



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A
100 PPM DE ÁCIDO FLUORSILÍCICO E 30 PPM
DE CHUMBO NAS CONCENTRAÇÕES DE
FLÚOR E CHUMBO NO OSSO, DENTINA,
ESMALTE E SANGUE DE RATOS DE 81 DIAS
EXPOSTOS DESDE O PERÍODO PRÉ-NATAL**

ROSÂNGELA MORAIS MARQUES SAWAN

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROSÂNGELA MORAIS MARQUES SAWAN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A
100 PPM DE ÁCIDO FLUORSILÍCICO E 30 PPM
DE CHUMBO NAS CONCENTRAÇÕES DE
FLÚOR E CHUMBO NO OSSO, DENTINA,
ESMALTE E SANGUE DE RATOS DE 81 DIAS
EXPOSTOS DESDE O PERÍODO PRÉ-NATAL**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto

2009

Sawan, Rosangela Morais Marques

Efeitos da exposição concomitante a 100 ppm de ácido fluossilícico e 30 ppm de chumbo nas concentrações de flúor e chumbo no osso, dentina, esmalte e sangue de ratos de 81 dias expostos desde o período pré-natal. Ribeirão Preto, 2009.

88f.: il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/SP. Programa: Odontopediatria.

Orientadora: Gerlach, Raquel Fernanda.

1. Flúor. 2. Chumbo. 3. Sangue total. 4. Osso. 5. Dentina. 6. Esmalte. 7. Água fluoretada. 8. Ácido fluossilícico. 9. Toxicidade. 10. Contaminação ambiental.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SAWAN, RMM. **Efeitos da exposição concomitante a 100 ppm de ácido fluorsilícico e 30 ppm de chumbo nas concentrações de flúor e chumbo no osso, dentina, esmalte e sangue de ratos de 81 dias expostos desde o período pré-natal** [Dissertação de Mestrado] Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

Data da defesa: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dra. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Deus...

*Não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos...*

Tudo posso, naquele que me fortalece.

(Filipenses 4,13)

DEDICATÓRIA

*Ao meu grande amor **Maurício**, com toda admiração e orgulho que sinto por ser sua esposa. Sem você nada teria sido possível. Seu incentivo me fez acreditar que era capaz. Você que abdicou dos seus objetivos em favor dos meus. Foi companheiro, cúmplice e incentivador incansável, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. Tantas vezes meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por você, numa união que sempre me incentivava a prosseguir. Para juntos termos as mesmas prioridades e os mesmos sonhos. Obrigada por cuidar tão bem de mim e de nosso filho. A você dedico esta vitória que conquistamos juntos. Te Amo Muito.*

*Ser profundamente amado por alguém dá-nos força.
Amar alguém profundamente dá-nos coragem.*

*Ao meu lindo e amado filho **Michel**, por ter sido tão compreensivo nas inúmeras horas que estive ausente para que fosse possível a realização dessa pesquisa, e ao voltar para casa, tudo ficava bem com seu abraço. Me orgulho muito por ter um filho tão maravilhoso como você. Melhor presente de Deus. Obrigado pelo seu carinho e amor. Um dia você vai entender que tudo o que realizo é no intuito de ser para você um exemplo. Dedico a você, não só esse trabalho, mas a minha vida e todo meu amor...*

Ser mãe é uma relação única e eterna de amor, sentido de existir, dedicação sem limites, motivos para sorrir, felicidade de viver. Grata razão de agradecer..."

*Aos meus pais **Iraci e Nelson**, por serem meu exemplo de amor, respeito, confiança, honestidade... Mamãe e papai, vocês que sempre acreditaram em meu ideal. Me passaram valores de determinação, coragem e capacidade me fazendo acreditar que com fé e com minha família sempre poderei vencer qualquer obstáculo que aparecer em minha vida. Vocês, que muitas vezes sacrificaram seus próprios sonhos em favor dos meus. Agradeço a Deus por ter tido o privilégio de ter pais maravilhosos como vocês. Está vitória é de vocês!!! Por terem me dado todo o alicerce necessário!!! Meu grande amor e minha eterna gratidão.*

A família é o melhor laboratório para uma maravilhosa experiência de amor.

*Aos meus irmãos **Robson e Rosimara**, meus cunhados **Rejane e João Márcio** e meus sobrinhos **Murilo e Luíza**, pela amizade e incentivo durante toda a minha vida. Pelo brilho único que há no olhar de vocês em cada vitória que conquisto, pela torcida, pela ajuda e pelo ombro que sempre dedicaram a mim. Pelo amor que nos mantêm unidos em todos os momentos de nossas vidas. Por estarem sempre ao meu lado, tornando tudo mais fácil. Sinto muito orgulho pelas pessoas que se tornaram. Meu muito Obrigada!!! Vocês foram fundamentais para realização desse trabalho.*

Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha.

*Ao meu sogro e todos da família "**Sawan**", que são a extensão da minha família e sempre me receberam como uma filha. Pelo carinho, incentivo e por saber que sempre posso contar com vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Profa Dra **Raquel Fernanda Gerlach**, pesquisadora incansável, exemplo de profissionalismo, inteligência, competência e determinação. Por ter sido minha orientadora e me recebido tão bem em seu laboratório, pelos ensinamentos e pela confiança que depositou em mim, e por me permitir conviver com pessoas tão capacitadas. Todo o meu respeito e a minha gratidão.

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém, e reconhecer que o homem jamais poderá lograr de si o dom de ser auto-suficiente.

A amiga **Giselle de Ângelo Souza Leite**, minha querida Gi, por ter sido verdadeiro pilar de sustentação na realização desse trabalho, abraçando minha causa como se fosse sua, pela segurança que sempre transmitiu com sua presença, seu carinho, apoio, companheirismo e desprendimento. Pelos momentos de descontração que tornaram os dias mais fáceis e alegres. Você é uma pessoa iluminada e fez toda diferença!!! Obrigada por tudo.

Afeto e reciprocidade são particularidades que vivem no coração de cada um. Mais importante que a forma de expressar os sentimentos bons, é a grandeza que existe num ato de amizade. E neste ato, certamente sempre existirão três quesitos básicos: respeito, confiança e admiração.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Pessoa)

*A família " **Moreno e Barbieri** , por serem nossa família adotiva, com quem sempre podemos contar. Não há como agradecer-los por tudo que fazem por nós.*

Aos meus avós, tios, primos, cunhados, sobrinhos, enfim toda minha imensa família, por estarem sempre ao meu lado e pela constante torcida pelo meu sucesso.

*A grande amiga **Marta Contente**, minha querida Martinha, não tenho palavras para agradecer tudo o que sempre fez por mim. Seu carinho, ternura, incentivo para que eu fizesse o mestrado, por estar sempre por perto em todos os momentos, enfim por ter sido uma companheira singular nessa jornada. Minha gratidão.*

*A querida amiga **Carolina Paes Torres**, pela bondade, por tudo que aprendi com você, pelo apoio e por sempre torcer por mim, pelas demonstrações de confiança, mas principalmente pela dedicação.*

*A querida amiga **Gisele Faria**, pelo carinho, pela atenção, por todos os conselhos e ensinamentos e por me fazer acreditar que era capaz.*

*A querida amiga **Fátima Rizóli** por nos contagiar com sua alegria de viver, pela sua disponibilidade e gentileza em todos os momentos.*

*A querida amiga **Jaciara Gomes da Silva** , pela amizade, incentivo, sempre prestativa e por me mostrar um jeito simples, leve e descomplicado de viver.*

À Profª Drª **Maria Cristina Borsatto**, por me acolher na clínica de *Pacientes Especiais*, permitindo a realização de um sonho. Por ser exemplo de caráter e determinação em quem sempre me espelhei. Sua alegria, seu carisma e a forma como vê a vida, faz de você uma pessoa singular. Continue sempre iluminando a todos com seu brilho. Muito obrigada pelos ensinamentos, respeito, incentivo e confiança a mim dedicados durante todo esse tempo.

Ao Prof. Dr. **Paulo Nelson Filho**, por todos os conhecimentos transmitidos em suas aulas, pelo seu grande profissionalismo e inteligência. Pela incentivo e confiança que sempre demonstrou por mim, o que funcionou como estímulo nos momentos difíceis. Obrigada por suas orientações e pelo inestimável auxílio durante todo desenvolvimento deste trabalho.

À Profª Drª **Léa Assed Bezerra da Silva** pela sua determinação, competência e empenho, em manter um curso de pós graduação em tão alto nível, composto por docentes de tamanha competência e capacidade de ensinar.

À Profª Drª **Aldevina Campos de Freitas**, foi uma honra poder ser sua aluna e aprender com seu dinamismo , disposição para o trabalho e respeito com que ensina cada aluno e com que atende cada criança.

À Profª Drª **Sada Assed**, pelo profissionalismo, competência, dedicação e realizações.

À Profª Drª **Kranya Victoria Diaz-Serrano** pela confiança, amizade, determinação e idealismo. Por compartilhar comigo seu saber e experiência.

À Profª Drª **Alexandra Mussolino de Queiroz** pelas sugestões, pelos ensinamentos, por sua dedicação , incentivo e apoio.

À Profª Drª **Raquel Assed Bezerra da Silva** pela sua maneira carinhosa e prestativa com que sempre me recebeu , pelo apoio e amizade.

À Profª Drª **Maria da Conceição Pereira Saraiva** por suas idéias, pela sua atenção e pela sua colaboração.

Ao Prof. **Daniel Silva**, pela consideração, disponibilidade, gentileza em todos os momentos, pela demonstração de afeto e amizade.

*Ao Prof. Dr. **Jaime Cury** do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, pela criteriosa análise de Flúor, pela disponibilidade e sugestões.*

*Ao Prof. Dr. **Fernando Barbosa Junior** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, e seus alunos pelo auxílio nas dosagens de chumbo.*

*Ao Prof. Dr. **Frederico Barbosa de Sousa** do Departamento de Morfologia da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, pela disponibilidade e ensinamentos na análise de flúor.*

*À Profª Drª **Cristie Leite** do Departamento de Morfologia Estomatologia e Fisiologia pela sua competência, pelo auxílio, e pela atenção com que sempre nos recebeu em seu laboratório.*

***Aos Colegas de Mestrado em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Ana Paula Bernardes, Cristina Bueno Brandão, Edécio Garcia Júnior, Giselle de Ângelo Souza Leite, Lourdes Garcia Olmedo, Marcela Perdiza, Marcelo Remberto Argandoña, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Olívia Santos de Oliveira Verardo, Rodrigo Machado da Silva, Taiana de Melo Dias, Vanessa Maldonado Bernardini**, por termos compartilhado de tantos ensinamentos, pela amizade e pelas boas lembranças que levarei de cada um de vocês. Muito sucesso a todos!!!*

*Aos amigos do laboratório: **Andréa Marcaccini, Glauce Almeida, Carolina Guerra, Éllen Rizzi, Micheli Castro, Isabel Porto, Regina Saiani, Andrezza Rodrigues, César Neschiani, Anna Laura Jacob, Carla Speroni, Raquel Carros, Soraia Dib Gonçalves**, e todos os alunos do laboratório, com vocês convivi diariamente durante todo o mestrado, o que os tornou grandes companheiros, incentivadores, amigos e torcedores.*

*Aos funcionários do Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto– USP, e todos os seus funcionários: **Benedita Viana Rodrigues, Fátima Aparecida Rizóli, Renata Aparecida Fernandes Rodrigues**,*

***Nadir das Dores Gardin** , pelo carinho, atenção e amizade que sempre dedicaram a mim e a todos os pacientes. Onde tudo começou...Onde tentei deixar um pouco de mim, mas acabei trazendo muito de cada um de vocês.*

*As funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP; **Izabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto**, pela disponibilidade, atenção, carinho e amizade.*

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

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

*Aos Bioteristas: **Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Antônio Massaro, Fábio Marcelo Corrêa**, pelo fundamental auxílio, atenção e colaboração durante todo tratamento dos ratinhos.*

*Ao fotógrafo **Hermano Teixeira Machado** pela prontidão com que sempre me recebeu, pelas orientações e amizade.*

*.A **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo e auxílio nessa pesquisa.*

A todos que, de algum modo, contribuíram na elaboração deste trabalho.

A Persistência é o Caminho do Êxito

O ato de persistir é uma das condições da vitória. Muitas vezes a vida mede nossa fé opondo-nos a resistência. Os obstáculos fazem parte da nossa caminhada e render-se a eles demonstra fraqueza.

Não há na história da humanidade, um grande homem sequer que não tenha tido uma fé inquebrantável. Somente por meio da persistência e do bom ânimo conseguimos tornar realidade nossos mais ousados sonhos.

Quando se tem certeza interior de que estamos no caminho certo, nada, nem ninguém, pode ser mais fortes que nós mesmos. Possuímos uma força poderosa, capaz de perseverar e conseguir tudo, bastando acreditar firmemente que, mesmo difícil, jamais será impossível. Porque o impossível é o possível que nunca foi tentado.

Chega, quem caminha. Então caminhe com determinação, jamais duvidando de sua capacidade de vencer. Você pode, se acreditar que pode. Todos nós, quando bem intencionados, somos merecedores de uma vida nova. E para tanto, necessário se faz, uma ação contínua e persistente no sentido de tornar nossa vida mais próspera e feliz.

Sem esforço, não existe vitória.

Persista, hoje e sempre.

Persista, mais e muito.

