

# Neželjeni učinak fluora – dentalna fluoroza

## Side Effect of the Fluoride – Dental Fluorosis

Ileana Linčir  
Kata Rošin-Grget

Katedra za farmakologiju  
Stomatološkog fakulteta  
u Zagrebu

### Sažetak

*Prisutnost fluora u tkivnim tekućinama za vrijeme razvoja zuba kroz dulji vremenski period dovodi do neželjenog učinka fluora – dentalne fluoroze.*

*Fluoroza klinički karakterizira povećana poroznost dijelova cakline na homolognim zubima. Porozni dijelovi izgledaju mutno-bijeli. Težina i distribucija fluoroznih promjena ovise o koncentraciji fluorida, duljini izlaganja, stadiju amelogeneze koji je bio pod utjecajem fluora i individualnim varijacijama. Postoji nekoliko faktora koji mogu povećati osjetljivost zubi u razvoju na nuspojave fluora: patofiziološki faktori (poremećaji acidobazne ravnoteže, bolesti koje utječu na potrošnju vode, malnutricija), faktori okoline (temperatura zraka, život na višoj nadmorskoj visini).*

*Ključne riječi: neželjeni učinci fluora, dentalna fluoroza.*

Acta Stomatologica Croatica  
1992; 26: 47–53

PREGLEDNI RAD

Primljeno: 18. prosinca 1991.

### Uvod

Svaki lijek može uz svoj koristan terapijski ili preventivni učinak razviti i neželjene učinke – nuspojave (1). Svjetska zdravstvena organizacija definira nuspojavu kao svaku štetnu reakciju na lijek koji je dan u uobičajenoj dozi. Fluor, kojim se vrlo rašireno koristi u zaštiti zubi od karijesa, također može izazvati nuspojave koje mogu biti i u obliku dentalne fluoroze (2).

Svako korištenje fluorida, bilo sustavno ili topikalno, u prevenciji karijesa rezultira gutanjem fluorida. Progutani fluoridi se resorbiraju, tj. ulaze u krvnu struju i mogu utjecati na mineralizaciju zubi. Do godine 1970. prevladavalo je mišljenje da se maksimalna redukcija karijesa može postići sustavnim unosom fluorida (najčešće vodom za piće) (3), a dentalna fluoroza smatrala se neizbježnom nuspojavom, posljedicom toksičnog učinka endogenih fluorida na sekretnu fazu pri formiranju zubne cakline.

Posljednjih dvadesetak godina porastao je broj načina kojima se fluoridi mogu unijeti u organizam, od zubnih pasta i preparata za topikalnu fluoridaciju (4, 5, 6) do fluoridnih dodataka napicima u nekim zemljama ili dječjoj hrani (7). Istovremeno je porasla i učestalost dentalne fluoroze i u područjima gdje voda sadrži vrlo male količine fluorida (8, 9). To je povećalo interes za proučavanje mehanizma nastanka dentalne fluoroze, utvrđivanje odnosa doza/odgovor, faktora koji mogu utjecati na pojavu fluoroze i načina klasifikacije promjena koje nastaju pri dentalnoj fluorozi.

Pregled tih novih spoznaja prikazan je u ovom radu.

