletério do fluoreto na memória é reforçado por estudo recente de nosso grupo que observou um prejuízo na tarefa de habituação ao campo aberto de ratos tratados com fluoreto de sódio (50 e 100 ppm) (CHIOCA *et al.*, 2006).

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) e danos de cognição e memória em humanos (SPITTLE, 1994; LU *et al.*, 2000; XIANG *et al.*, 2003). Dentre os mecanismos propostos estão: inibição da síntese de polifosfoinositídeos, com conseqüente prejuízo na neurotransmissão mediada pela fosfolipase C (SARRI; CLARO, 1999); alterações histológicas demonstrando aspectos neurodegenerativos, como diminuição no número e no tamanho de neurônios e diminuição nas células de Purkinje cerebelares (TRABELSI *et al.*, 2001; SHIVARAJASHANKARA *et al.*, 2002a); 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).

1.6 CONCLUSÃO:

Considerando que a fluoretação da água de abastecimento atinge um grande número de pessoas e que existe um número reduzido de relatos de neurotoxicidade, pode-se supor que esse efeito seja pouco freqüente. Entretanto mesmo um evento pouco freqüente pode significar um elevado número de sujeitos afetados em uma grande população. Mais ainda, os dados revistos neste trabalho sugerem a existência de prejuízos motores e cognitivos. Portanto, há a necessidade do aumento da pesquisa clínica e pré-clínica deste assunto.

1.7 REFERÊNCIAS:

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.

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

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.

CHIOCA, L.R.; RAUPP, I.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Efeitos da administração sub-crônica de flúor na locomoção de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 21., 2006, São Paulo, Brasil. resumo 13.053. Disponível em: <<http://www.fesbe.org.br/fesbenovo/ver-resumo/ver.php?evn=1&rsm=319>> Acesso em: 25 Janeiro 2007.

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.1238-43, 1992.

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> Acesso em: 25 janeiro 2006.

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.

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

KUBOTA, K.; LEE, D.H.; TSUCHIYA, M.; YOUNG, C.S.; EVERETT, E.T.; MARTINEZ-MIER, E.A.; SNEAD, M.L.; NGUYEN, L.; URANO, F.; BARTLETT J.D. Fluoride Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Ameloblasts Responsible for Dental Enamel Formation. **J Biol Chem**, Vol. 280, N.24, p. 23194–202, 2005.

LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. **Rev Saude Publ**, v.35, n.6, p.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.

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.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, Representação Sanitária e Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). Disponível em: <<http://www.opas.org.br.2001>> Acesso em: 28 janeiro 2006

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.

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.

POLLICK, H.F. Concerns about water fluoridation, IQ, and osteosarcoma lack credible evidence. **Int J Occup Environ Health**, v12, n.1, p.91-4, 2006.

SARRI, E.; CLARO, E. Fluoride-induced depletion of polyphosphoinositides in rat brain cortical slices: a rationale for the inhibitory effects on phospholipase C. **Int J Dev Neurosci**, v.17, n.4, p.357-67, 1999.

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.; MUDDANNA RAO, S.; HANUMANTH RAO, S. Histological changes in the brain of young fluoride-intoxicated rats. **Fluoride**, v.35, n.1, p.12-21, 2002. a

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.

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.

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.

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.; BIRDSONG-WHITFORD, N.L.; FINIDORI, C. Acute oral toxicity of sodium fluoride and monofluorophosphate separately or in combination in rats. **Caries Res**, v.24, n.2, p.121-6, 1990.

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

YU-HUAN, H.; SI-SHUNG, W. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. **J Neurol Neurosurg Psychiat**, v.51, p.1591-3, 1988.

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito do flúor sobre a memória de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar o efeito do flúor em ratos tratados subcronicamente (30 dias) com fluoreto de sódio (1.5, 50 e 100 ppm) em dois testes de memória: habituação ao campo aberto e esquiva ativa de duas vias. Também serão avaliados os seguintes parâmetros: ingestão de comida, água e flúor, ganho de peso, atividade locomotora e grau de fluorose dental.

**3 CHRONIC FLUORIDE INTAKE INDUCE IMPAIRMENT IN HABITUATION
AND ACTIVE AVOIDANCE TASKS IN RATS**

Chioca LR¹, Rauppp IM¹, da Cunha C¹, Losso EM²,
Andreatini R^{1,*}

¹ Departamento de Farmacologia, UFPR

² Curso de Odontologia, UNICENP

* corresponding author: Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema

Nervoso Central

Departamento de Farmacologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Centro Politécnico C.P. 19031

81540-990 Curitiba - PR - Brazil

Phone: (41) 3361 1716

Fax: (41) 3226 2042 / (41) 3336 5962

E-mail: randreatini@ufpr.br

3.1 Introduction

Fluoride prevents dental caries so it is added to public water supplies. Furthermore, fluoride can be naturally present in the environment and frequently added in toothpaste, mouth rinses, processed beverages, and food (Buzalaf et al., 2004). Thus, the multiple sources of fluoride can lead us to exposure to toxic concentrations of fluoride (Whitford, 1990).