E lembre-se: um mundo melhor começa em você.

(Charles Chaplin)

Sawan, RMM. **Efeitos da exposição concomitante a 100 ppm de ácido fluorsilícico e 30 ppm de chumbo nas concentrações de flúor e chumbo no osso, dentina, esmalte e sangue de ratos de 81 dias expostos desde o período pré-natal.** [dissertação] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; 2009.

RESUMO

A exposição a baixos níveis de chumbo é associada a desordens cognitivas e neurológicas em crianças. Foi descrito um aumento dos níveis de chumbo no sangue de crianças que vivem em comunidades que recebem água fluoretada. Este estudo testou se flúor a 100 ppm na forma de ácido fluorsilícico na água induziria aumento na concentração de chumbo no sangue e tecidos calcificados de ratos Wistar expostos a baixos níveis de chumbo desde a idade gestacional. Ratas foram separadas em quatro grupos: controle e grupos que receberam água que continham 100 mg/L de fluoreto (F), 30 mg/L de chumbo (Pb), ou 100 mg/L de F e 30 mg/L de Pb (F+Pb), desde uma semana antes do acasalamento até que os filhotes completassem 81 dias. Todos os animais foram pesados ao longo do experimento. Sangue e tecidos calcificados foram coletados com 81 dias para análise de chumbo, flúor e fósforo em esmalte, dentina, osso total, osso superficial e sangue. Chumbo foi determinado por ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Flúor foi medido através de eletrodo íon-específico e fósforo foi determinado por reação colorimétrica. As concentrações de chumbo triplicaram no grupo F+Pb ($76.7 \pm 11.0 \mu\text{g/dL}$) em comparação ao grupo Pb ($22.6 \pm 8.5 \mu\text{g/dL}$) ($p < 0.001$), com a mesma tendência observada em todos os tecidos calcificados analisados ($p < 0.001$ para todas as comparações). No esmalte, as concentrações de chumbo analisadas foram 2.5 vezes mais altas no grupo F+Pb em comparação ao grupo Pb ($4,369 \pm 1,353 \mu\text{g/g}$ *versus* $1,768 \pm 1,892 \mu\text{g/g}$). Na dentina, a concentração de chumbo encontrada no grupo F+Pb era $8.5 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ *versus* $4.9 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ no grupo Pb. Na superfície óssea, a concentração de chumbo encontrada no grupo F+Pb era 3.1 vezes maior do que as determinadas no grupo

Pb, com 28.0 ± 10.6 e 9.0 ± 3.7 $\mu\text{g/g}$ nos grupos F+Pb e Pb, respectivamente. No osso total, os valores de chumbo dobraram no grupo F+Pb (14.2 ± 2.6 $\mu\text{g/g}$) em comparação com o grupo Pb (6.8 ± 1.7 $\mu\text{g/g}$). Os valores de chumbo estavam abaixo do limite de detecção na maioria das amostras dos grupos Controle e F. As concentrações de flúor aumentaram em ambos os grupos expostos a flúor (F e F+Pb), com diferenças estatisticamente significantes dos grupos controle e Pb, mas nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de F entre os grupos F e F+Pb em quaisquer dos tecidos calcificados testados. Em conclusão, este estudo mostra um aumento nas concentrações de chumbo no sangue total, esmalte, dentina, superfície óssea e osso total em ratas com 81 dias expostas ao flúor e chumbo desde o período pré-natal.

Palavras-chave: Flúor. Chumbo. Sangue total. Osso. Dentina. Esmalte. Água fluoretada. Ácido fluorsilícico. Toxicidade. Contaminação ambiental.

Sawan, RMM. **Effects of the concomitant exposure to fluosilicic acid and lead in the in bone, dentine, enamel and blood lead and fluoride concentrations of 81-days-old rats exposed to lead and fluoride since gestational age.** [dissertation] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2009.

ABSTRACT

Low-level lead exposure is linked to cognitive and neurological disorders in children. An increased risk for higher blood lead levels was described for children living in communities that receive fluoridated-water. This study tested whether water fluoride would induce increases in the blood and calcified tissue lead concentrations in Wistar rats exposed to low lead levels since gestational age. Female rats were allocated in four groups: control, and 3 groups that received water containing 100 mg/L of fluoride (F), 30 mg/L of lead (Pb), or 100 mg/L of F and 30 mg/L of Pb (F+Pb). Females mated and delivered their pups receiving the same water treatment. Female pups were maintained on the same water regimen until day 81. Lead was determined by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), and fluoride was measured by ion-specific electrode in the whole blood, superficial enamel, dentine, surface bone, and whole bone. Mean whole blood lead concentrations triplicated in the F+Pb group ($76.7 \pm 11.0 \mu\text{g/dL}$) in comparison to the Pb group ($22.6 \pm 8.5 \mu\text{g/dL}$) ($p < 0.001$), with the same trend observed in all calcified tissues analyzed ($p < 0.001$ for all comparisons). In the enamel, mean lead concentrations were 2.5 times higher in the F+Pb group compared with the Pb group ($4,369 \pm 1,353 \mu\text{g/g}$ versus $1,768 \pm 1,892 \mu\text{g/g}$). In dentine, mean lead concentration found in F+Pb group was $8.5 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ versus $4.9 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ in the Pb group. In the bone surface, the mean lead concentration found in the F+Pb group was 3.1 times that determined in the Pb animals, with 28.0 ± 10.6 and $9.0 \pm 3.7 \mu\text{g/g}$ in the F+Pb and Pb groups, respectively. In whole bone, mean lead values doubled in the F+Pb group ($14.2 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$) in comparison with the Pb group ($6.8 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$). Lead values were

below detection limit in most Control and F group samples. Fluoride concentrations were increased in both groups exposed to fluoride (F and F+Pb), with statistically significant differences from the control and Pb groups, but no differences in the F concentrations were found between the F and F+Pb group in any of the calcified tissues tested. In conclusion, this study shows a fluoride-induced increase in the concentrations of lead of whole blood, enamel, dentine, surface bone and whole bone of 81-day female rats exposed to lead since gestational age, suggesting that a biological effect not recognized so far may underlie the epidemiological association between increased blood lead levels in children living in water-fluoridated communities.

Keywords: Fluoride. Lead. Whole blood lead. Bone. Dentine. Enamel. Fluoride treated water. Fluosilicic acid. Lead toxicity. Environmental contamination.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Protocolo operacional padrão para a dosagem de fósforo.....	53
Figura 1. Concentração de chumbo no sangue ($\mu\text{g/dL}$).....	57
Figura 2. Concentração de chumbo no esmalte superficial ($\mu\text{g/dL}$).....	58
Figura 3. Concentração de chumbo na dentina ($\mu\text{g/dL}$).....	59
Figura 4. Concentração de chumbo na biópsia de osso ($\mu\text{g/dL}$).....	60
Figura 5. Concentração de chumbo no osso total ($\mu\text{g/dL}$).....	61
Figura 6. Concentração de flúor ($\mu\text{g/dL}$).nos tecidos calcificados.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/dL}$: micrograma por decilitro

$\mu\text{g/g}$: micrograma por grama

$\mu\text{g/mL}$: micrograma por mililitro

μL : microlitro

g/L : grama por litro

mg/L : miligramama por litro

nm : nanometro

v/v : volume/volume

vs. : versus

p/v : peso/volume

p/p : peso/peso

F : flúor

Pb : Chumbo

F+Pb : Flúor + chumbo

HNO_3 : ácido nítrico.

$\text{FSA (H}_2\text{SiF}_6\text{)}$: ácido fluorsilísico

SiF : silicato de flúor

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

TISAB : Total Ionic Strength Adjustment Buffer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 CHUMBO.....	21
1.1.1 Toxicocinética do Chumbo.....	27
1.1.2 Toxicidade do Chumbo.....	29
1.1.3 Biomarcadores de dose interna.....	31
1.1.4 Os efeitos do chumbo na saúde humana.....	34
1.2 FLÚOR.....	37
1.2.1 Cinética do Flúor.....	40
1.2.2 Toxicidade do Flúor.....	41
1.3 A CO-EXPOSIÇÃO AO FLÚOR E AO CHUMBO.....	43
2. PROPOSIÇÃO.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 ANIMAIS.....	49
3.2 MEDIDAS PRÉ-ANALÍTICAS.....	50
3.3 AMOSTRAS DE OSSO TOTAL E OSSO SUPERFICIAL.....	50
3.4 AMOSTRAS DE DENTE.....	51
3.5 AMOSTRAS DE SANGUE.....	52
3.6 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO.....	52
3.7 DETERMINAÇÃO DE CHUMBO.....	54

3.8 DETERMINAÇÃO DE FLÚOR.....	54
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1 CONCENTRAÇÕES DE CHUMBO.....	57
4.2 CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	74
8. ANEXOS.....	88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

O chumbo (Pb) é um elemento de baixa ocorrência natural, mas amplamente utilizado há milhares de anos. Atualmente, é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição. Assim, todos os seres humanos têm chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas (Saryan e Zenz, 1994). No entanto, este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo e seus efeitos tóxicos sobre os homens e animais já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano (Xie *et al.*, 1998).

O chumbo é um metal sem gosto ou cheiro característico e maleável. Somente em quantidades mínimas é possível encontrá-lo em seu estado natural, ou seja, puro. Quando aquecido acima de 550-560°C emite vapores muito tóxicos, que em contato com o ar se transformam em óxido de chumbo. Os minerais mais comuns são: a galena, que é o sulfeto de chumbo, de cor cinza e brilho metálico; a cerusita, que é o carbonato de chumbo branco, amarelado ou cinzento; e a anglesita, que é o sulfeto de chumbo transparente (Warren, 2000).

É um dos metais mais antigos usados pelo homem e muitas das primitivas aplicações têm persistido através dos séculos. Era conhecido pelos antigos egípcios, que já o utilizavam a mais de oito mil anos. Os jardins suspensos da Babilônia eram assoalhados com folhas de chumbo soldadas e as pedras das

pontes eram ligadas por ganchos de ferro soldados com chumbo. Devido ao seu baixo ponto de fusão, durabilidade e facilidade em formar ligas metálicas era utilizado na fabricação de armas, adornos e utensílios (Mellor, 1967).

Há uma longa história sobre a intoxicação pelo chumbo nos alimentos e bebidas. No Império Romano era comum devido, ao fato, dos canos serem feitos com esse metal, assim como os vasos de cerâmica pintados com tinta que continham chumbo onde se armazenavam os vinhos e alimentos (Counter *et al.*, 2005). Seu sal orgânico, acetato de chumbo, conhecido como “açúcar de chumbo” era usado como adoçante em vinhos e considerado por alguns como causa da demência que afetou muitos dos imperadores romanos (Warren, 2000). Gilfillan em 1965 foi o principal promotor da idéia de que a decadência do Império Romano ocorreu, dentre outros fatores, devido ao elevado grau de intoxicação por chumbo de seus estadistas. As afirmações de Gilfillan, de que os romanos foram gravemente intoxicados por ingerir quantidades excessivas de chumbo, foram baseadas em medidas do metal em amostras de ossos romanos. Suas alegações foram sustentadas por outros autores, que também estudaram chumbo em amostras similares (Waldron e Wells, 1979). Hipócrates, em 500 a.C. descreveu intoxicações agudas por chumbo como cólicas abdominais severas em mineradores que extraíam a galena de minas.

Os gregos e romanos associavam tal metal com Cronus/Saturno. Ainda hoje, alguns cientistas e médicos se referem ao chumbo e seus compostos como

Saturno ou extraídos de Saturno e a sua contaminação como saturnismo (Warren, 2000).

Documentos chineses do século IV a.C. possuíam nomes de vários cosméticos que continham chumbo misturado ao pó de arroz, que causaram a morte de milhares de crianças chinesas e japonesas por terem se intoxicado pela ingestão de pó de chumbo branco a partir do contato com a face e peitos das mães que pintavam seus rostos e corpos com esses cosméticos (Nriagu, 1983). Pintores de obra de arte podem ter sido vítimas da contaminação de chumbo devido ao amplo uso de pigmentos com esse metal através dos séculos (Moffitt, 1988). Cândido Portinari foi vítima de intoxicação por chumbo e faleceu em 1962 em decorrência da plumbemia provocada pela intoxicação das tintas que utilizava (Projeto Portinari, 2009)

No entanto, foi a partir da Revolução Industrial no século XVIII que a utilização do metal atingiu grande escala provocando inúmeros casos de intoxicações ocupacionais e ambientais (Gidlow, 2004).

Excepcional maleabilidade, baixo ponto de fusão, alta resistência à corrosão, alta densidade, alta opacidade aos raios X e gama, reação eletroquímica com ácido sulfúrico e estabilidade química no ar, solo e água são propriedades do chumbo que determinam sua importância comercial e ampla aplicação na indústria (ATSDR, 1995; WHO, 1995)

O chumbo metálico é usado na forma de lâmina ou canos, onde a flexibilidade e a resistência à corrosão são características requeridas em indústrias

químicas e da construção. É usado também para revestimentos na indústria automotiva, como um valioso material protetor contra radiações ionizantes, como metalizante para coberturas protetoras na manufatura de baterias e como um banho de tratamento quente, em revestimento de cabos. O chumbo está presente numa variedade de ligas e seus compostos são preparados e usados em grande escala em muitas indústrias. Cerca de 40% do chumbo é usado como um metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1995).

