

Luciana Souto Mofatto

Cirurgiã-Dentista

***EFEITO DO FLÚOR SOBRE A MATRIZ ORGÂNICA DO
ESMALTE DENTÁRIO DE CAMUNDONGOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco-Dental – Área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

PIRACICABA
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

M723e

Mofatto, Luciana Souto.

Efeito do flúor sobre a matriz orgânica do esmalte dentário de camundongos. / Luciana Souto Mofatto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Amelogenese. 2. Birrefringência. 3. Microscopia de polarização. 4. Fluoretos. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Fluoride effect in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix of mice

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Amelogenesis. 2. Birefringence. 3. Microscopy, polarization. 4. Fluorides

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Sérgio Roberto Peres Line, Glauce Regina Costa de Almeida, Livia Maria Andaló Tenuta

Data da Defesa: 24-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata LUCIANA SOUTO MOFATTO aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "S. R. Peres Line".

Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Glauce Regina Costa de Almeida".

Profa. Dra. GLAUCE REGINA COSTA DE ALMEIDA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Livia M. A. Tenuta".

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Dedico este trabalho:

Aos animais que deram sua vida para que este trabalho fosse possível de se realizar.

À minha mãe Celia, por estar sempre presente em todos os momentos importantes da minha vida e por ser um exemplo de perseverança.

Ao meu pai Paulo, pelo apoio e incentivo.

Aos meus irmãos Ana Paula, Ana Lucia e Paulo por sempre me incentivarem.

Ao Alexandre, pelo companheirismo, pelo amor e por toda ajuda ao redigir esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line, por me acolher desde a iniciação científica, por sempre me incentivar para seguir carreira acadêmica e por ser referência como pesquisador e professor.

A Prof^a Dr^a Regina Célia Rocha Peres, do Departamento de Odontologia Infantil, pela amizade, compreensão e por também ter me orientado na iniciação científica durante a minha graduação em Odontologia.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), em especial Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, Prof^a Dr^a Ana Paula de Souza Pardo e Prof^a Dr^a Darcy Tosello, pelos ensinamentos e pelo convívio.

Aos Prof^a Dr^a Livia Andaló Tenuta, Prof^a Dr^a Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, José Alfredo da Silva e Waldomiro Vieira Filho, docentes e funcionários do Laboratório de Bioquímica da FOP-UNICAMP, pela atenção dada a mim e pela utilização dos equipamentos necessários para as dosagens de flúor presentes neste trabalho.

A Prof^a Dr^a Fernanda Klein Marcondes, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela atenção a mim dada e pela ajuda com a solicitação e retirada dos animais do CEMIB-UNICAMP.

Aos Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Eliane Melo Franco de Souza, José Carlos Gregório e Paulo César Venâncio, do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela utilização dos equipamentos necessários para o preparo da ração utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela atenção a mim dada e pela utilização dos equipamentos necessários para a análise de absorvência da matriz orgânica do esmalte.

A Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Santiago Varela (Cidinha), Gustavo Narvaes Guimarães e Ivani Demétrio, funcionários dos Laboratórios de Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Histologia do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, por todo apoio técnico, pelo divertido convívio e pela amizade. Sem vocês, este trabalho não poderia ser realizado.

Às secretárias do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Joelma Macchi e Suzete Neder, pela atenção e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos funcionários do Biotério da FOP-UNICAMP, Fábio Vinicius Borges Padilha, Wanderlei Francisco Vieira e Floriza Aparecida Godoy, pelo apoio técnico e pelo convívio.

Ao Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo, docente da Universidade Federal da Bahia, pela amizade e pelas dicas importantes que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, Aline Planello, Mariana Martins, Gláucia de Camargo, Simone Caixeta, Gilcy Damm, Naila Francis, Marcelo Marques, Bruna Lima, Marisi Aidar, Denise Andia, Nádia Fayes, Juliana Neves, Liza Ramenzoni, Carolina de Almeida, Cristiane Salmon, José Gomes, Roberto Wolf e Marcos Frozoni, pelo ótimo convívio e pela amizade inestimável que vocês me proporcionaram.

Aos meus ex-colegas da turma 48 da graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, especialmente Juliana Gaspar, Nádia Sinoti, Mariana Amade, Kelly Pimentel, Luciana Ruiz, Piero Blóes, Priscila Campioni, Matheus Souza, pela amizade, paciência e por terem me incentivado a fazer iniciação científica e prestar a prova de Mestrado.

A Ana Mesquita, do Departamento de Patologia da FOP-UNICAMP, pelo ótimo convívio e troca de experiências vivenciadas no biotério.

À família Dias Marangoni, (José Tadeu, Maria Inês, Adriano, Alexandre) e Glauce Crivelaro Nascimento, pela consideração, pelo convívio, respeito e ótimos momentos que passamos juntos.

A todos da família Souto (minha mãe Celia, minhas irmãs Ana Paula e Ana Lucia, minha avó Maria Flora (i.m.), Angela, Celso (i.m.), Eneide (i.m.), Fernanda, Alberto e Ricardos), por todo respeito, ensinamento, amizade, união e companheirismo. Sem vocês não conseguiria chegar onde estou hoje.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

E a DEUS, por me dar saúde, paciência e entusiasmo para seguir o meu caminho.