Chronic fluoride toxicity represents a severe hazard to human health. Excessive accumulation of fluoride in the body can exert toxic effects (Spittle, 1994). In addition to skeletal and dental fluorosis, well established as manifestations of chronic fluoride toxicity (Browne et al., 2005), there are some data suggesting that excessive exposure to fluoride may be associated to central nervous system dysfunction (Spittle, 1994). Spittle (1994), reviewing the literature, described 12 cases reporting psychiatric symptoms such as lethargy, memory impairment, and concentration and thinking difficulties that appeared after chronic exposure to fluoride. Most of them were related to fluoridated drinking water, although three cases involved industrial exposure. In this line, two studies associated reduced Intelligence Quotient of children with exposure to high fluoride levels in the drinking water (Lu et al., 2000; Xiang et al., 2003); although these studies have been criticized for the lack of methodological standards such as blindness (Pollick, 2006).

Animal studies have shown that chronic fluoride exposure may lead to changes in behavior (locomotor activity impairment); in central neurotransmission (reduction of the acetylcholinesterase activity and the levels of the $\alpha 4$ e $\alpha 7$ subunits of nicotinic acetylcholine receptors), and in neural survival (reduction of Purkinje cells in the

cerebellum (Ekambaram and Paul, 2001, 2003; Long et al., 2002; Paul et al., 1998; Trabelsi et al., 2001). However, since in these studies it was also observed a reduction in the ingestion of food and water and lower body weight gain in animals receiving high dose of fluoride daily for several days (Ekambaram and Paul, 2001, 2003; Paul et al., 1998), which can be considered confounding variables, some of the above data are considered false positive results (Ross and Daston, 1995). Another problem with some of these studies is the very high fluoride concentration (e.g. 500 ppm) and lack of actual fluoride intake data.

Relative to memory and learning, Wang et al. (2004) noted impairment in the step-down test in 30-day-old offspring rats that had been exposed high fluoride since conception, which can be considered a specific effect since another study did not see maternal clinical signs, fetal development effects or behavioral changes in offspring of female rats given 1.4 a 25.1 mg/kg sodium fluoride daily throughout gestation (Collins et al., 1995).

In the present study the main objective was to evaluate the effect of subchronic (30 day) sodium fluoride (NaF) solution (1.5, 50 or 100 ppm) intake in two memory tasks in adult rats: open-field habituation and two-way active avoidance. Additionally, the following parameters were also evaluated: food, water and fluoride intake; body weight gain; locomotor activity; and degree of dental fluorosis.

3.2 Material and Methods

3.2.1 *Animals*

Adult male Wistar rats weighing 280–350 g, from our own breeding colony, were randomly allocated for each test (50 or 100 ppm NaF) and control group (1.5 ppm NaF – tap water). The animals were housed singly, for the recording of food and water intake. Room temperature was maintained at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with lights on from 07:00 to 19:00 h. Food and water were freely available throughout the experiment. The experiments reported here were performed in accordance with National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (USA), and were approved by the internal Ethical Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Paraná State (protocol number 088).

3.2.2 *Fluoride administration*

The experimental groups received sodium fluoride solution (filtered water plus sodium fluoride) with 50 or 100 ppm (corresponding to 22.6 and 45.24 ppm fluoride ion respective). The control group was given access to drinking water containing 1.5 ppm NaF (tap water, corresponding 0.7 ppm fluoride ion).

3.2.3 *Food, water and fluoride intake and body weight gain.*

Food and water bottle were weighed every 3 days during the treatment in order to calculate the mean daily food and water intake.

The animals were weighed on the baseline (day of starting treatment) and then 24 h after the last day of treatment (30th). Body weight gain was calculated as the difference between final and baseline weight.

3.2.4 Dental fluorosis.

The degree of fluorosis of the rat teeth was evaluated in the incisors and they were assessed using the 0–5 scoring method of Boulton et al. 1995 (described by Ekambaram and Paul, 2003). Scoring was done as follows: (0) normal shape of teeth and smooth, glossy orange-yellow color of enamel; (1) slight whitening of the enamel; (2) faint horizontal banding of enamel; chalky spots, slight erosion; (3) chalky enamel, moderate erosion of tips, staining; (4) pitting and chipped off edges, loss of enamel color and heavy staining; (5) cutting tips splayed and eroded to blunt stubby abnormal curvature.