Os sais de chumbo formam a base de muitas tintas e pigmentos. O Carbonato e o sulfato de chumbo são usados como pigmentos brancos e os cromatos de chumbo fornecem pigmentos amarelo, laranja, vermelho e verde. O arseniato de chumbo pode ser usado como inseticida, o sulfato de chumbo como composto da borracha, o acetato de chumbo tem importante uso na indústria química e o naftenato de chumbo é um secante extensivamente utilizado (WHO, 1995).

Uma das principais utilizações do chumbo é na produção e reciclagem de alguns tipos de baterias e placas elétricas. Estima-se que a manufatura da bateria utilize cerca de 70% do consumo mundial de chumbo (ATSDR, 1993).

No Brasil, a indústria produtora de chumbo produz cerca de 0,003% da produção mundial, sendo que nos últimos anos, esse quadro tem sofrido um declínio significativo. Atualmente, os principais consumidores de chumbo no país são os fabricantes de baterias (80%), seguido por óxidos e pigmentos (12%) e setores elétricos e eletrônicos (8%) (Balanço Mineral Brasileiro, 2001).

Thomas Midley em 1921 descobriu que o chumbo tetraetila era um eficaz agente antidetonante, passando a ser utilizado como aditivo na gasolina gerando com isso, outro aumento dos níveis de chumbo na atmosfera (Warren, 2000).

A comprovação de que baixas doses de chumbo são tóxicas foi demorada e uma das razões foi o uso de métodos pré-analíticos inadequados, como por exemplo, os cuidados com a descontaminação dos tubos para análise, que levavam à resultados erroneamente altos em quaisquer amostras que se testasse analisar. Quem descobriu este problema foi um geoquímico que desenvolvia trabalhos com isótopos de chumbo para determinar a idade da terra. Em 1956 conseguiu definir a idade da terra e também observou que os problemas analíticos que enfrentava eram devidos à contaminação dos ambientes habitados por concentrações altas de chumbo (Flegal, 1998). Começou então, pesquisas com água do mar e sedimentos marinhos, que indicaram que a água da superfície continha concentrações 10 vezes mais altas de chumbo do que os sedimentos e que esta era recente e de origem industrial (Flegal, 1998). A partir daí Patterson utilizou os registros de geleiras para aferir o grau e os períodos de aumento na contaminação da crosta terrestre por chumbo causada pela atividade humana. Portanto, o primeiro aumento apreciável de chumbo na crosta terrestre data deste período, tendo havido um segundo aumento marcante de chumbo datando da época da Revolução Industrial, e o terceiro aumento bem maior a partir de 1940 devido aos

veículos que utilizavam gasolina contendo o chumbo tetraetila como aditivo (Patterson, 1965).

Para lidar com a ameaça do chumbo à saúde humana, várias políticas e estratégias de redução da emissão de chumbo têm sido preparadas pelas autoridades de proteção ambiental em alguns países e organizações internacionais. Entretanto, em muitos países, a percepção dessa contaminação pela sociedade civil e autoridades de saúde como um problema grave de saúde pública ainda não existe (Shen *et al.*, 1998).

O uso do chumbo tem sido reduzido pela sua substituição por plásticos na construção, cobertura de cabos elétricos, canos e contêineres. Alumínio, estanho, ferro e plásticos competem com o chumbo em outras coberturas protetoras e de embalagens e o estanho tem substituído o chumbo em soldas nos sistemas de água potável nos Estados Unidos (USGS, 2001).

No Brasil, desde o final da década de 1970 iniciou-se medidas restritivas para o uso do chumbo tetraetila como aditivo da gasolina e desde 1993, a sua utilização se tornou totalmente desnecessária quando foi obrigatória a adição de 22% de etanol a gasolina (Paoliello e De Capitani, 2005).

Entretanto, liberações de resíduos industriais no solo, provenientes de fundições de metais, fábricas de baterias e indústrias químicas são os maiores contribuintes para o total de chumbo liberado na atmosfera (ATSDR, 1993). Algumas fontes de liberação do metal no ar também incluem a queima de combustível tais como, carvão ou óleo, processos industriais e queima de lixo. A fonte de chumbo na

poeira e no solo inclui as partículas que caem do ar ou trazidas pelo vento e o desgaste e raspagem das tintas que possuem chumbo dos prédios e outras estruturas. Uma vez que o chumbo vai para a atmosfera, ele pode viajar milhares de quilômetros se as partículas forem pequenas. Esse chumbo é removido do ar pela chuva ou queda das partículas no solo ou superfície da água (Goyer e Clarkson, 2001).

1.1.1 Toxicocinética do Chumbo

A absorção do chumbo e seus compostos acontecem através da inalação de partículas contaminadas no ar, ingestão de alimentos e bebidas contaminadas, utilização de certos medicamentos e cosméticos e também através da ingestão de poeira ou sujeira que contenham partículas de chumbo (Goyer e Clarkson, 2001).

Crianças pequenas possuem o constante hábito de levar a mão e objetos à boca, comportamento que aumenta o risco de exposição no caso de contaminação ambiental; assim como, o contato com as vestes contaminadas dos pais ou adultos que trabalham com o metal (Calabrese *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1997).

A fração do chumbo que é absorvida depende principalmente da sua forma física e química, particularmente do tamanho da partícula inalada, densidade e a solubilidade do composto de chumbo. Existem duas classes de compostos de chumbo: os inorgânicos formados por sais e óxidos de chumbo, que não passam pela pele e que precisam de transportadores para cruzar membranas celulares. E os

orgânicos, que são o chumbo tetraetila e o chumbo tetrametila, que são lipossolúveis. Em decorrência da lipossolubilidade, predominam na exposição a estes últimos as alterações neurológicas. Enquanto o chumbo inorgânico é absorvido pelo trato gastrointestinal e vias aéreas superiores, as formas orgânicas do metal podem ser absorvidas também por via cutânea (ATSDR, 1999).

Após a absorção, a meia vida do chumbo no sangue é relativamente curta, em torno de 35 dias (Rabinowitz *et al.*, 1976). Enquanto que os indivíduos adultos absorvem em torno de 10 a 15% e armazenam cerca de 5% do que é absorvido, as crianças absorvem cerca de 41,5% e retém 38,1% (Ziegler *et al.*, 1978). Em condições sistêmicas alteradas, como em casos de alterações de ferro, cálcio e zinco, a absorção é aumentada (Wright *et al.*, 1998, 1999, 2003; Bradman *et al.*, 2001).

Após sua absorção, o chumbo passa a ser distribuído por todo o organismo através da corrente sanguínea. A maior parte dele, cerca de 95%, se liga aos eritrócitos podendo se depositar nos tecidos moles (fígado, pele, músculos, glândulas, pulmões, rins, trato digestivo) ou duros (ossos e dentes); ou ainda, ser excretado através das fezes, urina, suor e lágrimas. (Rabinowitz, 1991).

O chumbo interage com as proteínas de uma forma muito semelhante ao cálcio (Stewart, 1974) e tem, portanto grande afinidade por tecidos mineralizados, sendo que o sítio primário de armazenamento de chumbo no organismo é o osso que contém aproximadamente 95% do conteúdo corpóreo total do metal em adultos (Barry *et al.*, 1975 Sanín *et al.*, 1998, Hu *et al.*, 1998).

Em crianças, o osso representa 70% da carga corpórea de chumbo (Schroeder e Tipton, 1968; Leggett, 1993) de onde este, pode ser mobilizado e contribuir para os níveis do metal no sangue em pessoas anteriormente expostas. Inúmeros estudos têm fornecido evidências de que a mobilização de chumbo dos ossos para o sangue é intensificada durante os períodos de maior liberação óssea tais como crescimento rápido na infância, gravidez, lactação, menopausa, desequilíbrios hormonais, entre outros (Smith *et al.*, 1996).

Historicamente considerado como um depósito de chumbo, o esqueleto é reconhecido como sendo tão importante quanto às influências da exposição, absorção e eliminação para o comportamento toxicocinético do chumbo no organismo humano (Smith *et al.*, 1996).

1.1.2 Toxicidade do Chumbo

A ação crônica do chumbo leva a prejuízos no desenvolvimento neurofisiológico e neurocomportamental das crianças, hiperatividade, diminuição do aprendizado e das funções do sistema cognitivo e ainda, diminuição da audição (Needleman *et al.*, 1979; Rothenberg *et al.*, 2000). Além disso, outras conseqüências comuns da contaminação pelo chumbo são problemas no metabolismo de vitamina D, hipertensão, nefropatia e infertilidade nos homens (Haavikko *et al.*, 1984; Needleman e Bellinger, 1991; Warren, 2000; Goyer e Clarkson, 2001). Relatos de sérias patologias de comportamento em crianças com intoxicação por chumbo foram registrados. Comportamentos anti-sociais e de delinqüência foram fatores de risco

associados mesmo a uma baixa exposição ao chumbo (Needleman *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 2001).

Intoxicações agudas decorrentes de exposições intensas por períodos curtos são excepcionais. Os quadros agudos aparecem nas intoxicações crônicas como encefalopatia aguda, ou seja, confusão mental, cefaléia, vertigens e tremores, aos quais se seguem como convulsões, delírio e coma; causam também neuropatia periférica grave com paralisia de músculos atingindo a inervação. As manifestações agudas podem também provocar cólicas abdominais difusas de forte intensidade, muitas vezes acompanhadas de constipação intestinal, hipertensão arterial, ausência de leucocitose ou alterações no exame abdominal e excepcionalmente febre (Mendelsohn *et al.*, 1998).

Atualmente, o diagnóstico da intoxicação por chumbo (plumbemia) é feito com base no conjunto de informações que consideram a presença da exposição ocupacional, os efeitos biológicos associados com a exposição ao chumbo, sinais e sintomas compatíveis com o saturnismo e as alterações laboratoriais. Na intoxicação por chumbo existe, em alguns casos, com evidentes manifestações clínicas ou sinais de toxicidade, a necessidade de tratamento específico. Este tratamento é realizado com a utilização de agentes quelantes. Por definição, quelante é uma molécula que, sendo distribuída pelos fluidos e tecidos orgânicos, liga-se a metais formando um complexo químico estável que pode ser hidrossolúvel e assim excretado através da urina e/ou fezes. A droga mais utilizada em nosso meio para a quelação é o ácido etileno-diamino-tetracetato (EDTA), cujos

potenciais efeitos colaterais justificam sua utilização apenas quando se supõe que vá resultar em evidentes benefícios para as pessoas (Ministério da Saúde, 2006).

Muitos fatores podem influenciar os níveis de chumbo na população como idade, gênero, grupo étnico, alimentação, consumo de álcool, fumo e local de habitação. Além disso, as fontes de contaminação podem modificar-se com frequência, podendo alterar a localização e intensidade ao longo do tempo, fazendo com que os valores referenciais sejam alterados (Gerhardsson *et al.*, 1996).

1.1.3 Biomarcadores de dose interna

Pelo fato da exposição ao chumbo ser um fator de risco para a saúde, biomarcadores de dose interna para a análise dessa exposição são de grande interesse (Gomes *et al.*, 2004). Os biomarcadores indicam a exposição individual ao chumbo e sua concentração pode refletir a história de exposição passada ou recente. Inúmeros biomarcadores para chumbo já foram citados na literatura, dentre os quais, sangue, plasma, osso, saliva, unha, urina, fezes, dentes, porém cada um deles tem validade variável e revela uma situação específica (Barbosa *et al.*, 2005).

- *Sangue*

As análises de chumbo no sangue fornecem informações variáveis em relação à exposição recente ou crônica. No caso de uma exposição ativa ao chumbo, a dosagem sanguínea representa, principalmente, a exposição recente ao metal, pois sua meia vida no sangue é de aproximadamente 35 dias, podendo ocorrer um declínio se o indivíduo não for exposto a novas fontes de contaminação

(Brudevold *et al.*, 1977, Needleman *et al.*, 1979, Rabinowitz, 1990). Isso se deve, ao fato, do chumbo ser distribuído para os diferentes tecidos do organismo, principalmente os mineralizados, pois o chumbo se comporta de forma muito semelhante ao cálcio, interagindo com as proteínas (Stewart, 1974). Caso a exposição cesse ou diminua, o mineral depositado nos tecidos ósseos passa a ser liberado na corrente sanguínea (Gulson *et al.*, 1996). Desta forma a porcentagem de chumbo proveniente de exposição passada na corrente sanguínea aumenta até que todo o estoque nos tecidos ósseos se esgote (Gwiazda *et al.*, 2005).

Os efeitos da exposição crônica ao chumbo na primeira infância podem ser camuflados durante períodos de remodelação óssea devido ao rápido crescimento de crianças e adolescentes, podendo não ser detectada por uma única medida de chumbo no sangue (Barbosa *et al.*, 2005). Uma vez na corrente sanguínea, os processos cinéticos de absorção, trocas com outros compartimentos do organismo e de eliminação determinam o teor de chumbo no sangue (Hryhorczuk *et al.*, 1985).

- *Osso*

O osso também pode ser utilizado como biomarcador (Hu *et al.*, 1998), sendo que a meia vida do chumbo nos ossos é de 27 anos (Rabinowitz *et al.*, 1976). Durante a sua distribuição, o chumbo segue a via metabólica do cálcio e se acumula nos ossos e dentes (O' Flaherty, 1995).