### Histopatološka i klinička slika

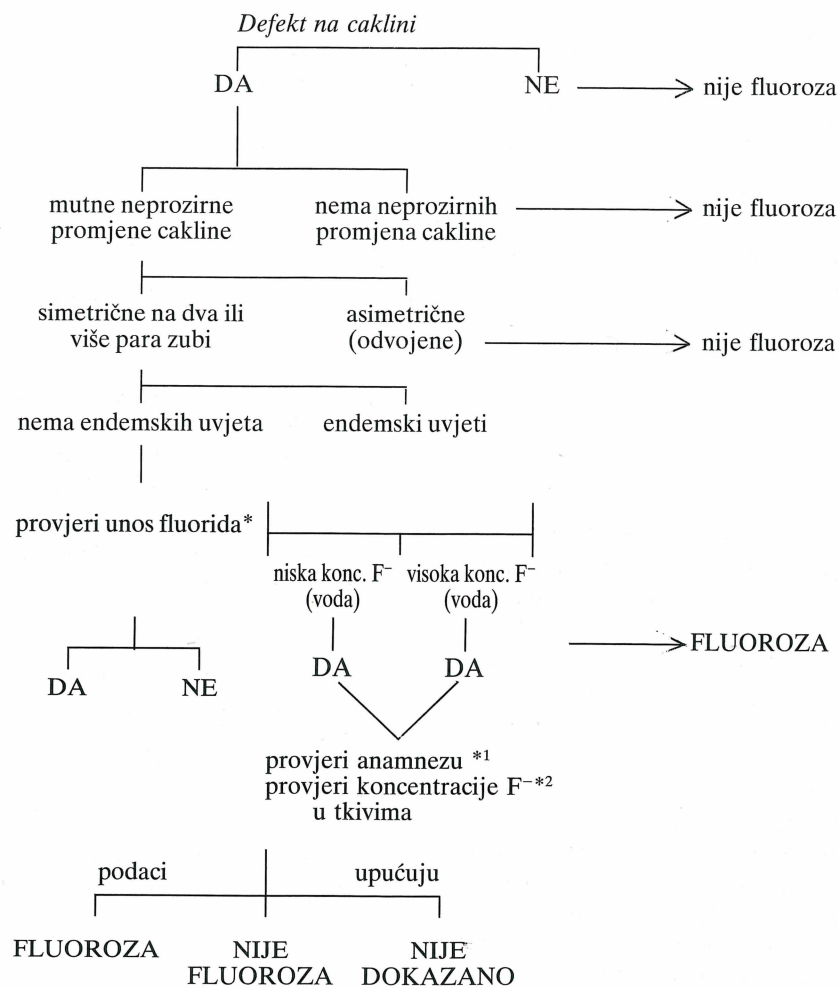
Dentalna fluoroza je karakteristična promjena zubne cakline koju opisuju kao šarena ili pjegava caklina (mottled enamel). Te promjene

cakline specifične su za fluorozu i zasad nije identificiran nijedan drugi čimbenik koji bi mogao izazvati promjene *identične* onima koje izaziva fluor. Vrlo rijetko slične promjene cakline mogu izazvati neki drugi faktori (10).

Cutress i Suckling (11) definirali su dentalnu fluorozu kao razvojne defekte cakline izazvane fluorom. Klinički ih karakteriziraju bijela mutna područja cakline u vidu pruga različite širine koje se javljaju na homolognim zubima. U najtežem obliku čitavi zubi budu mutni i bijeli kao kreda. Mutna područja cakline su porozna (hipomineralizirana). Stupanj i jačina poroznosti

ovise o koncentraciji fluorida u tkivnim tekućinama za vrijeme razvoja zuba. U takvoj caklini strukturalni raspored kristala izgleda normalan, ali širina interkristalnih prostora je veća i tako nastaju pore. Na fotografijama cakline pod elektronskim mikroskopom (12) vidi se da lučne pukotine, koje okružuju caklinske prizme, postaju šire od onih pri normalnom razvoju cakline (13, 14). Kasnije, nakon nicanja, na tim se zubima mogu javiti udubljenja (jamice) i obojenja. Udubine koje se mogu naći u težim slučajevima dentalne fluoroze rezultat su posteruptiv-

Slika 1. Slijed postupaka u diferencijalnoj dijagnozi dentalne fluoroze  
Figure 1. The order of procedures in the differential diagnosis of dental fluorosis



\* korištenje velikih količina fluoridnih tableta, spojeva za topikalnu fluoridaciju i zubnih pasta s fluoridima

\*1 prehrana, neishranjenost, sustavna oboljenja, genetski faktori, faktori okoline

\*2 urin, kosa, nokti, caklina prema Cutress & Suckling, 1990 (11)

nog pucanja površinske cakline. Dobro mineralizirana površina vrlo se lako lomi pri mehaničkim udarima, jer se pod njom nalaze hipomineralizirane lezije.