3.2.5 Open-field test

The locomotor activity and habituation¹ were measured in the open-field test (Kelly, 1993; Mello e Souza et al., 2000). The open-field used was a rectangular arena (50x40x63 cm), built from wood (three walls and the floor) and with a glass front panel (50x52 cm). The floor was divided by lines in 20 small squares (10x10 cm). The rats were placed individually in the center of the open-field and locomotion (number of squares crossed) was recorded for 2 min. A crossed square was defined as the rat putting its two forepaws in the next square and moving forward. The number of units

¹ Habituação: Diminuição na locomoção do animal na sessão de teste do campo aberto, indicando retenção da memória.

crossed in the open field was taken as a primary index of locomotor activity. The experiments were videotaped with a camera placed on the roof of the apparatus. The open-field was cleaned with water/ alcohol (10%) solution before behavioral testing to avoid possible bias due to odors and/or residues left by rats tested earlier. Twenty-four hours later, a test session procedurally identical to the training session, was carried out (Mello e Souza et al., 2000). The decrease in the number of squares crossed in the second session was taken as a measure of retention.

3.2.6 The two-way active avoidance task

The two-way active avoidance task was conducted in a two-way automated shuttle-box (GEMINI Avoidance System, San Diego Instruments, San Diego, CA), which consists of a chamber (23x50x23 cm) with a frontal dark plexiglass and a floor made of parallel 5-mm-caliber stainless-steel bars spaced 15 mm apart. The box is divided into two compartments of the same size by a wall with a door. In the training session, after 3 min of habituation, 30 sound cues (conditioned stimulus – CS. 1.5 kHz, 60 dB, maximum duration of 10 s) were paired with 0.5-mA foot shocks (unconditioned stimulus – UCS, maximum duration of 5 s), delivered during the last 5 s of the CS or until the animal had crossed to the other compartment, a behavior that turned off the shock delivery (or if the animal had avoided it during the initial 5 s of CS). The time between each sound cue presentation varied randomly ranging from 10 to 50 s. The test session, conducted 24 h later, was identical to the training one, except for a 2 min habituation time. The rat behaviors were classified as: avoidance (when the animal avoided the shock by crossing to the other side during the tone, but prior to shock delivery, i.e., within 5 s);

escape (when the animal crossed to the other side of the chamber during the last 5 s of CS, and, thus, it received the shock); failure to respond (the animal stayed in the side of shock delivery during the 5 s of shock period). The number of each behavior and the latency time (time elapse to cross to the other side of the box after the beginning of each CS – failure to response was recorded as 10 s) was recorded. Learning was evaluated by an increase in the number of avoidances and/ or a decrease in the latency time (Da Cunha et al., 2001; Ribeiro et al., 1999). The number of inter-trial crossings in the habituation period and test session was used as an index of locomotor activity in the apparatus (Ribeiro et al., 1999).

3.2.7 Statistical analysis

The behavioral data (open-field and latency time in the two-way active avoidance), consumption, and body-weight gain were analyzed by one- or two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test (comparison among different groups). Furthermore the Student t test for repeated measures was used to compare training and test scores in the open-field within the same group. The differences in the frequencies among groups in the two-way active avoidance task and inter-trial crossings were evaluated by Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's test. Frequency of fluorosis was analyzed by Fisher Exact test. Statistical significance was considered when $p \leq 0.05$.

3.3 Results:

3.3.1 Food, water and fluoride intake and body weight gain

No significant effect of fluoride in mean daily fluid and food consumption and body weight gain was seen (Table 1). The sodium fluoride intake increased in a dose-dependent manner [$F(2, 39) = 494.92, p < 0.001$]. A slight dental fluorosis was observed in the 50 and 100 ppm NaF treated animals (both $p < 0.01$), although no animal showed a degree of fluorosis above 1 (Table 1).

3.3.2 Open Field

Two-way ANOVA indicated a significant effect for the session factor [$F(1, 42) = 4.18, p < 0.05$] and for the interaction session x treatment [$F(2, 42) = 4.01, p < 0.05$] but not for the treatment factor [$F(2, 42), p = 2.23, NS$]. There was no difference among groups in the training session [$F(2, 42), p = 0.61, NS$]. On the other hand, there was a significant effect of NaF in the number of crossed squares in the test session [$F(2, 42) = 4.60, p < 0.05$]. Both 50 and 100 ppm NaF groups exhibited a higher locomotor activity compared to 1.5 ppm group ($p < 0.05$). Moreover, while the 1.5 ppm group showed a significant reduction in test session when compared to training session [$t(14) = 2.59, p < 0.05$], no significant effect was seen in the 50 ppm NaF group [$t(14) = 1.55, NS$] and 100 [$t(14) = -0.95, NS$]. (Fig. 1)

3.3.3 Two-way active avoidance task

In the two-way avoidance test there was a significant effect for the block trial factor [$F(5, 210) = 12.30, p < 0.0001$] but not for the treatment factor [$F(2, 42) = 3.17, p = 0.052$] or treatment x trial interaction [$F(10, 210) = 0.60, \text{NS}$].