O estoque de chumbo nos tecidos calcificados depende do *turnover* que acontece nesse tecido e esse processo por sua vez, vai depender do tipo de

osso que pode ser cortical (baixo *turnover*) ou trabecular (alto *turnover*) (O' Flaherty, 1995).

Assim, há dois reservatórios diferentes de chumbo no esqueleto. O compartimento trabecular que rapidamente troca o metal com o sangue, sendo responsável pela manutenção de um equilíbrio entre o osso e o tecido mole ou sangue. Enquanto que no compartimento cortical, o chumbo é essencialmente inerte, com um tempo de meia-vida de décadas. Mesmo assim, este reservatório inerte representa um risco especial, já que é uma fonte endógena potencial de chumbo (ATSDR, 1999).

Esse grande depósito contribui significativamente para manter os níveis de chumbo no sangue após o término da exposição e também como fonte deste metal para o feto, no período de formação do esqueleto fetal (Gulson *et al.*, 1999). Além disso, o crescimento contínuo de crianças implica em constante remodelação óssea, por causa do desenvolvimento esquelético (O' Flaherty, 1995), aumentando a susceptibilidade das crianças aos efeitos deletérios (Barry, 1981).

- *Esmalte*

Como a formação do esmalte dos diferentes dentes se prolonga desde a vida intra-uterina, medidas da concentração de chumbo servem para monitorar a exposição ao chumbo por longos períodos de tempo (Gulson, 1996), mesmo que os níveis sanguíneos tenham voltado ao normal. Isso ocorre por não acontecer *turnover* com a apatita do esmalte, uma vez que o chumbo é depositado, ele não é posteriormente removido (Grobler *et al.*, 1985).

Estudos em animais também mostraram que o chumbo possui uma distribuição espacial heterogênea no dente, com uma maior concentração na superfície do esmalte (Arora *et al.*, 2004)

- *Dentina*

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

A dentina de dentes decíduos foi utilizada para avaliar exposição subclínica ao chumbo em crianças pré escolares (Needleman *et al.*, 1972) sugerindo desde então, que esta fosse utilizada como biomarcador para chumbo e correlacionou o efeito tóxico do chumbo com o comportamento das crianças, déficit de QI e performance escolar (Needleman *et al.*, 1979, 1990).

1.1.4 Os efeitos do chumbo na saúde humana

Os efeitos do chumbo na saúde humana são diversos, sendo alguns dos mais nocivos causados por “ baixas” doses, ou seja, doses que não causam sintomas clínicos de intoxicação. A exposição a baixo nível de chumbo ambiental foi associada com diminuição da função neurocognitiva em crianças (Needleman *et al.*,

1979) e em adolescentes (Needleman *et al.*, 1990), como também outras numerosas condições prevalentes em sociedades industrializadas, como Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDA/H) (Braun *et al.*, 2006), comportamento delinqüente (Needleman *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2001; Whright *et al.*, 2008), deficiência auditiva (Rothenberg *et al.*, 2000), abortos espontâneos (Borja-Aburto *et al.*, 1999), diminuição da função renal (Muntner *et al.*, 2003), e hipertensão (Hu *et al.*, 1996).

Os primeiros estudos que demonstraram a associação entre baixas doses de chumbo e diminuição de QI foram criticados pela questão do controle de fatores de confusão, como o fator sócio-econômico, educação dos pais, entre muitos outros, uma vez que em vários países as crianças com maiores níveis de chumbo no sangue são também aquelas que vivem em regiões mais pobres e cujos pais têm menor nível sócio-econômico e profissões que exigem menos anos de estudo (Needleman *et al.*, 1979; Needleman *et al.*, 1990).

Vários estudos prospectivos realizados entre os anos de 1980 e 1990 mostraram que mesmo com o controle destes fatores, o efeito de chumbo ainda é encontrado. Sendo ainda encontrado em populações expostas a menores quantidades de chumbo (Dietrich *et al.*, 1991; Bellinger *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1993; Braun *et al.*, 2006).

Estudos que coletaram sangue desde o nascimento e nos primeiros anos de vida fazendo um acompanhamento da criança até a idade escolar ou muito posterior, mostraram clara evidência de que a exposição ao chumbo em idade

precoce resulta em diminuição do Q.I. dessas crianças (Dietrich *et al.*, 1991; Bellinger *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1993). Tais estudos contribuíram para a conscientização popular dos perigos do chumbo em alguns países como os E.U.A.

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

O Centro de Controle e Prevenção de doenças (CDC) nos EUA estabeleceu em 1991 um nível de chumbo no sangue de 10ug/dL como um nível de ação em saúde pública (U.S. CDC, 1991).

Embora este valor não tenha sido revisado desde então, o CDC reconheceu que um nível de chumbo no sangue de 10 ug/dL não define um limiar para os efeitos prejudiciais do chumbo (Binns *et al.*, 2007). Como foi apontado por Bellinger (2008) “ este nível não tem nenhum significado especial e não deveria ser considerado seguro” .

O chumbo foi eliminado das tintas e da gasolina nos Estados Unidos (Markowitz e Rosner, 2002), além da sua diminuição em outras formas como utensílios e brinquedos (Needleman, 2005), fazendo com que houvesse um contínuo declínio nos níveis de chumbo no sangue de crianças desde a década de 1980. Dados coletados em 2001-2002 mostraram que os níveis de chumbo no sangue de crianças entre 1-5 anos nos Estados Unidos era de 1,7 ug/dL, e que 5% das

crianças possuíam níveis de chumbo no sangue maiores que 5,8 ug/dL (U.S. CDC, 2005).

Embora os níveis de chumbo no sangue tenham diminuído significativamente nos Estados Unidos nas décadas atuais, nesse país estão mostrando evidência epidemiológica de que os níveis de chumbo no sangue <10 ug/dL causam redução cognitiva (Rothenberg *et al.*, 2000; Canfield *et al.*, 2003; Lanphear *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006;).

Foi demonstrado também em resultados neurocomportamentais que não há nenhuma evidência de existir um limiar abaixo dos quais os níveis de chumbo seriam “ seguros” (Chiodo *et al.*, 2007). À luz desses fatos, é compreensível que alguns autores sugeriram que o nível de chumbo no sangue em crianças seja reduzido para 2 ug/dL (Gilbert e Weiss, 2006). Embora na maioria dos casos a fonte principal de contaminação para crianças pequenas seja o próprio ambiente doméstico (Calabrese *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1997, Binns *et al.*, 2007).

Dois estudos apontaram a existência de uma associação entre comunidades com água fluoretada com ácido fluorsilícico e o aumento das concentrações de chumbo no sangue de crianças (Coplan *et al.*, 2007; Masters *et al.*, 2000).

1.2 FLÚOR

O flúor (F) é o 17° elemento em ordem de abundância, com ampla distribuição na crosta terrestre e presente no solo, água, ar, animais e vegetais. É o

elemento mais eletronegativo do grupo dos halógenos e possui uma grande capacidade de reagir com outros elementos da cadeia periódica, formando compostos orgânicos e inorgânicos. O íon flúor tem a propriedade de se combinar reversivelmente com íons de hidrogênio para formar um ácido fraco, o HF; tem a capacidade de ser um potente inibidor de enzimas, de ter uma velocidade de eliminação dos organismos muitas vezes mais rápida que a dos demais halógenos, tem afinidade por tecidos calcificados, capacidade de estimular a formação de tecido ósseo e a sua grande característica que é a de inibir e também de reverter o processo de formação de lesão de cárie (Featherstone *et al.*, 1990; Featherstone, 1999).

Nos últimos anos tem-se observado aumento significativo da exposição da população às diversas fontes de flúor, tais como dentifrícios e água de abastecimento público, o que pode ocasionar intoxicação crônica (Lalumandier e Rozier, 1995; Horowitz, 1996; Warren e Levy, 1999; Brothwell e Limeback, 1999).

O homem também consome flúor pela ingestão de vegetais, bebidas, como chá preto, animais como camarão, peixes e mariscos (Clarck *et al.*, 1994; Horowitz, 1996). Observa-se também que é crescente o consumo entre crianças de alimentos industrializados, refrigerantes e leite em pó, o que aumenta significativamente a ingestão sistêmica de flúor numa idade precoce (Brothwell e Limeback, 1999).

A quantidade de flúor ingerida na dieta é difícil de ser estabelecida, em função das variações individuais, regionais e culturais na alimentação e da

industrialização dos alimentos. O consumo ideal preconizado é de 0,05 a 0,07 mg/kg por dia de flúor (Burt, 1992). Por ser uma substância farmacologicamente ativa, o flúor deve ter seu uso racionalizado em termos de benefícios e toxicidade (Ekstrand *et al.*, 1988). Com a intensificação do seu uso em diferentes formas, há maior chance de ocorrer ingestão de doses acima da recomendada durante a formação dental e conseqüentemente maior risco de fluorose dental, atualmente uma preocupação de saúde pública (Aoba, 1994).

Por muito tempo prevaleceu o conceito de que seria necessário o uso sistêmico de flúor no período pré-eruptivo, ou seja, na formação dos dentes 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 (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 meio bucal, atua nos processos de desmineralização e remineralização a que são submetidos os dentes devido à produção de ácidos pelas bactérias. Embora o flúor seja extremamente eficaz, é importante sua associação com outras medidas preventivas, como a ação conjunta da escovação para remoção de placa bacteriana (Mullenix *et al.*, 1995).

1.2.1 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 gastrointestinal. A passagem do flúor se dá principalmente de forma passiva na sua forma molecular, ácido hidrófluídrico (HF, $pK_a = 3,4$). A redução do pH acelera a absorção, logo a acidez estomacal facilita a absorção e conseqüentemente os efeitos tóxicos (Whitford, 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). Ao ser ingerido, o fluoreto é absorvido rapidamente, principalmente no estômago e na primeira porção gastrointestinal, os níveis plasmáticos geralmente começam a apresentar sinais de aumento 10 minutos após sua ingestão, o pico máximo é atingido entre 20 e 60 minutos, e então, retornam para os níveis de pré-ingestão depois de 3 a 11 horas sendo que após 30-45 minutos, 90% dele já está presente no sangue (Whitford, 1996).

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 (Whitford, 1990).

1.2.2 Toxicidade do Flúor

Dois tipos de efeitos tóxicos atribuídos ao fluoreto têm sido relatados, a toxicidade aguda e crônica. A toxicidade aguda refere-se à ingestão de grande quantidade de fluoreto de uma só vez; e pode causar desde irritação do trato gastrointestinal, redução temporária da capacidade urinária, fluorose dentária ou esquelética, e até mesmo a morte (Thylstrup e Fejerskov, 1978).

A toxicidade crônica refere-se à ingestão freqüente em pequenas doses, porém acima dos limites aceitáveis, levando a fluorose nos dentes em formação, durante aquele período (DenBesten, 1999).

A fluorose dental é o efeito tóxico mais comum da intoxicação crônica pelo flúor, sendo resultante normalmente da incorporação de diversas fontes de flúor (Aoba, 1994; Cangussu *et al.*, 2002). É caracterizada pela hipomineralização do esmalte dentário superficial (Thylstrup and Fejerskov, 1978), relacionada à retenção de proteínas na matriz do esmalte durante a fase inicial da mineralização (Limeback, 1994). Quanto mais acentuado for o grau de fluorose, mais opaco até amarelo-castanho ficará o esmalte. Isto depende da quantidade de flúor ingerido, da exposição e do estágio da amelogênese durante o período de exposição (Fejerskov *et al.*, 1977; DenBesten, 1999).

Além da quantidade de flúor, outros fatores interferem na severidade da doença como baixo peso corporal, taxa de crescimento esquelético, e períodos de remodelamento ósseo, constituem fases de maior absorção do flúor; estado nutricional, altitude e alterações da atividade renal e da homeostase do cálcio, também são fatores relevantes (DenBesten, 1999).

A ingestão de fluoretos em doses elevadas pode levar também a fluorose esquelética, pois causa alteração no acréscimo ou absorção do tecido ósseo, afetando a homeostase do metabolismo mineral ósseo (Chavassieux, 1990; Gupta *et al.*, 2001).

Segundo a Agência de Registros de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 1993) é natural que a concentração de flúor nos ossos varie entre 500 e 1000 ppm. Mas, no estágio pré-clínico da fluorose esquelética ela chega a ser de 3500 a 5500 ppm, ao desorganizar as estruturas de colágeno, altera a flexibilidade, resistência e funcionalidade dos ossos, podendo provocar fraturas e dificuldade de regeneração.

A intoxicação pelo flúor também pode causar neurotoxicidade. A barreira hematoencefálica é relativamente impermeável ao flúor, mas quando ingerido em grandes quantidades ou disponível em altas concentrações no meio ambiente pode transpô-la (Spittle, 1994).

A dose letal varia muito de indivíduo para indivíduo, o que levou a determinação da dose que causa algum efeito tóxico, a chamada dose provavelmente tóxica (DPT). A DPT é de 5,0 mg de fluoreto por kg de peso, sendo

que uma ingestão acima desse valor pode causar desde sintomas leves como náuseas ou até mesmo a morte do indivíduo (Shulman e Wells, 1997).