### Mehanizam nastanka dentalne fluoroze

Dosadašnjim brojnim istraživanjima djelomično se istražio mehanizam nastanka dentalne fluoroze, iako još postoje mnoge nejasnoće. Fejerskov (15) je pretpostavio da hipomineralizirana područja u fluoroznoj caklini mogu biti posljedica zaustavljanja maturacije cakline. U toku normalnog razvoja cakline rast kristala u unutrašnjem sloju cakline zbiva se nakon postepenog uklanjanja proteina, dok u izvanjskom sloju cakline još traje sekrecija. U vrijeme kada prestane sekrecija caklinskog matriksa, sadržaj minerala u caklini bit će najveći na spoju caklina/dentin a smanjivat će se prema površini. U tom stadiju izvanjska caklina fluoroznih zubi jako je hipomineralizirana (u usporedbi s normalno zreloom caklinom) osim vrlo tankog površinskog sloja cakline koji i u tom stadiju sadrži više minerala od ostalih potpovršinskih dijelova cakline. Od tog vremena do nicanja zubi trebaju se ukloniti amelogenini i voda kako bi se omogućio rast kristala i potpuna mineralizacija cakline (zrelost cakline). Eastoe i Fejerskov su našli da caklina fluoroznih zubi ima, u usporedbi s normalnom zubnom caklinom, sličan sadržaj ukupnih proteina, međutim, fluorozna caklina sadržava relativno veću količinu nezrelih proteina matriksa (16). Na koji način fluoridi mogu interferirati s kompleksnim procesima formiranja i maturacije cakline teško je objasniti proučavanjima na čovjeku. Na osnovi pokusa na eksperimentalnim životinjama pretpostavlja se da fluoridi zahvaćaju zrenje ameloblasta utječući na njihovu sposobnost uklanjanja proteina i vode iz cakline u fazi maturacije i/ili interferiraju sa sposobnošću ameloblasta da proizvode proteolitičke enzime neophodne za razgradnju amelogenina (17).

Patterson (18) je našao da se sastav aminokiselina fluorozne cakline razlikuje od onog normalne cakline. Međutim, kako poliakrilamidom gel elektroforezom Denbesten (19) nije našao razlike u sastavu aminokiselina, može se zaključiti da dolazi do promjena relativnih količina amelogenina i enamelina. U pokusima separacije proteaza fluorozne cakline u fazi sekrecije i fazi maturacije nađena je reducirana pro-

teolitička aktivnost proteaza molekularne težine između 28.000 i 33.000 u fluoroznoj caklini. Autori su zaključili da fluoridi na neki način reduciraju enzimatsku aktivnost u fazi maturacije tako da je razgradnja amelogenina u matriksu djelomično inhibirana (20).

U nastojanjima da se objasni uloga fluorida u nastanku dentalne fluoroze postavljeno je još nekoliko hipoteza. Robinson i sur. (21) smatraju da se distribucija fluorida odnosno različite koncentracije F u sekretornoj fazi i fazi maturacije može objasniti i distribucijom vode u tkivu. U otopini može biti znatniji dio fluora prisutan u obliku slobodnih iona nego vezan za minerale ili matriks. Na osnovi toga postavljena je hipoteza da bi trajanje hidriranog stadija moglo određivati duljinu izlaganja cakline i stanica ionima fluora iz tkivne tekućine.

Neki autori su smatrali da flourom izazvani poremećaji u metabolizmu kalcija mogu na neki način biti odgovorni za hipomineralizirane lezije fluorozne cakline, jer se zna da velike akutne doze fluorida mogu izazvati znatnu redukciju kalcija u plazmi. Ali u pokusima na štakorima povećani nivo fluora u plazmi, koji je doveo do razvoja dentalne fluoroze, nije bio praćen i reduciranim nivoom kalcija (22).

Postojale su i pretpostavke da fluoridi mogu izazvati povećanu produkciju hormona (paratiroidnog hormona i metabolita vitamina D) koji reguliraju nivo kalcija u plazmi i tako utječu na mineralizirana tkiva. Međutim, u strogo kontroliranom pokusu Andersena i sur. (23) to nije potvrđeno, već je zaključeno da poremećaj u homeostazi kalcija nije neophodan za razvoj dentalne fluoroze. Richards (24) smatra da tu hipotezu treba napustiti.