There was a significant difference in avoidance frequency [$H(2,45) = 7.338, p < 0.03$] but not in escape [$H(2,45) = 2.564, \text{NS}$] or failure to respond frequencies [$H(2,45) = 4.226, \text{NS}$]. Dunn's test showed that higher fluoride concentration (100 ppm) exhibited a decrease in avoidance frequency when compared to 1.5 ppm NaF group; no other significant difference was found.

No significant difference in latency time was seen among treatments [$F(2, 42) = 1.15, \text{NS}$] in the subgroup that only escaped from the shock in trial 1 of test session (1.5 ppm: $5.6 \pm 0.1\text{s}, n=6$; 50 ppm: $5.7 \pm 0.3\text{s}, n=7$; 100 ppm: $5.9 \pm 0.3\text{s}, n=8$, mean \pm SEM).

There is no significant effect of treatment in the inter-trial crossing during habituation [$H(2,45) = 0.80, \text{NS}$]; overall median (25th, 75th): 4 (1, 8) crossings] and trials in test session [$H(2,45) = 0.84, \text{NS}$]; overall median (25th, 75th): 46 (32, 52)]. (Fig. 2)

3.4 Discussion

The main findings of the present study are the impairment on the open-field habituation and two-way active avoidance response induced by higher sodium fluoride intake by adult rats. These results were in accordance with animal data that showed an impairment of inhibitory avoidance task in young rats (Wang et al., 2004) and clinical case reports that suggest memory impairment in fluoride intoxication (Spittle, 1994). However, Wang et al. (2004) employed a high sodium fluoride concentration (100 mg/L)

in young animals, which also showed a decrease in body weight like other previous studies that showed some behavior changes in fluoride treated animals (Ekambaram and Paul, 2001, 2003; Paul et al., 1998). These high NaF doses were also associated with reduction in fluid and water consumption, leading to body weight reduction that can account to the behavioral impairments seen in these studies (Ross and Daston, 1995). Thus, these behavioral changes may not be necessarily considered as a specific and direct effect of fluoride. On the other hand, in the present study, no effect on consumption or body weight gain was seen, a result similar to Collins et al. (1995), which suggests that the mild fluorosis degree seen in the higher fluoride groups did not impair the ability of animals to consume food or water. Thus, reduction of food/ water consumption or body weight gain did not contribute for the memory impairment found here. Taken together, these results suggest that fluoride intoxication may induce memory impairment.

Fluoride can induce a decrease in polyphosphoinositide synthesis and the release of inositol phosphate in brain membrane, which may contribute to memory impairment (Sarri and Claro, 1999). Fluoride (30 or 100 ppm NaF) also reduced some subunits of nicotinic receptors (e.g. $\alpha 4$ and $\alpha 7$) in brain, which may lead to impairment of cholinergic neurotransmission thus causing memory impairment (Long et al., 2002). Moreover, Kay et al. (1986) found that fluoride accelerated the rate of inactivation and suppressed the persistent component of the calcium current in hippocampal neurons. In this line, the habituation in the open-field is a non-associative learning task that has been associated to hippocampal activity and cholinergic neurotransmission (Izquierdo et al., 1992; Leussis and Bolivar, 2006). However, contradictory to this hypothesis, Mullenix

et al. (1995) did not find any significant increase in fluoride level in hippocampus in male rats treated with sodium fluoride 100 ppm (although they found an increase with NaF 125 ppm).

Since the two-way active avoidance task involves a delivery of painful stimulus (footshock) and a locomotor response, it is important to consider the role of change in pain threshold and motor impairment in this task. In a previous study, using the tail immersion test and von Frey hair test, Balayssac et al. (2002) did not observe any increase in pain threshold with fluoride administration; in fact, they found a tendency to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Concerning locomotor activity, there were no differences among groups in the first exposure to the open field. Moreover, in the present study, no significant difference was found among treatments in the inter-trial crossings and escape latencies after the shock delivery. Thus, the fluoride-induced decrease frequency of avoidance behavior in the two-way active avoidance task found in the present study was not probably due to change in pain or locomotor activity, but, more probably, to a learning and memory impairment. This memory task depends on the integrity of some components of the basal ganglia, such as the dorsal striatum (El Massioui et al., 1997; Kirkby and Polgar, 1974), and the substantia nigra pars compacta (Da Cunha et al., 2001). It is a kind of associative learning in which stimulus (sound cue) is associated with a motor response (running to avoid the footshock) in an automated way that became a habit. Interestingly, some studies suggest that this is independent of the hippocampus (Torras-Garcia et al., 2003). In this sense, the present study suggests that both spatial, hippocampal dependent, and habit, basal ganglia dependent, learning and memory processes are affected by chronic fluoride intake.