1.3 A CO-EXPOSIÇÃO AO FLÚOR E AO CHUMBO

Coplan *et al.*, 2007 sugeriram que a fluorose, também um defeito do esmalte de etiologia supostamente relacionada a alterações do componente protéico, possa ser uma marca para reconhecer outras doenças possivelmente causadas por alterações na conformação de proteínas. Essas alterações no período embrionário ou em idades precoces podem afetar a formação de alguns órgãos e predisõem às doenças na vida adulta. Sendo assim, potencialmente o fluoreto não estaria causando apenas um defeito estético no esmalte, mas poderia ser causa de alterações conformacionais em diversas proteínas do organismo e conseqüentemente, na função dessas proteínas em diferentes sistemas.

O fluoreto de silício, o fluorsilicato de sódio e o ácido fluorsilícico são usados em 90% na fluoretação de água nos EUA (Mass, *et al.*, 2007). Trabalhos mostram que em comunidades que possuem água fluoretada com ácido fluorsilícico possuem o dobro da concentração de chumbo no sangue em relação à concentração de chumbo de crianças de comunidades com água não fluoretada. Também demonstraram que o ácido fluorsilícico está associado à severa corrosão dos canos de abastecimento de água, levando ao aumento da concentração de chumbo na água das torneiras (Coplan *et al.*, 2007).

Masters e colaboradores em 2000 relataram uma associação estatisticamente significativa em comunidades com água tratada com ácido fluorsilícico e elevado nível de chumbo no sangue em 151.225 amostras de sangue de crianças de 0-6 anos de idade que vivem em 105 comunidades no estado de Nova Iorque, E.U.A.. Eles também observaram que a maior probabilidade de encontrar valores de chumbo no sangue $> 10 \mu\text{g/dL}$ ocorrem quando essas crianças são expostas a água fluoretada com ácido fluorsilícico e a outro fator de risco associado com níveis elevados de chumbo no sangue. Estes autores mostraram a necessidade de estudos químicos e testes em animais.

Macek et al (2006) examinaram dados de chumbo no sangue de 9,477 indivíduos com idade entre 1-16 anos da Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994), e mostraram uma interação estatística entre método de fluoretação da água e presença de chumbo no sangue, apenas em modelos que incluíram habitações construídas antes de 1946 e habitações de idade desconhecida. Morar em habitações mais velhas é um fator de risco conhecido para aumento à exposição ao chumbo, pois naquela época o chumbo ainda não havia sido eliminado das tintas e os encanamentos também possuíam esse metal.

Esta controvérsia indica que o assunto flúor e chumbo merecem atenção especial, particularmente o efeito das formas de fluoreto de silício, já que esse íon de fluoreto é utilizado em mais de 90% para fluoretação da água nos EUA (Mass *et al.*, 2007) e também é amplamente utilizado em outros países como o

Canadá (Canadian Cancer Society, 2009) e Austrália (Australian Drinking Water Guidelines, 2004).

O Chumbo e o flúor são chamados "bone seeking agents", ou seja, são caracterizados pela alta afinidade pelo osso e interferem na absorção, metabolismo e acúmulo um no outro (Stepensky *et al.*, 2003). Este possível efeito na absorção pode também explicar o aumento dos níveis de chumbo no sangue de crianças que vivem em comunidades que possuem água fluoretada com ácido fluorsilícico (Coplan *et al.*, 2007).

Embora estudos detalhados na distribuição espacial desses elementos no osso e dentes ainda sejam difíceis devido a limitações metodológicas, estudos de diferentes laboratórios mostram que chumbo e flúor compartilham da mesma distribuição, pelo menos em alguns tecidos calcificados como o esmalte dentário (Cleymaet *et al.*, 1991; Arora *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o chumbo acumula-se nos primeiros micrômetros superficiais do esmalte na sua parte mais exterior, particularmente nos primeiros 6 µm em humanos (Cleymaet *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008), assim como o flúor também se acumula nessa mesma camada. Portanto, a distribuição destes dois elementos no esmalte dentário e na maioria dos tecidos calcificados em vertebrados que contêm 95% de mineral em peso (Smith *et al.*, 1998) poderia ser uma indicação adicional da interação biológica que ainda não foi analisada em animais.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

Analisar sangue, osso total, osso superficial, esmalte dentário e dentina de animais co-expostos a 100 ppm de ácido fluorsilícico (H_2SiF_6) e a 30 ppm de chumbo desde a vida pré-natal até 81 dias comparados com o grupo controle, flúor e chumbo administrados isoladamente na dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

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

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

As fêmeas foram separadas dos machos depois que acasalaram e foram alojadas cada uma em uma gaiola separada para completar a gestação. Após o nascimento os filhotes foram separados de suas mães no desmame, ou seja, com 21 dias e continuaram recebendo a mesma dieta até completarem 81 dias. Dez fêmeas de cada grupo foram utilizadas para a coleta de tecidos para este estudo. O

sangue, fêmures e os incisivos inferiores de cada animal foram coletados *post-mortem* para a análise de chumbo e flúor. Estes tecidos foram limpos de tecidos moles utilizando gaze. Os tecidos foram coletados e armazenados em tubos livre de metais e congelados à -20°C até sua utilização.

3.2 MEDIDAS PRÉ-ANALÍTICAS

Água deionizada de alta pureza (resistividade de 18.2 Ohm) obtida por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) foi utilizada ao longo de toda descontaminação. Todos reagentes empregados tinham alto grau analítico de pureza.

Todos os tubos falcons, eppendorfs, pipetas, ponteiros, materiais de vidro e outros materiais que foram utilizados neste estudo, foram descontaminados por imersão em HNO₃ a 10% por 24 horas e depois enxaguados cuidadosamente por cinco vezes em água MilliQ e secos em capela de fluxo laminar (classe 100). Inclusive as bancadas, e o material cirúrgico utilizados nos animais foram limpos com HNO₃ a 10%.

3.3 AMOSTRAS DE OSSO TOTAL E OSSO SUPERFICIAL

Um dos fêmures de cada animal foi utilizado para obter uma amostra da superfície óssea (biópsia de osso). Um fêmur seco foi mantido submerso durante 1 minuto em 3ml de HNO₃ a 2% (ácido nítrico bidestilado). Desta solução 100µL foram utilizados para dosagem da concentração de flúor, enquanto 60µL foram

diluídos em 2mL de HNO₃ a 1% para determinar as concentrações de chumbo e fósforo.

O outro fêmur de cada animal foi totalmente dissolvido em 6mL de HNO₃ a 65% (a dissolução aconteceu *overnight* a temperatura ambiente). Desta solução 100µ L foram utilizados para determinar a concentração de flúor, enquanto 60µL foram diluídos em 5ml de HNO₃ a 1% para determinar as concentrações de chumbo e fósforo.

3.4 AMOSTRAS DE DENTE

A biópsia de esmalte foi realizada em um tubo tipo Eppendorf de 0,5mL contendo 500µL de HNO₃ a 1.8% (v/v). A face labial do terço incisal do incisivo inferior foi mantida em contato com o ácido durante 20 segundos. O eppendorf foi inclinado formando um ângulo de 35° em relação ao plano horizontal para facilitar o contato do ácido com o esmalte superficial. Desta solução, 100µL foram utilizados para determinar a concentração de flúor, enquanto 60µL foram diluídos em 2mL de HNO₃ a 1% para dosar as concentrações de chumbo e de fósforo.

Um fragmento de dentina foi obtido do terço lingual na cervical do incisivo inferior (este fragmento era destituído de esmalte, pois nos ratos esses dentes possuem um crescimento contínuo, possuindo esmalte apenas em sua face labial) (Porto *et al.*, 2009). Este fragmento de dentina foi completamente digerido em 1mL de HNO₃ a 50% (v/v) *overnight*. Desta solução, 100µL foram utilizados para

determinar a concentração de flúor, enquanto 60µL foram diluídos em 5mL de HNO₃ a 1% para dosagens das concentrações de chumbo e de fósforo.

3.5 AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue total foram coletadas com seringas livres de metal e lubrificadas com heparina. Amostras de sangue ficaram congeladas (-20°C) até o momento da dosagem de chumbo em ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) de acordo com o método proposto por Palmer *et al.*, 2006.

3.6 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO

As concentrações de fósforo presentes nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925), cujo princípio é que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é, em seguida, reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. A determinação das concentrações de fósforo foi realizada em triplicata. A variação entre as triplicatas foram de 0,2 a 6,3%. A reação consistiu de 30µl de amostra, 220µl de água deionizada e 50µl da solução de ácido molíbdico (molibdato de amônio a 2,5% (p/v) em 4N H₂SO₄), que foram cuidadosamente vortexados. Após 10 minutos, 20µl do agente redutor foram adicionados à mistura e vortexados novamente. O agente redutor consiste em uma mistura em pó preparado

MATERIAL E MÉTODOS

com ácido 1-Amino-2-Naphthol-4-Sulfônica, sulfito de sódio e bissulfito de sódio na proporção 1:6:6. Minutos antes de usar foi misturado em água (2,5% (w/v)).

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

O teor de fosfato em cada amostra de biópsia foi utilizada para calcular a quantidade de esmalte avaliada (g), pressupondo um teor de fósforo em esmalte igual a 17,0% (Halse e Selvig, 2007), dentina igual a 15,97% (Tjäderhane *et al.*, 1995), e osso igual a 13,5 (de Menezes *et al.*, 2003).

Tabela 1: Protocolo operacional padrão para a dosagem de fósforo

	Blank	P1*	P2*	P3*	P4*	Amostra
H2O d.d.	230µl	220µl	210µl	190µl	150µl	220µl
Padrão 3mg%		10µl	20µl	40µl	80µl	
Amostra						30µl
Ac. Molibdico	50µl em todos. Agitar e aguardar 10 minutos.					
Reativo Redutor	20µl em todos. Agitar imediatamente e aguardar 20 minutos.					
	Comprimento de onda 660nm					
µg/ml	0	1	2	4	8	?

*amostras

3.7 DETERMINAÇÃO DE CHUMBO

As concentrações de chumbo nas amostras de sangue total, biópsia de esmalte, dentina, osso total e biópsia de fêmur foram determinadas pela técnica da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Perkin Elmer Elan DRC II), de acordo com o método proposto por Barbosa *et al.* (2005). As amostras de sangue total foram diluídas na proporção 1+49 com uma solução contendo 0,005% de Triton X-100 em 0,5% (v/v) HNO₃ destilado. As amostras de biópsia de esmalte, dentina, osso total e biópsia de osso previamente preparadas foram analisadas também em ICP-MS. O limite de detecção para chumbo foi de 0,05µg/L. O controle de qualidade para dosagem de chumbo foi assegurada por materiais de referência padrão proveniente do Instituto Nacional de Medidas e Tecnologia dos EUA (NIST 955c). Foram também usados outros materiais de referência provenientes do Departamento de Saúde do Estado de Nova York ou do Instituto Nacional de Santé Publique de Quebec, Canadá. As amostras do material de referência eram analisadas a cada 10 amostras analisadas para certificar a calibração do aparelho. Os resultados foram expressos em µg Pb/dL de sangue total ou µg Pb/g de tecidos calcificados.

3.8 DETERMINAÇÃO DE FLÚOR

Para a determinação de flúor, 100µL das amostras dissolvidas foram misturados com 900 µL de água de deionizada, e 100 µL de TISAB II (1,0 M de tampão acetato, pH 5.0 com 1.0 M NaCl e 0.4% ácido de

ciclohexanediaminetetracético). As amostras foram agitadas à temperatura ambiente, e a concentração de flúor foi determinada em um analisador de íon (Orion EA-940) previamente calibrado com uma curva padrão de flúor (0.5-5.0 µg/ml) preparadas nas mesmas condições que a amostra. Os resultados foram expressos como µg F/g de tecido calcificado (esmalte, dentina e osso).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados quanto à distribuição e passou no teste de normalidade. Para a comparação entre os grupos, foi usado o teste estatístico ANOVA com nível de significância $p < 0,05$. A diferença entre os grupos foi calculada usando o Teste de Bonferroni com nível de significância para $p < 0,008$ (uma vez que 6 comparações foram usadas).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÕES DE CHUMBO

- *Sangue*

A Figura 1 mostra que a concentração de chumbo no sangue é de 3,4 vezes mais alta nos animais do grupo F+Pb ($76,7 \pm 11,0 \mu\text{g/dL}$) em comparação com os animais do grupo Pb ($22,6 \pm 8,5 \mu\text{g/dL}$) ($p < 0,001$). As concentrações de chumbo no sangue estavam abaixo de $0,5 \mu\text{g/dL}$ em ambos os grupos, Controle e Flúor (Figura 1).

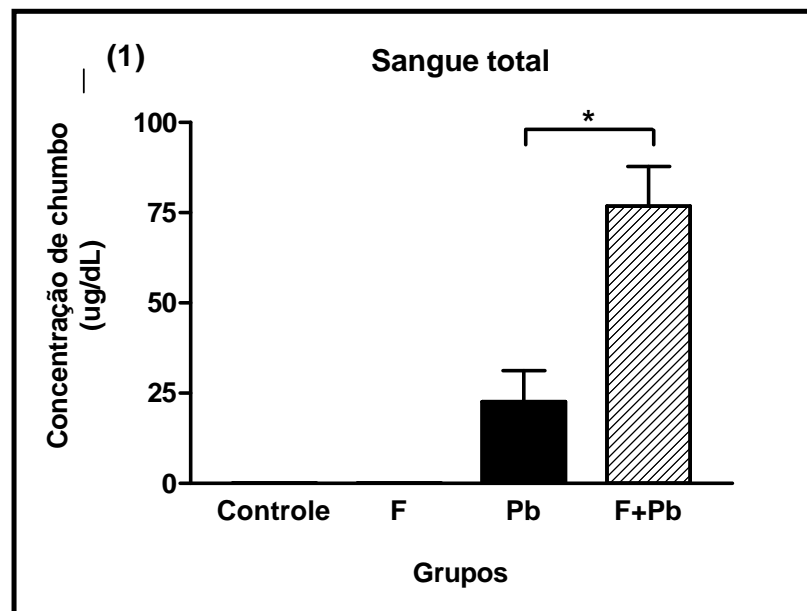


Figura 1: Concentração de chumbo no sangue ($\mu\text{g/dL}$).