### Faktori koji utječu na pojavu dentalne fluoroze

Pojava i intenzitet dentalne fluoroze jako variraju među članovima jedne populacije. Posljednjih godina se smatra da je pojava dentalne fluoroze u Sjevernoj Americi i Europi u laganom porastu (25, 26). To se povezuje s povećanim provođenjem raznih oblika fluoridacije. Velik dio populacije u Sjevernoj Americi pije fluoriranu vodu. Uz to se primjenjuju različiti topikalni i sustavni oblici fluoridacije. U isto vrijeme povećava se broj izvještaja iz zemalja u kojima se ne provodi organizirano profilaktički program fluoridacije o porastu dentalne fluoroze i u područjima s niskom razinom fluora u vodi i hrani (27, 28, 29). Za sada još nije utvrđeno

da li određeni genetski ili drugi biološki faktori mogu povećati osjetljivost zubi u razvoju na nuspojave fluorida. Poznato je da postoji nekoliko faktora koji zbog sposobnosti da ubrzaju povećanje koncentracije fluorida u tjelesnim tekućinama mogu utjecati na pojavu i jačinu dentalne fluoroze kod članova jedne populacije (30).

## Faktori okoline

### 1.1. Temperatura zraka

Temperatura zraka utječe na pojavu i jačinu dentalne fluoroze, kao posljedica varijacije u dnevnoj potrošnji vode. Godine 1957. Galan i Vermilion (31) su postavili jednadžbu za izračunavanje potrošnje vode kao funkciju temperature, tako da je moguće izračunati količinu fluorida koja se vodom unese u tijelo, iako to nije pouzdan način. Naime, razina fluorida u vodi malo kada je stabilna. Larsen (32) je pokazao da mogu postojati značajne varijacije u koncentracijama fluorida u vodi, čak i kod umjetno fluorirane vode, što otežava izračunavanje unosa fluorida. Osim toga, danas u razvijenim zemljama većina ljudi boravi u klimatiziranim prostorima, tako da se temperature kojima su ljudi izloženi, a time i potrošnja vode, razlikuju od onih prije 30 godina kada je postavljena jednadžba. Zatim pijenje vode, koja je prije bila glavni izvor fluora, u mnogim je područjima posljednjih godina reducirano jer je porasla potrošnja gotovih napitaka koji mogu, ali ne moraju, biti dodatno fluorirani. Tako danas fluoridi iz vode čine manji dio dnevno unesenih fluorida. Veći dio unosi se korištenjem ostalih pića kao i gutanjem fluorida koji se upotrebljavaju u topikalnim ili endogenim fluoridacijama.

### 1.2. Nadmorska visina

Posljednjih godina život na višoj nadmorskoj visini dovodi se u vezu s pojavom dentalne fluoroze, čak ako i nema povećanog unosa fluorida (33). U pokusima na štakorima, kojima je simulirana nadmorska visina od 5.490 m (smještajem u komorice s tlakom zraka od 380 mm Hg kroz 6 tjedana), nađene su i do 60% više koncentracije fluorida u kostima, plazmi i mekim tkivima u odnosu na životinje koje su u pokusu bile na razini mora (34). Caklina inciziva, koji kontinuirano rastu kod štakora, pokazivala je izrazite poremećaje u mineralizaciji sa znakovima jake dentalne fluoroze. Zaključeno je da boravak na višoj nadmorskoj visini dovodi

do stanovitih fizioloških promjena zbog kojih se pojačava učinak fluorida na mineralizirana tkiva. Te promjene mogu biti posljedica same hipoksije na velikoj visini ili fizioloških učinaka njome izazvanih, poput promjena u rastu i razvoju, hormonalnoj ravnoteži, acidobaznom statusu, hematokritu, hemodinamici i funkciji kardiovaskularnog sustava i bubrega. Biološko značenje te pojave je intrigantno i zahtijeva daljnja ispitivanja.