An important data that was missing in several of the previous studies is the actual fluoride dose administered in each animal. In the present study, the dose of fluoride administered was approximately 2 mgF/kg (50 ppm group) and 5 mgF/kg (100 ppm group). Another important issue is the presence of fluoride in the central nervous system; although the blood-brain barrier has been considered relatively impermeable to fluoride at acute administration (Whitford, 1990), this anion has been found in brain of experimental animals (Mullenix et al., 1995) and spinal fluid of patients (Spittle, 1994; Yu-Huan and Si-Shung, 1988;) chronically exposed to it.

High ingestion of fluoride during tooth formation results in mineralization defect of the enamel, a condition known as enamel fluorosis, (DenBesten and Thariani, 1992) which was the first visible sign of chronic fluoride intoxication (Browne et al., 2005). In the present study the incisors of the two higher sodium fluoride concentration rats became slightly whitened only, which suggests a mild degree of fluorosis.

In summary, rats exposed to high concentration of sodium fluoride in drinking water showed impairment in habituation and active avoidance, which indicates a potential memory impairment of fluoride intoxication. Future clinical well designed studies must be carried out to corroborate it.

Acknowledgements: the authors thank Cláudia M Saito, Phablo L. Milani, and Camila Prevedello who carried some pilot studies about this subject.

3.5 References

Balayssac D, Richard D, Authier N, Nicolay A, Jourdan D, Eschalier A, et al. Absence of painful neuropathy after chronic oral fluoride intake in Sprague-Dawley and Lou/C rats. *Neurosci Lett* 2002; 327:169-72.

Boulton IC, Cooke JA, Johnson MS. Fluoride accumulation and toxicity in laboratory populations of wild small mammals and white mice. *J Appl Toxicol* 1995; 15:423-31.

Browne D, Whelton H, O'Mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent* 2005; 33:177–86.

Buzalaf MA, de Almeida BS, Cardoso VE, Ollympio KP, Furlani T de A. Total and acid soluble fluoride content of infant cereals, beverages and biscuits from Brazil. *Food Addit Contam* 2004; 21:210-5.

Collins TFX, Sprado RL, Shackelford ME, Black TN, Ames MJ, Welsh JJ, et al. Developmental toxicity of sodium fluoride in rats. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:951-60.

Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, et al. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001; 124:9–18.

DenBesten PK, Thariani H. Biological Mechanisms of Fluorosis and Level and Timing of Systemic Exposure to Fluoride with Respect to Fluorosis. *J Dent Res* 1992; 71:1238-43.

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

Ekambaram P, Paul V. Effect of vitamin D on chronic behavioral and dental toxicities of sodium fluoride in rats. *Fluoride* 2003; 36:189-97.

El Massioui N, Racht Delatour BV. Contrasting effects of central nucleus of the amygdala and dorsal striatum lesions on active avoidance learning and its contextual modification. *Neurosci Res Comm* 1997; 21:103–11.

Izquierdo I, DaCunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH. neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 1992; 58: 16-26.

Kay AR, Miles R, Wong RK. Intracellular fluoride alters the kinetic properties of calcium currents facilitating the investigation of synaptic events in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1986; 6:2915-20.

Kelly AE. Locomotor activity and exploration. In: Sahgal A, editor. Behavioural Neuroscience vol II: a Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 1-21.

Kirkby RJ, Polgar S. Active avoidance in laboratory rat following lesions of dorsal or ventral caudate-nucleus. *Physiol Psychol* 1974; 2:301-6.

Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev* 2006; 30:1045-64.

Long YG, Wang YN, Chen J, Jiang SF, Nordberg A, Guana ZZ. Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24:751–757.

Lu Y, Sun ZR, Wu LN, Wang X, Lu W, Liu SS. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride* 2000; 33:74-8.

Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Goncalves CA, Quillfeldt JA. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav* 2000; 71:29-33.

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

Paul V, Ekambaram P, Jayakumar AR. Effects of sodium fluoride on locomotor behavior and a few biochemical parameters in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998; 6:187-91.

Pollick HF. Concerns about water fluoridation, IQ, and osteosarcoma lack credible evidence. *Int J Occup Environ Health* 2006; 12:91-4.

Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH, Da Cunha C. The 'anxiety state' and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 72:78–94.

Ross JF, Daston GP. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1995; 17:685-8.

Sarri E, Claro E. Fluoride-induced depletion of polyphosphoinositides in rat brain cortical slices: a rationale for the inhibitory effects on phospholipase C. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17:357-67.

Spittle B. Psychopharmacology of fluoride: a review. *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9 :79-82.

Torras-Garcia M, Costa-Miserachs D, Morgado-Bernal I, Portell-Cortés I. Improvement of shuttle-box performance by anterodorsal medial septal lesions in rats. *Behav Brain Res* 2003; 141:147-58.