- **Tecidos calcificados**

A figura 2-5 mostra as concentrações de chumbo encontradas nos tecidos calcificados. E que os níveis de chumbo também foram mais altos no grupo F+Pb *versus* o grupo Pb em todos os tecidos testados neste estudo.

- **Biópsia de esmalte**

No grupo F+Pb a concentração de chumbo no esmalte superficial foi significativamente mais alto do que no grupo de Pb ($4,369 \pm 1,353 \mu\text{g/g}$ *vs* $1,768 \pm 1,892 \mu\text{g/g}$, respectivamente) ($p < 0.001$), indicando um aumento de 2,5 vezes mais, na quantidade de chumbo no Grupo F+Pb.

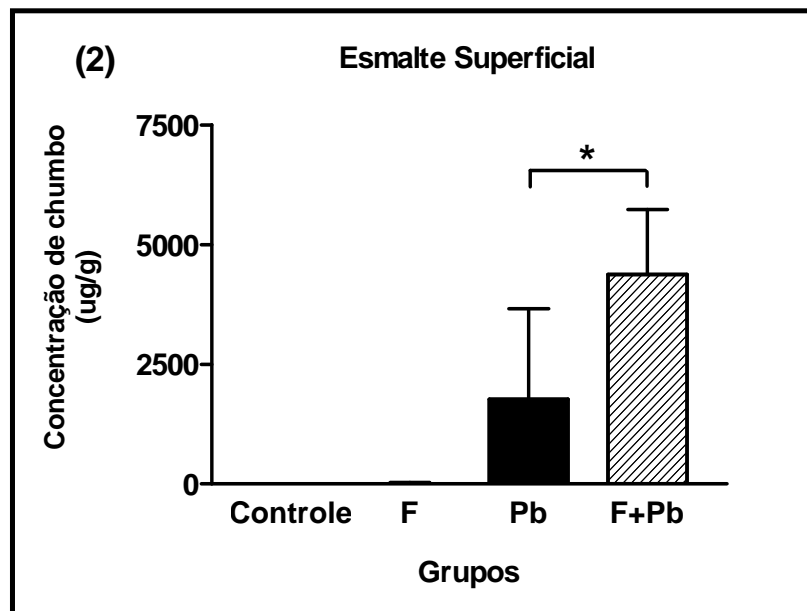


Figura 2: Concentração de chumbo no esmalte superficial ($\mu\text{g/dL}$).

o *Digestão de dentina*

Um resultado semelhante foi observado nas amostras de dentina (Figura 3). No grupo F+Pb a concentração de chumbo na dentina foi de $8,5 \pm 2,0 \mu\text{g/g}$ versus $4,9 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$ encontradas no grupo Pb ($p < 0,001$).

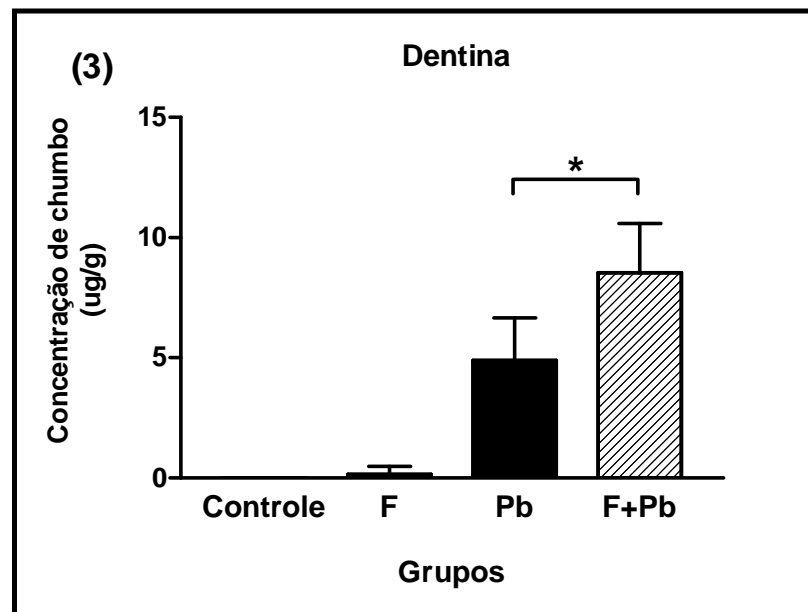


Figura 3: Concentração de chumbo na dentina ($\mu\text{g/dL}$).

o *Biópsia de Osso*

Na superfície óssea, a concentração de chumbo encontrada no Grupo de F+Pb era 3,1 vezes mais que as determinadas nos animais do grupo Pb, com $28,0 \pm 10,6$ e $9,0 \pm 3,7$ $\mu\text{g/g}$ nos grupos F+Pb e Pb, respectivamente ($p < 0,001$).

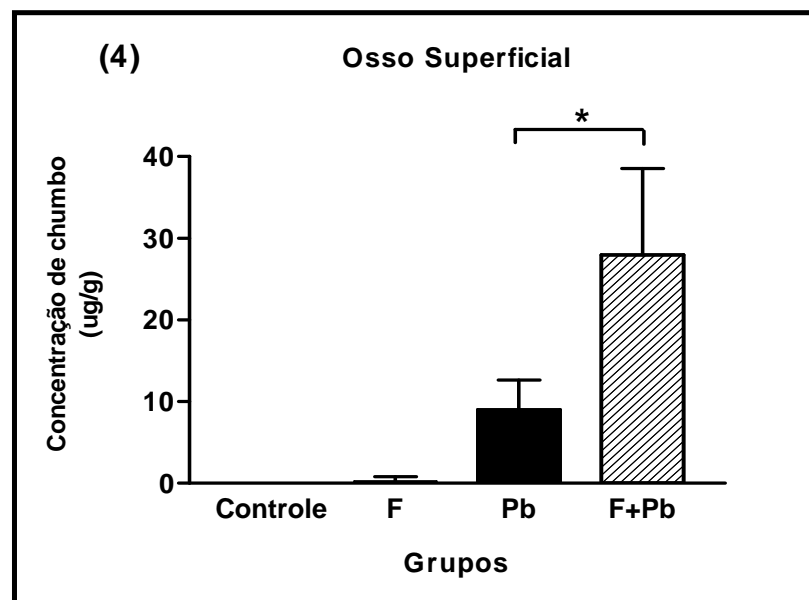


Figura 4: Concentração de chumbo na biópsia de osso ($\mu\text{g/dL}$).

○ *Digestão de osso*

As concentrações de chumbo no osso total dobraram no grupo F+Pb ($14.2 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$) comparadas com esses achados no Grupo Pb ($6.8 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$) ($p < 0.001$).

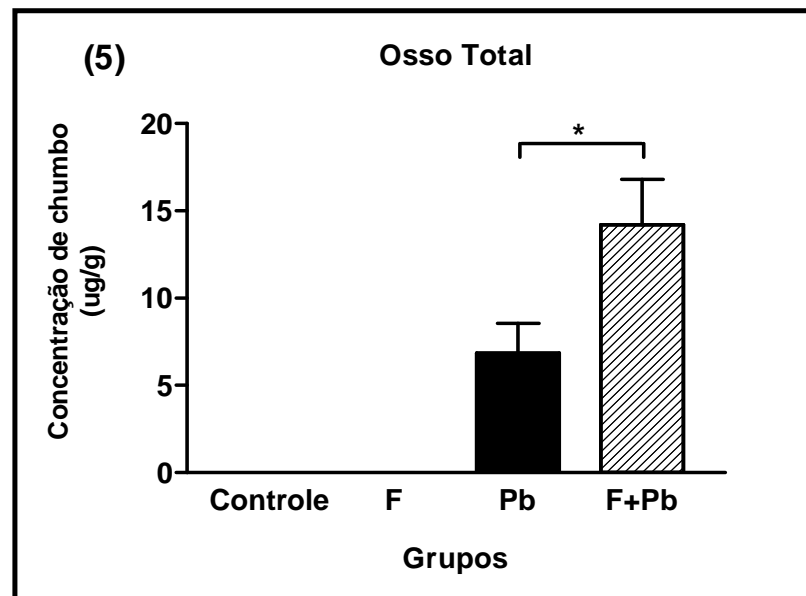


Figura 5: Concentração de chumbo no osso total ($\mu\text{g/dL}$).

A dentina foi o tecido calcificado que exibiu as mais baixas concentrações de chumbo encontradas, sendo o osso total o segundo tecido calcificado com menos chumbo armazenado por peso de tecido, seguida por superfície óssea.

Os tecidos calcificados com quantidades semelhantes de mineral e matriz orgânica colágena (dentina e osso) mostraram entre 5 e 9 $\mu\text{g/g}$ de chumbo nos animais do grupo Pb e entre 8,5 e 28 $\mu\text{g/g}$ de chumbo nos animais de F+Pb. Por

outro lado, o esmalte analisado pela técnica de biópsia superficial mostrou concentrações muito altas de chumbo, chegando a 500 vezes mais que as concentrações encontradas na dentina dos respectivos grupos.

4.2 CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR

Como mostra a Figura 6a-d, o grupo F e o grupo F+Pb mostraram concentrações de flúor significativamente mais alto que o grupo Controle ou o grupo Pb (valor $p < 0,001$ para todas as comparações entre os grupos F ou F+Pb versus os grupos controle ou Pb).

Nenhuma diferença significativa foi descoberta nas concentrações de flúor encontradas nos tecidos calcificados testados quando o grupo F foi comparado ao grupo F+Pb ($P > 0,05$ para todas as comparações).

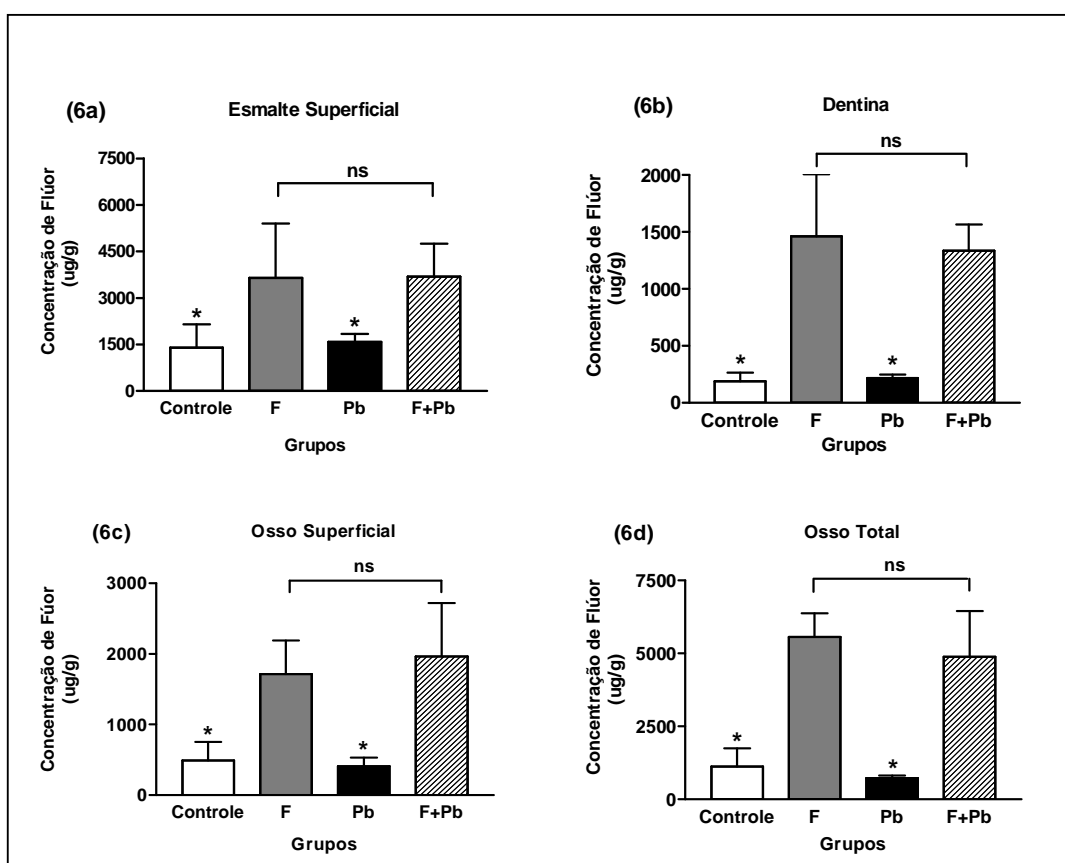


Figura 6: Concentração de flúor ($\mu\text{g/dL}$) nos tecidos calcificados.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo mostra um aumento claro nas concentrações de chumbo determinadas em sangue total e tecidos calcificados de animais co-expostos a chumbo e flúor desde a idade gestacional até a idade de 81 dias.