## Patofiziološki faktori

### 2.1. Poremećaji acidobazne ravnoteže

Jedan od patofizioloških faktora koji može dovesti do dentalne fluoroze jest poremećaj acidobazne ravnoteže. Nekoliko studija na laboratorijskim životinjama i ljudima pokazalo je da relativno mali poremećaji acidobazne ravnoteže (bilo metabolički bilo respiratorni) prate i znatne promjene u metabolizmu fluorida. Glavni su učinci na bubrezima. Na renalno izlučivanje fluorida utječe pH urina: alkalozna povećava, a acidoza smanjuje renalni klirens fluorida. Uporedo s time povećava se koncentracija fluora u mekim i tvrdim tkivima kod acidoze, a smanjuje pri alkalozii. Whitford i Reynolds (35) našli su da je razina fluora u caklini i plazmi kronično acidoznih štakora gotovo dvostruko veća od one kod štakora s alkalozom.

Na acidobazni status može utjecati nekoliko čimbenika: hrana, neki lijekovi, metaboličke ili respiratorne bolesti, nadmorska visina na kojoj se živi, te tjelesna aktivnost. Hrana s mnogo proteina, zatim neke redukcijske dijetete mogu izazivati umjerenu do tešku acidozu, dok vegetarijanska hrana dovodi do lučenja alkalnog urina, što može utjecati na metabolizam fluorida.

Angmar-Mansson i Whitford (36) našli su u pokusima na štakorima da je odnos fluorida cakline i prosječnog dnevnog unosa fluora tri puta veći kod acidozne grupe životinja nego kod alkalozne grupe. Caklina inciziva pokazuje da su acidozni štakori imali teške poremećaje u mineralizaciji (hipomineralizirani slojevi cakline, površinski defekti), bez obzira na to jesu li dodatno primali fluoride ili ne. Defekti su slični onima koje izazivaju fluoridi. Uz dodatak fluorida, caklina acidozne grupe pokazuje izraženu fluorozu. Životinje s alkalozom pokazivale su minimalne promjene u mineralizaciji cakline.

U literaturi ima malo podataka o utjecaju acidobaznih poremećaja na kalcificirana tkiva u razvoju, uključujući i zube. Poznato je međutim da je brzina resorpcije kosti povećana za vrijeme acidoze (37,38), kao i da acidoza (u pokusima na pilićima) mijenja sintezu i razgradnju vitamina D (39). Glassman (40) je opisao da je izlučivanje kalcija i fosfata urinom povećano u acidozi, što pokazuje da kronična acidoza stvara uvjete za »pražnjenje« kosti. Da li se isto događa sa caklinom i dentinom, treba utvrditi.

## 2.2. Malnutricija

Neishranjenost se također smatra direktnim ili indirektnim mogućim uzrokom dentalne fluoroze (41).

## 2.3. Oboljenja koja utječu na potrošnju vode

Osim klimatskih faktora na potrošnju vode, a time i unos fluorida u organizam, mogu utjecati i neka oboljenja koja povećavaju pijenje vode. To može biti primarni dijabetes insipidus s nedovoljnom sekrecijom ADH ili nefrogeni dijabetes insipidus kod kojega receptori u bubrezima ne reagiraju s hormonom koji se luči u dovoljnoj količini. Dijabetes melitus može također dovesti do glikozurije i osmotske dijureze koja rezultira povećanim pijenjem, kao i bubrežna oboljenja koja prati povećana dijureza i time povećani unos tekućine u organizam, poput akutnih glomerulonefritisa, pijelonefritisa i nefrotičnog sindroma.

## Diferencijalna dijagnoza dentalne fluoroze

Brojni su autori opisali dentalnu fluorozu (42,43). Točnost u postavljanju dijagnoze fluoroze raste s brojnošću i težinom defekata na caklini. Problem u dijagnozi predstavljaju blaže promjene koje je još 1934. Dean (44) klasificirao u grupu »sumnjivih fluoroza«, smatrajući da je granica između dnevno unesenih količina fluorida koji ne izazivaju promjene na zubima i onih koji ih izazivaju, vrlo uska. Danas je kriterij za postavljanje dijagnoze fluoroze simetričnost u pojavi promjena na caklini i utvrđen povećani unos fluorida u organizam.

Prema Cutress i Sucklingu (11) fluorozom se smatraju svi simetrični dobro uočljivi mutni dijelovi cakline koji se javljaju na 2 ili više para zubiju, a koje prati i povećani unos fluorida ili neki od faktora koji uz suboptimalni unos fluo-

rida može dovesti od fluoroze. Slijed postupaka za postavljanje dijagnoze dentalne fluoroze prikazan je na slici 1.