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

Xiang Q, Liang Y, Chen L, Wang C, Chen B, Chen X, et al. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride* 2003; 36:84-94.

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* 2004; 37:201-8

Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res* 1990; 69:539-49.

Yu-Huan H & Si-Shung W. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1988; 51:1591-3.

Table 1

Mean daily fluid, food and sodium fluoride consumption, body weight gain and degree of dental fluorosis (incisors teeth) of rats in rats treated with 1.5, 50 or 100 ppm of sodium fluoride.

Groups	Daily fluid consumption (ml)	Daily food consumption (g)	Daily Fluoride intake (mg/Kg)	Body weight gain (g)	Degree of dental fluorosis	
					0	1
1.5 ppm	39.94 ± 1.75	24.73 ± 0.46	0.04 ± 0.002	57.67 ± 5.93	15	3
50 ppm	37.86 ± 0.94	25.37 ± 0.68	2.33 ± 0.06*	60.75 ± 5.89	5*	13*
100 ppm	39.14 ± 1.50	24.25 ± 0.66	4.87 ± 0.17*#	64.05 ± 4.98	3*	15*

Data represents mean ± SEM; n= 15 rats/ group (for dental fluorosis: data represents frequency of 18 rats/ group)

* $p < 0.05$ compared to 1.5 ppm.

$p < 0.05$ compared to 50 ppm

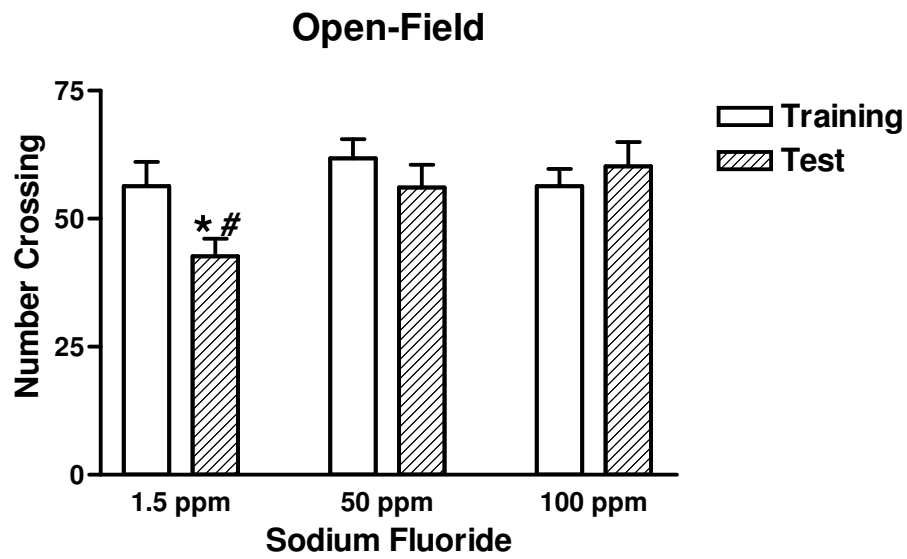
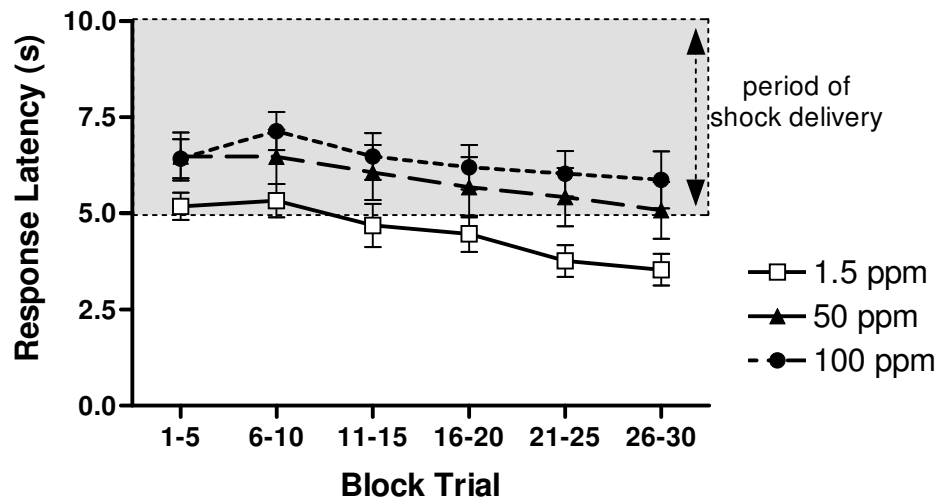


Figure 1- Effect of sodium fluoride (1.5, 50 or 100 ppm) in the number of crossings in the open-field in training and test session (both 2 min duration, 24h apart). Data represent Mean \pm SEM, n= 15 rats/ group