Quando comparamos o grupo F+Pb com o grupo Pb foi observado uma elevação consistente nas quantidades de chumbo encontrados no sangue total e tecidos calcificados dos animais do grupo F+Pb. As concentrações de chumbo encontradas no grupo F+Pb foi de 3,4 vezes maior no sangue, 2,5 vezes maior no esmalte superficial, 3 vezes maior na superfície do osso, 2 vezes maior no osso total e 1,7 vezes maior na dentina em comparação ao grupo Pb.

As concentrações de flúor não mudaram em quaisquer dos tecidos testados no grupo exposto a flúor quando comparado ao grupo exposto a flúor e chumbo.

Este efeito da co-exposição para chumbo e flúor nunca foi descrito antes, e pode ter implicações sérias para populações expostas a quantidades elevadas de chumbo e flúor, e particularmente para crianças que são expostas a elevadas concentrações de flúor sob várias formas. A concentração de chumbo escolhida é considerada uma baixa concentração de chumbo para roedores. Isso foi demonstrado no estudo de Leasure et al. em 2008, no qual o grupo de ratos expostos a uma baixa dose de chumbo, eram tratados com 27 ppm de chumbo na água.

Por outro lado, a concentração de flúor escolhida pode ser considerada alta para roedores (100mg/L ou ppm). Esta alta concentração foi selecionada porque resulta em níveis de flúor no plasma que é comparável a níveis encontrados em humanos expostos cronicamente a 8mg/L de flúor na água potável, uma concentração conhecida por causar fluorose severa em humanos (Mullenix *et al.*, 1995).

Este estudo foi baseado em uma hipótese derivada da evidência epidemiológica de milhares de crianças em que o flúor da água poderia aumentar os níveis de chumbo no sangue. Para isso, foi necessário maximizar o efeito do flúor para se observar sua influência quando associado ao chumbo, já que se tratava de um estudo de demonstração em animais.

Embora as crianças não sejam cronicamente expostas a concentrações tão altas de flúor, como 100 ppm por meio da água potável, as crianças são muitas vezes expostas a altos níveis de flúor durante os primeiros anos de vida devido às muitas fontes disponíveis de flúor a que estão sujeitas (Aoba, 1994).

Considerando que o flúor não é um agente tóxico, está livremente disponível de várias formas diferentes, como enxaguatórios bucais, dentifrícios, suplementos, além do flúor presente na água, bebidas e comida. Esta difusão do flúor resultou em prevalência crescente da fluorose no E.U.A. (Pendry, 2000) e em outras partes do mundo (Leverett, 1986; Jackson, 1999; Tabari, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000).

O aumento na prevalência de fluorose em dentes que mineralizam entre 1 e 4 anos de idade, foi principalmente atribuído ao aumento da exposição de crianças desta idade para quantidades mais elevadas de flúor devido à ingestão de dentifrícios fluoretados (Osuji *et al.*, 1988).

A maturação do esmalte, que é o processo de mineralização durante formação dos dentes leva um longo tempo. Como descrito por Smith (1998), a maturação pode levar de 3-4 anos para se completar nas coroas dos dentes permanentes. Durante todo este tempo, as doses de flúor disponíveis a algumas crianças podem ser muito elevadas se essas crianças possuírem livre acesso a enxaguatórios bucais e dentifrícios que contenham flúor. Por isso, é provável que durante os primeiros anos de vida dessas crianças, elas estejam expostas a episódios de níveis elevados de flúor.

Uma razão para preocupação é o fato de que a exposição para quantidades elevadas de chumbo e flúor ocorrem na mesma idade (1-3 anos) quando o aumento nos níveis de chumbo no sangue ainda são muito prejudiciais ao sistema nervoso em desenvolvimento de uma criança (Bellinger, 2004).

Alguns estudos na prevalência de fluorose apontam para um grau mais elevado de fluorose nos dentes anteriores e primeiros molares (Ismail *et al.*, 1990), sendo uma medida indireta que indica que as crianças recebem uma dose mais elevada de flúor quando os dentes anteriores e primeiro molares se mineralizam, ou seja, entre 1 e 5 anos de idade. Isto é, ao mesmo tempo em que os níveis de chumbo no sangue dessas crianças são mais elevados. As crianças estão

mais expostas ao chumbo entre os 12 e 36 meses de idade, pois nos primeiros anos de vida as crianças possuem o hábito de levar a mão e objetos à boca (Binns *et al.*, 2007). Então, esta é uma idade crítica quando a exposição sistêmica ao flúor deveria ser minimizada, já que a exposição sistêmica ao flúor não possui benefícios na prevenção de lesões de cárie e, como mostrado neste trabalho, parece ter um efeito na acumulação de chumbo que deveria ser evitado principalmente nas crianças.

Os benefícios da fluoretação da água potável para prevenção da doença cárie são inquestionáveis (Kumar e Moss, 2008). No entanto, atualmente, a preocupação aumentou em relação à associação do flúor na água com o aumento dos níveis de chumbo no sangue em vários países (Masters e Coplan, 1999; Masters *et al.*, 2000).

Particularmente, crianças que vivem em comunidades que possuem o ácido fluorsilícico (H_2SiF_6) como agente de fluoretação da água potável, possuem os mais altos níveis de chumbo no sangue (Masters *et al.*, 2000).

Neste estudo foi demonstrado que o flúor na forma de H_2SiF_6 aumenta os níveis de chumbo no sangue e as concentrações de chumbo nos tecidos calcificados.

Estes resultados indicam um efeito biológico da co-exposição ao chumbo e flúor que merecem estudos adicionais usando doses e formas diferentes de flúor para melhor caracterizar este efeito e calcular as possíveis conseqüências para níveis de chumbo no sangue de crianças de comunidades que recebem água fluoretada.

Além disso, são necessários tais estudos para estabelecer padrões seguros na quantidade de flúor para o uso tópico, enxaguatórios bucais e dentifrícios, em crianças abaixo de 5 anos, sendo no entanto que a preocupação com as doses de flúor são baseadas na "dose provavelmente tóxica" (Shulman e Wells, 1997).

As preocupações sobre o efeito do flúor também são relevantes a áreas poluídas por flúor, onde a exposição da população e animais a outros metais tóxicos como o chumbo pode estar aumentada e a consciência deste fato pode colaborar muito na prevenção. As mudanças nas concentrações de chumbo observadas neste estudo podem acontecer com outros metais que foram encontrados nos tecidos calcificados, como o cádmio (Cleymaet *et al.*, 1991), que também merecem estudos.

São necessários trabalhos adicionais sobre o mecanismo de ação do flúor que leva ao aumento no acúmulo de chumbo observado neste estudo. Serão fundamentais pesquisas sobre metabolismo de chumbo e flúor em diferentes animais para observar se há um aumento na absorção ou diminuição na excreção de chumbo.

Além disso, nossos resultados sugerem que o flúor possa aumentar a disponibilidade de chumbo no organismo e um efeito deste tipo poderia ter um impacto em estudos sobre os efeitos do chumbo. Como apontado por Bellinger (2004) " A co-exposição a outras substâncias tóxicas seria uma explicação para diferenças individuais à suscetibilidade (a chumbo), embora maior atenção tenha

vido dada ao potencial de co-exposições serem fatores de confusão do que modificadores de efeito” .

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou um aumento claro nas concentrações de chumbo encontradas no sangue e tecidos calcificados (osso e dente) de animais com 81 dias de idade co-expostos a 30 ppm de chumbo e 100 ppm de flúor na forma de ácido fluorsilícico (H_2SiF_6) desde a idade gestacional, sugerindo que a interação entre esses elementos, nestas quantidades, possa ter um efeito biológico importante para o acúmulo de chumbo no organismo.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

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

Arora M, Chan SW, Kennedy BJ, Sharma A, Crisante D, Walker DM. Spatial distribution of lead in the roots of human primary teeth. *J Trace Elem Med Biol.* 18(2):135-139, 2004

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile for Lead.* U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia 24:53-5. 1993

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile for lead.* U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta. 1999.

ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry annual report-1995. Lead. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov>. Acessado em 22/07/2009.

Australian Drinking Water Guidelines, 2004. http://www.health.vic.gov.au/environment/downloads/fluori_qa07.pdf#page=8. Acessado em 16/07/2009

Balanço Mineral Brasileiro 2001. <http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/chumbo.pdf>. Acessado em 24/07/2009.

Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect.* 113(12):1669-74, 2005.

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

Barry PS. Concentrations of lead in the tissues of children. *Br J Ind Med.* 38:61, 1981

Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: A long-term follow-up study. *Pediatrics* 90:855-61, 1992.

Bellinger DC. What is an adverse effect? A possible resolution of clinical and epidemiological perspectives on neurobehavioral toxicity. *Environ Res.* 95:394-405, 2004.

Bellinger DC. Neurological and behavioral consequences of childhood lead exposure. *PloS Medicine* 5(5):690-92, 2008.

Binns HJ, Campbell C, Brown MJ (for the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention). Interpreting and Managing Blood Lead Levels of Less Than 10 µg/dL in Children and Reducing Childhood Exposure to Lead: Recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. *Pediatrics* 120:1285-1298, 2007.

Borja-Aburto VH, Hertz-Picciotto I, Rojas LM, Farias P, Rios C, Blanco J. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 150(6):590-597, 1999.

Bradman A, Eskenazi B, Sutton P, Athanasoulis M, Goldman LR. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect.* 109(10):1079-84, 2001.

Braun JM, Kahn RS, Froehlich T, Auinger P, Lanphear BP. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ Health Perspect.* 114(12):1904-9, 2006.

Brothwell DJ, Limeback A. Fluorosis risk in grade 2 students residing in a rural area with widely varying natural fluoride. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 26:130-136. 1999.

Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res.* 56(10):1165-71, 1977.

Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res.* 71(5):1228-1237, 1992.

Calabrese EJ, Stanek EJ, James RC, Roberts SM. Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Environ Health Perspect.* 105:1354, 1997.

Canadian Cancer Society, 2009: http://www.cancer.ca/canada_wide/about%20us/media%20centre/our%20positions%20on%20cancer-related%20issues/water%20fluoridation.aspx?sc_lang=en. Acessado em 16/07/2009.

Canfield RL, Henderson CRJ, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N Engl J Med.* 348:1517– 1526, 2003.

Cangussu MC, Narvai PC, Castellanos Fernandez R, Djehizian V. Dental fluorosis in Brazil: a critical review. *Cad Saude Publica.* 18(1):7-15, 2002.

Chavassieux P. Bone effects of fluoride in animal models in vivo: a review and a recent study. *J Bone Miner Res.* 5(1):S95-9, 1990.

Chiodo LM, Covington C, Sokol RJ, Hannigan JH, Jannise J, Ager J, et al. Blood lead levels and specific attention effects in young children. *Neurotoxicol Teratol* 29(5):538-46, 2007.

Clarck DC, Hann HJ, Willianson MF; Berkowitz ZJ. Influence of exposure to various fluoride technologies on the prevalence of dental fluorosis. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 22:461-464. 1994.

Cleymaet R, Retief DH, Quartier E, Slop D, Coomans D, Michotte Y. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. *Sci Total Environ.* 104:175-189, 1991.

Counter SA, Buchanan LH, Ortega F. Neurocognitive impairment in lead-exposed children of Andean lead-glazing workers. *J Occup Environ Med.* 47:306-312, 2005

Coplan MJ, Patch SC, Masters RD, Bachman MS. Confirmation of and explanations for elevated blood lead and other disorders in children exposed to water disinfection and fluoridation chemicals. *Neurotoxicology.* 28(5):1032-42, 2007.

Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva M da C, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Rosário de Sousa Mda L, Buzalaf MAR, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 104(3):337-45, 2007.

- De Almeida GR, de Souza Guerra C, Tanus-Santos JE, Barbosa F Jr, Gerlach RF. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. *Environ Res.*107(2):264-70, 2008.
- De Menezes LMB, Volpato MC, Rosalen PL, Cury JA. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. *Forensic Science Internat.* 137:209-214, 2003.
- DenBesten PK. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. *Community Dent Oral Epidemiol.* 27(1):41-47, 1999.
- Dietrich KN, Berger OG, Succop PA, Hammond PB, Bornschein RL. The developmental consequences of low to moderate prenatal and postnatal lead exposure: Intellectual attainment in the Cincinnati lead study cohort following school entry. *Neurotoxicol Teratol.* 15:37-44, 1993.
- Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, Bornschein RL. Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol.* 23(6): 511-8, 2001
- Dietrich KN, Succop PA, Berger OG, Hammond PB, Bornschein RL. Lead exposure and the cognitive development of urban preschool children: the Cincinnati lead study cohort at age 4 years. *Neurotoxicol Terat.* 13:203-211, 1991
- Ekstrand J, Fejerskov O, Silverstone LM. *Fluoride in dentistry.* Copenhagen: Munksagaard. 294, 1988.
- Featherstone JD Prevention and reserval of dental caries: Role of low level fluoride. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 2731:31-40, 1999.
- Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res.* 69:620-5, 1990.
- Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 131(7):887-99, 2000.
- Ferjerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Clinical and structural features and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. *Scand J Dent Res.* 85(7):510-534, 1977.

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

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

Gerhardsson L, Kazantzis G, Schultz A. Evaluation of selected publications on reference values for lead in blood. *Scan J Work Environ.* 22:325-331, 1996.