Diferencijalno dijagnostički treba razlikovati ostale mutne mrlje na caklini, koje nisu uzrokovane fluoridima, a mogu zbunjivati. Obično se javljaju u vidu diskretnih, ograničenih, bijelih ili obojenih mrlja. Najčešće zahvaćaju pojedine zube, rjeđe veći broj zubi simetrično distribuiranih. Široka lepeza genetskih (45), sustavnih ili lokalnih uzroka u toku razvoja može biti uzrokom tih promjena (46). Problem pri dijagnosticiranju mogu praviti i tzv. »idiopatske fluoroze«. To su promjene karakteristične za dentalnu fluorozu kod osoba kojima se anamnestički ne može utvrditi unos većih količina fluorida (47). Etiološki se takve promjene vezuju za »idiopatska« oboljenja, druge elemente u tragovima (npr. stroncij) (48) ili malnutriciju.

## Klasifikacija dentalne fluoroze

Pri procjeni pojave i težine dentalne fluoroze kod pojedinaca ili unutar jedne populacije potrebno je precizno klasificirati nađene promjene. Prvi način klasifikacije dentalne fluoroze uveo je još Dean godine 1934. (44), tzv. Dean's Community index of dental fluorosis (FCI). Taj način se s modifikacijama i danas primjenjuje kod jače izraženih promjena na caklini. Kod blagih promjena, koje Dean svrstava u grupu tzv. »sumnjivih« (questionable) fluoroza, taj način se nije pokazao zadovoljavajućim, vjerovatno stoga što Dean nije vršio prethodno čišćenje zubi i skidanje plaka prije očitavanja promjena. Kasnije je napravljena nova klasifikacija, tzv. TF indeks (prema autorima Thylstrup i Fejerskov) (49), koja zahtijeva prethodno pažljivo brisanje zubi kuglicom vate i sušenje komprimiranim zrakom, nakon čega je moguće očitati i neznatne »sumnjive« promjene na caklini. Fejerskov (16) smatra da je TF indeks precizniji i da omogućuje prikaz korelacije između širokog spektra promjena na caklini i koncentracije fluora u caklini. Fejerskov je odredio (15) i odnos doza / odgovor i utvrdio da je veza između fluora koji uđe u organizam i promjena na caklini koje on izaziva takav, da i vrlo mali unosi fluorida (npr. vodom) izazivaju stanovite znakove fluoroze, te da je odnos doza / odgovor linearan. Daljnji napredak u klasifikaciji fluoroze jest uvođenje FRI indeksa (fluorosis risk index) (50). FRI indeks dijeli površinu cakline trajnih zubi i dvije razvojne grupe prema dobi u

kojoj su ti dijelovi cakline formirani i mineralizirani, i na njima određuje stupanj fluoroznih promjena. Kako povećani unos fluorida, osim fluora u vodi za piće, najčešće nije kontinuiran,

korištenjem FRI indeksa u epidemiološkim studijama moguće je utvrditi vezu između dobi u kojoj je osoba izlagana fluoridima i razvoja dentalne fluoroze.

## SIDE EFFECT OF THE FLUORIDE – DENTAL FLUOROSIS

### Summary

*Dental fluorosis is a side effect of the fluoride present in tissue fluid over a prolonged period during tooth development (the secretory and/or maturation phases of amelogenesis).*

*Fluorosis is clinically characterised by an increasing porosity of the surface enamel causing the white opacities affecting homologous teeth. The severity and distribution of fluorosis depend on the fluoride concentration, duration of exposure to fluoride, the stage of ameloblasts activity and individual variation in susceptibility. There are several factors which may account for individual differences: patho-physiological factors (disorders in acid-base balance, malnutrition, diseases which promote the consumption of in unusually large amounts of water) and environmental factors (temperature and residence at high altitude).*

Key words: fluoride side effect, dental fluorosis

Adresa za korespondenciju:  
Address for correspondence:

Ileana Linčir  
Katedra za farmakologiju  
Šalata 11  
41000 Zagreb  
Hrvatska

### Literatura

1. LAURENCE D R, BENNETT P N. Klinička farmakologija. Urednik: VRHOVAC B. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada, 1988.
2. LINČIR I, ROŠIN-GRGET K. Topikalna fluoridacija – mogući nepoželjni učinci. Acta Stomatol Croat 1984; 23:75-84.
3. BROWN W E, KONIG K. Cariostatic mechanisms of fluorides. Caries Res 1977; 11:Supplement.
4. LECOMPTE E J. Clinical application of topical fluoride products – Risks, benefits and recommendations. J Dent Res 1987; 66:1066-1071.
5. WHITFORD G M. Fluoride in dental products. Safety consideration. J. Dent Res 1987; 66:1056-1060.
6. MELLBERG J R. Fluoride dentifrices: current status and prospects. Intern Dent J. 1991; 41:9-16.
7. ERICSSON Y, HOFVANDER Y, HELLSTROM I. Pilot studies on the fluoride metabolism in infants on different feedings. Acta Paediat Scand 1972; 61:459-464.
8. GROBLER S R, VAN WYK C W, KOTZE D. Relationship between enamel fluoride levels, degree of fluorosis and caries experience in communities with a nearly optimal and a high fluoride level in the drinking water. Caries Res 1988; 20:284-288.
9. BROUWER J D, BACKER DIRKS O, DE BRUIN A, HAUTWAST JGAJ. Unsuitability of World Health Organization guidelines for fluoride concentrations in drinking water in Senegal. Lancet 1988; 1:223-225.
10. SMALL B W, MURRAY J J. Enamel opacities: prevalence, classifications and aetiological considerations. J. dent 1978; 6:33-42.
11. CUTRESS T W, SUCKLING G W. Differential diagnosis of dental fluorosis. J. Dent Res 1990; 69 (Spec. Iss): 714-720.
12. SUNDSTROM B, JONGEBLOED W L, ARENDS J. Fluorosed human enamel. Caries Res 1978; 12: 329-338.
13. FEJERSKOV O, JOHNSON N W, SILVERSTONE L M. The ultrastructure of fluorosed human dental enamel. Scand J Dent Res 1974; 82:357-372.
14. FEJERSKOV O, THYLSTRUP A. Dental enamel. Iz MJÓR J A, FEJERSKOV O: Human oral embryology and histology. Copenhagen: Munksgaard, 1987; 50-89.