* $p < 0.05$ compared to 1.5 ppm training session

$p < 0.05$ compared to 50 e 100 ppm groups in test session

A



B

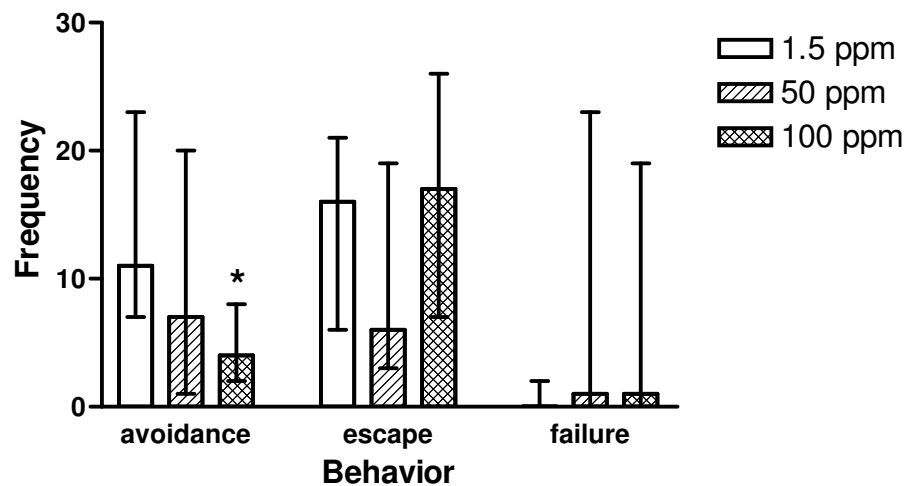


Figure 2 - Effects of sodium fluoride intake (1.5, 50 or 100 ppm on drinking water) for 30 days on two-way active avoidance task. (A) Latency to finish the shock (mean \pm SEM); (B) Number of avoidances, escapes, and failures (median \pm upper and lower quartiles). N= 15/ group.

* $p \leq 0.05$ compared to control (1.5 ppm)

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem mostrar que:

- Fluoreto de sódio foi capaz de prejudicar a habituação de ratos ao campo aberto, indicando possível efeito deletério sobre a memória não associativa.
- Ratos tratados com fluoreto de sódio a 100 ppm apresentaram diminuição estatisticamente significativa no número de esquivas no teste da esquiva ativa de duas vias. Isso indica possível efeito deletério do flúor nos processos de aprendizado e memória associativa.
- O fluoreto de sódio não interferiu na atividade locomotora dos animais, visto que na primeira exposição ao campo aberto os três grupos apresentaram semelhança na locomoção. Na esquiva ativa de duas vias, os animais também apresentaram semelhança no número de cruzamentos interprovas e tempo de latência para fuga do primeiro choque. Não havendo diferença estatística entre os grupos para estes parâmetros.
- O fluoreto de sódio nas concentrações utilizadas não foi capaz de interferir no ganho de peso dos animais ao final de trinta dias de tratamento, sendo que os três grupos apresentaram consumo de água e ração semelhante.
- Fluorose leve foi observada nos animais tratados com 50 e 100 ppm de fluoreto de sódio.

5 REFERÊNCIAS:

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.

BALAYSSAC, D.; RICHARD, D.; AUTHIER, N.; NICOLAY, A.; JOURDAN, D.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F. Absence of painful neuropathy after chronic oral fluoride intake in Sprague-Dawley and Lou/C rats. **Neurosci Lett**, v.327, n.3, p. 169-72, 2002.

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.

BOULTON, I.C.; COOKE, J.A.; JOHNSON, M.S. Fluoride accumulation and toxicity in laboratory populations of wild small mammals and white mice. **J Appl Toxicol**, v.15, n.6, p. 423-31, 1995.

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

BUZALAF, M.A.; DE ALMEIDA, B.S.; CARDOSO, V.E.; OLLYMPIO, K.P.; FURLANI, T. DE A. Total and acid soluble fluoride content of infant cereals, beverages and biscuits from Brazil. **Food Addit Contam**, v.21, n.3, p.210-5, 2004.

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.

CHIOCA, L.R.; RAUPP, I.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Efeitos da administração sub-crônica de flúor na locomoção de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 21., 2006, São Paulo, Brasil. resumo 13.053. Disponível em: <<http://www.fesbe.org.br/fesbenovo/ver-resumo/ver.php?evn=1&rsm=319>> Acesso em: 25 Janeiro 2007.

DA CUNHA, C.; GEVAERD, M.S.; VITAL, M.A.; MIYOSHI, E.; ANDREATINI, R.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behav Brain Res**, v.124, n.1, p.9–18, 2001.

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.1238-43, 1992.

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> Acesso em: 25 janeiro 2006.

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.