Gerlach R.F., Souza A.P., Line S.R.P. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 108: 327-334, 2000.

Gidlow DA. Lead toxicity. *Occupational Medicine.* 54(2):76-81, 2004.

Gilbert SG, Weiss B. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 microg/dL. *Neurotoxicology.* 27(5):693-701, 2006.

Gilfillan SC. Lead Poisoning and the Fall of Rome. *J Occup Med.* 7: 53-60, 1965.

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

Goyer R A, Clarkson T W. Toxic effects of metals. In: Cassaret, Doull's. *Toxicology: the basic science of poisons.* 6rd ed. McGraw-Hill. 23:811-867, 2001.

Grobler SR, Rossouw RJ, Kotze D. Lead levels in circumpulpal dentine of children from different geographic areas. *Arch Oral Biol.* 30(11-12): 819-20, 1985.

Gulson BL. Tooth analyses of sources and intensity of lead exposure in children. *Environ Health Perspect.* 104:306-312, 1996.

Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Howarth D, Phillips A, Hall J. Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull Environ Contam Toxicol.* 56(4): 543-50, 1996.

Gulson BL, Pounds JG, Mushak P, Thomas BJ, Gray B, Korsch MJ. Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 134(6):631-640, 1999.

Gupta SK, Klan TI, Gupta RC, Gupta AB, Gupta KC, Jain P, Gupta A. Compensatory hyperparathyroidism following high fluoride ingestion: a clinical biochemical correlation. *Indian Pediatr*. 38(2):139-46, 2001

Gwiazda R, Campbell C, Smith D. A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implications for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ Health Perspect*. 113(1):104-10, 2005.

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

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

Horowitz, HS. The effectiveness of community water fluoridation in the United States. *Journal of Public Health Dentistry*. 56:253-258, 1996.

Hryhorczuk D.O, Rabinowitz MB, Hessel SM, Hoffman D, Hogan MM, Mallin K, Finch H, Orris P, Berman E. Elimination kinetics of blood lead in workers with chronic lead intoxication. *American Journal of Industrial Medicine* 8(1):33-42, 1985.

Hu H, Aro A, Payton M, Corrick S, Sparrow D, Weiss ST, Rotnitzky A. The relationship of bone and blood lead to hypertension. The normative aging study. *JAMA* 275:1171-1176, 1996.

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

Hu H, Téllez-Rojo MM, Bellinger D, Smith D, Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Schwartz J, Schnaas L, Mercado-García A, Hernández-Ávila M. Fetal lead exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. *Environ Health Perspect*. 114(11):1730-5, 2006.

- Ismail AI, Brodeur JM, Kavanaga M, Bolsclair G, Tessler C, Picotte L. Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students, 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec. *Caries Res.* 14:290-297, 1990.
- Jackson RD, Kelly SA, Katz B, Brizendine E, Stookey GK. Dental fluorosis in children residing in communities with different water fluoride levels: 33-month follow-up. *Pediatr Dent.* 21(4):248-54. 1999.
- Jin A, Teschke K, Copes R. The relationship of lead in soil to lead in blood and implications for standard setting. *Sci Total Environ.* 208:23, 1997.
- Kumar JV, Moss ME. Fluorides in Dental Public Health Programs. *Dent Clin N Am.* 52:387-401, 2008.
- Lalumandier JA, Rozier RG. The prevalence and risk factors of fluorosis among patients in a pediatric dental practice. *Pediatr Dent.* 17(1):19-25, 1995.
- Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep.* 115(6):521-9, 2000.
- Leasure JL, Giddabasappa A, Chaney S, Johnson JE Jr, Pothakos K, Lau YS, Fox DA. Low-level human equivalent gestational lead exposure produces sex-specific motor and coordination abnormalities and late-onset obesity in year-old mice. *Environ Health Perspect.* 116(3):355-61, 2008.
- Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect.* 101(7):598-616, 1993.
- Leverett DH. Prevalence of dental fluorosis in fluoridated and in non-fluoridated communities—a preliminary investigation. *J Public Health Dent.* 46(4):184-7, 1986.
- Limeback H. Enamel formation and the effects of fluoride. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 22(3):144-147, 1994.
- Maas RP, Patch SC, Christian AM, Coplan MJ. Effects of fluoridation and water disinfection agent combinations on lead leaching from leaded-brass parts. *Neurotoxicology.* 28:1023-1031, 2007.

Macek M.D., Matte T.D, Sinks T., Malvitz D.M. Blood Lead Concentrations in children and Method of water fluoridation in the United States, 1988-1994. *Environ Health Perspect.* 114(1):130-134, 2006.

Markowitz F, Rosner D. Chapter 4: Old poisons, new problems. In: Deceit and Denial: the deadly politics of industrial pollution. University of California Press Ltd., Berkelyw and Los Angeles, CA. 2002.

Masters RD, Coplan MJ, Hone BT, Dykes JE. Association of silicofluoride treated water with elevated blood lead. *Neurotoxicology.* 21(6):1091-100, 2000.

Masters RD, Coplan MJ. Water fluoridation with silicofluorides and lead toxicity. *Intl J Environ Studies* 56:435-449, 1999.

Mellor JW. *Modern Inorganic Chemistry*, Longmans, Green & Co., London-1919, 1967.

Mendelsohn AL, Dreyer BP, Fierman AH, Rosen CM, Legano LA, Kruger HA. Low-level lead exposure and behavior in early childhood. *Pediatrics.* 101:E1-10, 1998.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico. *Ed. do Ministério da Saúde.* p.44. 2006.

Moffitt JF. Painters born under Saturn: The Physiological Explanation. *Art History.* 11:195, 1998.

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

Muntner P, Vupputyuri S, Coresh J, Batuman V. Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. *Kidney Int.* 63:104-50, 2003.

Needleman H. Standing up to the lead industry: an interview with Herbert Needleman. Interview by David Rosner and Gerald Markowitz. *Public Health Rep.* 120(3):330-337, 2005.

- Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. *Annu Rev Public Health*. 12:111-40, 1991.
- Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barret P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med*. 300(13): 689-95, 1979.
- Needleman HL, McFarland C, Ness RB, Fienberg SE, Tobin MJ. Bone lead levels in adjudicated delinquents. A case control study. *Neurotoxicol Teratol*. 24(6):711-7, 2002.
- Needleman HL, Riess JA, Tobin MJ, Biesecker GE, Greenhouse JB. Bone lead levels and delinquent behavior. *JAMA*. 275(5): 363-9, 1996.
- Needleman HL, Schell, A, Bellinger D, Leviton A, Allred EN. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N Engl J Med*. 322:83– 88, 1990.
- Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature*. 235:111– 112, 1972.
- Nevin R. Understanding international crime trends: The legacy of preschool lead exposure. *Environ Res*. 104:315-336, 2007.
- Nriagu O. Lead Poisoning in Antiquity. *Environ Sci and Technol*. ed Robert L. Metcalf and Werner Stumm (New York: John Wiley & Sons), 1983.
- O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. *Toxicol Appl Pharmacol*. 131(2):297-308, 1995.
- Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res*. 67:1488-92, 1988
- Palmer CD, Lewis ME, Geraghty CM, Barbosa F, Parsons PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of 519 environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma- mass 520 spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta*. 61:980– 990, 2006.

- Paoliello, MMB, De Capitani, EM. Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Rev Environ Contam Toxicol.* 184:59-96, 2005.
- Patterson CC. Contaminated and natural lead environments of man. *Arch Environ Health* 11:344-359, 1965.
- Pendrys DG. Risk of enamel fluorosis in nonfluoridated and optimally fluoridated populations: considerations for the dental professional. *J Am Dent Assoc.* 131(6):746-55, 2000.
- Pereira AC, Da Cunha FL, Meneghim Mde C, Werner CW. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. *ASDC J Dent Child.* 67(2):132-5. 2000.
- Projeto Portinari. <http://www.portinari.org.br/ppsite/ppacervo/cronobio.pdf>. Acessado em 22/07/2009.
- Porto IM, Merzel J, de Sousa FB, Bachmann L, Cury JA, Line SR, Gerlach RF. Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. *Arch Oral Biol.* 54(4):313-21, 2009.
- Rabinowitz M B. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect.* 91:33-37, 1990.
- Rabinowitz MB, Leviton A, Bellinger D. Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: models of tooth lead kinetics. *Calcif Tissue Int.* 53:338, 1993.
- Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 58(2):260-70, 1976
- Richards A, Kragstrup J, Josephsen K, Fejerskov O. Dental fluorosis developed in post-secretory enamel. *J Dent Res.* 65(12):1406-9, 1986.
- Rothenberg SJ, Poblano A, Schnaas L. Brainstem auditory evoked response at five years and prenatal and post-natal blood lead. *Neurotoxicol Teratol.* 22:530-510, 2000.

Sanín LH, Cossío TG, Romieu I, Avila MH. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Pública de México*. 40(4): 359-368, 1998.

Saryan LA, Zenz C. Lead and its compounds, pp.506-541. In C Zenz, OB Dickerson & EP Horvath (eds.). *Occupational medicine*. Ed. Mosby-Year Book, EUA, 1994.

Schroeder HA, Tipton IH. The human body burden of lead. *Arch Environ Health*. 17(6): 965-78. 1968.

Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 42(10):863-81, 2003.

Schwartz J, Pitcher H. The relationship between gasoline lead and blood lead in the United States. *Journal of Official Statistics* 5(4). In: Davis D. 2002. When smoke ran like water. Ed. Basic Books, New York, 1989.

Seow WK. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. *J Dent Child*. 58: 441-52, 1991.

Shen XM, Yan CH, Guo D, Wu SM, Li RQ, Huang H, Ao LM, Zhou JD, Hong ZY, Xu JD, Jin XM, Tang JM. Low-level prenatal lead exposure and neurobehavioral development of children in the first year of life: a prospective study in Shanghai. *Environ Res*. 79(1):1-8, 1998.

Shulman JD, Wells LM. Acute fluoride toxicity from ingesting home-use dental products in children, birth to 6 years of age. *J Public Health Dent*. 57(3):150-8, 1997.

Simons T. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J Physiol*. 378:267-86, 1986.

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

Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Env Health Perspect*. 104(1):60-6, 1996.

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

Stewart DJ. Teeth as indicators of exposure of children to lead. *Arch Dis Child*. 49(11): 895-7, 1974.

Tabari ED, Ellwood R, Rugg-Gunn AJ, Evans DJ, Davies RM. Dental fluorosis in permanent incisors teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. *Brit Dent J*. 189(4):216-20, 2000.

Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological changes. *Commun Dent Oral Epidemiol*. 6:329-337, 1978.

Tjäderhane L, Hietala EL, Larmas M. Mineral element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalyzer combined with back-scattered electron image. *J Dent Res*. 74(11):1770-4, 1995.

Tsutsui A, Yagi M, Horowitz AM. The prevalence of dental caries and fluorosis in Japanese communities with up to 1.4 ppm of naturally occurring fluoride. *J Public Health Dent*. 60(3):147-53, 2000.

U. S. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing Lead Poisoning in Young Children. Atlanta, GA: (CDC). 1991.

U. S. Centers for Disease Control. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA: (CDC). Available from URL: <http://www.cdc.gov/exposureReport/pdf/thirdreport.pdf>. 2005.

USGS United States geological Survey. Minerals information. Mineral commodity summaries. lead. Disponível em <http://mineral.usgs.gov/mineral/pubs/ms>. 131(7):887-99, 2001.

Waldron T, Wells C. Exposure to lead in ancient populations. *Trans Stud Coll Physicians Phila*. 1(2):102-15, 1979.

Warren C. Brush with Death: a social history of lead poisoning. 1st ed. The Johns Hopkins Paperbacks. 2000.

Warren JJ, Levy SM. A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. *Pediatric Dentistry*. 21:265-271, 1999.

- Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 16(2):1-153, 1996.
- Whitford, GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res.* 69:539-49, 1990.
- Whitford, GM, Birdsong-Whitford NL, Finidori C. Acute oral toxicity of sodium fluoride and monofluorophosphate separately or in combination in rats. *Caries Res.* 24(2):121-6, 1990.
- WHO World Health Organization. Environmental health criteria 165- inorganic lead. Geneva, 1995 300p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment Program, the International Labour Organization, and the World Health Organization, 1995.
- Wright JP, Diedrich KN, Ris MD, Hornung RW, Wessel SD, Lanphear BP, Ho Mona, Rae MN. Association of prenatal and childhood blood lead concentration with criminal arrests in early adulthood. *PloS Med.* 5(5):732-740, 2008.
- Wright RO, Hu H, Maher TJ, Amarasiriwardena C, Chaiyakul P, Woolf AD, Shannon MW. Effect of iron deficiency anemia on lead distribution after intravenous dosing in rats. *Toxicol Ind Health.* 14(4):547-51, 1998.
- Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am J Public Health.* 89(7): 1049-53, 1999.
- Wright RO, Tsaih SW, Schwartz J, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr.* 142(1):9-14, 2003
- Xie Y, Chiba M, Shinohara A, Watanabe H, Inaba Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Industrial Health* 36:234-239, 1998.
- Ziegler EE, Edwards BB, Jensen RL, Mahaffey KR, Fomon SJ. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res.* 12(1):29-34, 1978.

ANEXO



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

CERTIFICADO

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

Ribeirão Preto, 13 de agosto de 2007


Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos


Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Ribeirão Preto, ___/___/___

Rosângela Moraes Marques Sawan
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)