15. FEJERSKOV O, MANJI F, BAELUM V. The nature and mechanisms of dental fluorosis in man. *J. Dent Res* 1990; 69:692-700.
16. EASTOE J, FEJERSKOV O. Composition of mature enamel proteins from fluorosed teeth. U: FEARNHEAD R W, SUGA S. Tooth enamel IV. Amsterdam: Elsevier, 1984; 326-330.
17. FEJERSKOV O, JOSEPHSEN K, LARSEN M J, THYLSTRUP A. Cytological features of rat ameloblasts following long-term fluoride exposure. *Caries Res* 1979; 14:181-182.
18. PATTERSON C M, BASFORD K E, KRUGER B S. The effect of fluoride on the immature enamel matrix protein of the rat. *Arch Oral Biol* 1976; 21:131-132.
19. DENBESTEN P K. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986; 65:1272-1277.
20. DENBESTEN P K, HEFFERNAN L M. Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases present in rat and bovine secretory enamel. *Arch Oral Biol* 1989; 34:399-404.
21. RONINSON C, KIRKHAN J, HALLSWORTH A S. Volume distribution and concentration of protein, mineral and water in developing bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1988; 33:159-162.
22. ANGMAR-MÅNSSON B, WHITFORD G M. Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. *Caries Res* 1984; 18:25-32.
23. ANDERSEN L, RICHARDS A, CARE A D, KERZEL ANDERSEN H M, KRAGSTRUP J, FEJERSKOV O. Parathyroid glands, Calcium and vitamin D in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 1986; 38:222-226.
24. RICHARDS A. Nature and mechanisms of dental fluorosis in animals. *J Dent Res* 1990; 69:701-705.
25. SZPUNAR S M, BURT B A. Trends in the prevalence of dental fluorosis in the United States: A Review. *J Publ Health Dent* 1987; 47:71-79.
26. LEVERETT D B. Prevalence of dental fluorosis in fluoridated and nonfluoridated Communities - a Preliminary investigation. *J Publ Health Dent* 1986; 46:184-187.  
GLASS R L. Kuwait national dental health survey, I. Forsyth Dental Centar, Boston: 1984.
28. MANJI F, BAELUM V, FEJERSKOV O, GEMERT W. Enamel changes in two low fluoride areas of Kenya. *Caries Res* 1986; 20:371-380.
29. SUBBAREDDY V V, TEWARI A. Enamel mottling at different levels of fluoride in drinking water in an endemic area. *J Indian Dent Assoc* 1985; 57:205-212.
30. ANGMAR-MÅNSSON B, WHITFORD G M. Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. *J Dent Res* 1990; 69:706-713.
31. GALAGAN D J, VERMILLION J R. Determining the optimum fluoride concentrations. *Publ Hlth Rep Wash* 1957; 72:491-493.
32. LARSEN M J, SENDERVITZ F, KIRKEGAARD E, POULSEN S, FEJERSKOV O. Dental fluorosis in the primary and the permanent dentition in fluoride areas with consumption of either powdered milk or natural cow's milk. *J Dent Res* 1988; 67:822-825.
33. MANJI F, BAELUM V, FEJERSKOV O. Fluoride, altitude and dental fluorosis. *Caries Res* 1986; 20:473-480.
34. WHITFORD G M, ALLISON N B, DEVINE J A, MAHLER J T, ANGMAR-MÅNSSON B. Fluoride metabolism at stimulated altitude. *J Dent Res* 1983; 62:262, abs. N°840.
35. WHITFORD G M, REYNOLDS K E, PASHLEY D H. Acute fluoride toxicity: The influence of metabolic alkalosis. *Tox Appl Pharmacol* 1979; 50:31-39.
36. ANGMAR-MÅNSSON B, WHITFORD G M. Effects of acid-base status and fluoride on developing rat enamel. *J Dent Res* 1986; 65:768, Abst. N°383.
37. BARZEL V S, JOWSEY J. The effect of chronic acid and alkali administration on bone turnover in adult rats. *Clin Sci* 1969; 36:517-524.
38. PETITO S, EVANS J L. Calcium status of the growing rat as affected by diet acidity from ammonium chloride, phosphate and protein. *J Nutr* 1984; 114:1049-1059.
39. BARAN D T, LES S W, JO O D, AVOLI L V. Acquired alterations in vitamin D metabolism in the acidotic state. *Calcif Tissue Int* 1982; 34:165-168.
40. GLASSMAN V P, SAFIRSTEIN R, DI SCALA V A. Effects of metabolic acidosis on proximal tubule ion reabsorption in the dog kidney. *Am J Physiol* 1974; 227:759-765.
41. MASSLER M, SCHOUR I. Relation of endemic dental fluorosis to malnutrition. *J Am Dent Assoc* 1952; 44:156-165.
42. FEJERSKOV O, MANJI F, BAELUM V, MØLLER I J. Dental fluorosis. A handbook for health workers. Copenhagen: Munksgaard, 1988.
43. MYERS H M. Fluorides and dental fluorosis. Basel: Karger, 1978.
44. DEAN H T. Classification of mottled enamel diagnosis. *J Am Dent Assoc* 1934; 21:1421-1426.
45. ŠKRINJARIĆ I. Genetski defekti cakline. *Acta Stom Croat* 1985; 19:57-69.
46. FDI Technical report N° 15: An epidemiological index of developmental defects of dental enamel (DDE Index). *Int Dent J* 1982; 32:159-167.
47. DRISCOLL W S, HOROWITZ H S, MEYERS R J, HEIFETZ S B, KINGMAN A, ZIMMERMAN E R. Prevalence of dental caries and dental fluorosis in areas with optimal and above optimal water fluoride concentrations. *J Am Dent Assoc* 1983; 107:42-47.
48. CURZON MEJ, SPECTOR P C. Enamel mottling in a high strontium area of the USA. *Community Dent Oral Epidemiol* 1977; 5:243-247.
49. THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978; 6:315-328.
50. PENDRYS D G. The fluorosis risk index: a method for investigating risk factors. *J Publ Health Dent* 1990; 50:291-298.