EL MASSIOUI, N. ; RACHT DELATOUR, B.V. Contrasting effects of central nucleus of the amygdala and dorsal striatum lesions on active avoidance learning and its contextual modification. **Neurosci Res Comm**, v.21, p.103–11, 1997.

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

IZQUIERDO, I.; DACUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol**, v.58, p.16-26, 1992.

KAY, A.R.; MILES, R.; WONG, R.K. Intracellular fluoride alters the kinetic properties of calcium currents facilitating the investigation of synaptic events in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v.6, n10, p.2915-20, 1986.

KELLY, A.E. Locomotor activity and exploration. In: SAHGAL, A. **Behavioural Neuroscience vol II: a Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 1-21.

KIRKBY, R.J.; POLGAR, S. Active avoidance in laboratory rat following lesions of dorsal or ventral caudate-nucleus. **Physiol Psychol**, v.2, p.301-6, 1974.

KUBOTA, K.; LEE, D.H.; TSUCHIYA, M.; YOUNG, C.S.; EVERETT, E.T.; MARTINEZ-MIER, E.A.; SNEAD, M.L.; NGUYEN, L.; URANO, F.; BARTLETT J.D. Fluoride Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Ameloblasts Responsible for Dental Enamel Formation. **J Biol Chem**, Vol. 280, N.24, p. 23194–202, 2005.

LEUSSIS, M.P.; BOLIVAR, V.J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neurosci Biobehav Rev**, v.30, n.7, p.1045-64, 2006.

LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. **Rev Saude Publ**, v.35, n.6, p.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.

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.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, Representação Sanitária e Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). Disponível em: <<http://www.opas.org.br.2001>> Acesso em: 28 janeiro 2006

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.

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.

POLLICK, H.F. Concerns about water fluoridation, IQ, and osteosarcoma lack credible evidence. **Int J Occup Environ Health**, v12, n.1, p.91-4, 2006.

RIBEIRO, R.L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; DA CUNHA, C. The 'anxiety state' and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiol Learn Mem**, v.72, n.2, p.78–94, 1999

ROSS, J.F.; DASTON, G.P. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. **Neurotoxicol Teratol**, v.17, n.6, p.685-8, 1995. To the editor

SARRI, E.; CLARO, E. Fluoride-induced depletion of polyphosphoinositides in rat brain cortical slices: a rationale for the inhibitory effects on phospholipase C. **Int. J. Devl Neuroscience**, v.17, n.4, p.357-67, 1999.

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.; MUDDANNA RAO, S.; HANUMANTH RAO, S. Histological changes in the brain of young fluoride-intoxicated rats. **Fluoride**, v.35, n.1, p.12-21, 2002. a

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.

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.

TORRAS-GARCIA, M.; COSTA-MISERACHS, D.; MORGADO-BERNAL, I.; PORTELL-CORTÉS, I. Improvement of shuttle-box performance by anterodorsal medial septal lesions in rats. **Behav Brain Res**, v.141, p.147-58, 2003.

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.

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.; BIRDSONG-WHITFORD, N.L.; FINIDORI, C. Acute oral toxicity of sodium fluoride and monofluorophosphate separately or in combination in rats. **Caries Res**, v.24, n.2, p.121-6, 1990.

WHITFORD, G.M. Acute and chronic fluoride toxicity. **J Dent Res**, v.71, n.5, p.1249-54, 1992.

YU-HUAN, H.; SI-SHUNG, W. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. **J Neurol Neurosurg Psychiat**, v.51, p.1591-3, 1988.

ANEXO 1

A) Alterações observadas em animais tratados cronicamente com Fluoreto de sódio, como diminuição da atividade da acetilcolinesterase cerebral e da colinesterase plasmática, redução das subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 7$ de receptores nicotínicos cerebrais e redução no número das células de Purkinje.

	AchE cerebral	ChE plasmática	Receptores nicotínicos	Células de Purkinje
Paul et al. 1998 (20 ou 40 mgF/Kg)	=	↓		
Ekambaram; Paul, 2001 (500 ppm NaF)	↓	↓		
Ekambaram; Paul, 2003 (500 ppm NaF)		↓		
Long et al. 2002 (100 ppm NaF)			↓	
Trabelsi et al. 2001 (500 ppm NaF)				↓

B) Alterações comportamentais observadas em animais tratados cronicamente com Fluoreto de sódio, como redução da atividade locomotora, prejuízo na cordenação motora, prejuízo na esquiva inibitória e prejuízo no ganho de peso dos animias.

	Atividade Locomotora	Rota-Rod	Esquiva Inibitória	Ganho de peso
Paul et al. 1998 (20 ou 40 mg F/kg)	↓	=		↓
Ekambaram; Paul, 2001 (500 ppm NaF)	↓	↓		↓
Ekambaram; Paul, 2003 (500 ppm NaF)	↓	↓		↓
Wang et al. 2004 (100 ppm NaF)			↓	↓