*"Se fui capaz de ver mais longe foi apenas porque eu
estava apoiado sobre ombro de gigantes."*

Sir Isaac Newton (1643 - 1727)

RESUMO

A fluorose dentária é caracterizada por manchas no esmalte dentário devido a hipomineralização causada pela ingestão crônica de flúor durante o desenvolvimento dos dentes. O flúor parece interferir diretamente na formação da matriz do esmalte dentário. Estudos demonstraram que a matriz orgânica do esmalte dentário na fase secretória é birrefringente quando analisada em microscopia de luz polarizada, demonstrando que esta matriz possui uma ordenação supramolecular e que alterações genéticas e ambientais que afetam a estrutura do esmalte também afetam a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário. Neste trabalho foi proposto analisar o efeito do flúor na maturação e organização supramolecular da matriz em linhagens de camundongos A/J, CBA e DBA/2 que possuem diferentes suscetibilidades à fluorose e sua associação com níveis sistêmicos de flúor no plasma, nos ossos e na urina. O efeito do flúor na matriz orgânica do esmalte dentário foi estudado através das análises de birrefringência e de absorbância de cortes histológicos corados com Ponceau SS. Noventa e seis camundongos (32 da linhagem A/J, 33 da linhagem CBA e 31 da linhagem DBA/2) foram aleatoriamente divididos em três grupos (0, 11.25 e 45 ppm de flúor adicionados à água de beber) e submetidos a um tratamento de 49 dias. O método do eletrodo específico foi usado para determinar as concentrações de flúor nos ossos, plasma e urina. Foram utilizadas: microscopia de polarização para analisar a birrefringência da matriz orgânica do esmalte e microscopia de luz para determinar a absorbância desta matriz. Como resultado, foi observado menor efeito do flúor na birrefringência no grupo 11.25 ppmF da linhagem A/J. Também nesta linhagem foram notadas maiores alterações de tonalidade no esmalte maduro nos grupos 11.25 e 45 ppmF. Entretanto, as maiores concentrações de flúor nos ossos e no plasma foram encontradas nos animais da linhagem DBA/2 tratados com 11.25 e 45 ppmF. O flúor não causou alteração na quantidade de proteína da matriz do esmalte durante a fase secretória. Conclusão: A linhagem mais suscetível a fluorose

dentária foi a A/J, devido às alterações mais evidentes no esmalte maduro. No entanto, a matriz orgânica do esmalte na fase secretória foi menos afetada nesta linhagem do que nas demais. O flúor promoveu uma alteração na organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário na fase secretória, visto que este composto causou uma diminuição na birrefringência sem ocasionar uma redução significativa na quantidade de proteínas presentes na matriz. A linhagem A/J, mesmo sendo a mais suscetível à fluorose dentária, apresentou menores concentrações plasmática e óssea de flúor.

Palavras-Chave: Amelogênese, birrefringência, microscopia de polarização, fluoreto.

ABSTRACT

Dental fluorosis is characterized by alterations in the aspect of mature enamel due to hypomineralization, it is caused by chronic ingestion of fluoride during tooth development. Fluoride seems to influence on formation of enamel organic matrix. Previous studies have shown that the organic extracellular matrix of the enamel secretory phase is birefringent, evidencing the presence of an ordered supramolecular structure, and that the birefringence can be altered by genetical and environmental factors that also affect mature enamel. The aim of this work was to analyse the effect of fluoride on the matrix maturation and supramolecular organization in A/J, CBA and DBA/2 mice strains and its association to fluoride systemic levels in plasma, bones and urine. There are different patterns of susceptibility to fluorosis among these strains. The effect of fluoride on enamel organic matrix was studied by birefringence and absorbance analysis of Ponceau SS stained sections. Ninety six mice (32 A/J strain, 33 CBA strain and 31 DBA/2 strain) were randomly distributed in three groups (0, 11.25 and 45 ppm of fluoride in drinking water) submitted to a 49-days treatment. Fluoride levels in bones, plasma and urine were determined by F specific electrode. Polarizing microscopy was used to analyse the birefringence of enamel organic matrix and light microscopy was used to determinate the matrix absorbance. As result, 11.25 ppmF group of A/J strain showed least effect of fluoride on birefringence. Colouring alterations were observed in the mature enamel on 11.25 and 45 ppmF groups of A/J strain. However, 11.25 and 45 ppmF groups of DBA/2 strain presented highest levels of fluoride in bones and plasma. Fluoride did not change the protein amount of enamel matrix during secretion stage. Conclusion: A/J strain was the most susceptible to dental fluorosis because it showed more alterations in the mature enamel. However, enamel organic matrix of A/J strain was the least affected during the secretion phase. Fluoride promoted a change in the supramolecular organization of enamel organic matrix during the secretion stage. This compound caused a birefringence decrease without causing a significant reduction on matrix

protein amount. A/J strain, even being the most susceptible to dental fluorosis, showed the lowest levels of fluoride in plasma and bones.

Key Words: Amelogenesis, birefringence, polarizing microscopy, fluoride.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Esmalte Dentário	2
2.2. Amelogênese	2
2.3. Proteínas do Esmalte Dentário	3
2.4. Fluorose Dentária	6
2.5. Efeito da Fluorose no Esmalte Dentário	7
2.6. Birrefringência da Matriz Orgânica Extracelular do Esmalte Dentário	8
3. PROPOSIÇÃO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Projeto experimental	12
4.2. Análise do efeito da fluorose experimental sobre a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte.	13
4.2.1. Análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz polarizada.	13
4.2.2. Análise da absorbância da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz.	13
4.3. Dosagens de flúor.....	14
4.3.1. Concentração de flúor no plasma.....	14
4.3.2. Concentração de flúor na urina	14
4.3.3. Concentração de flúor nos ossos.....	15
4.4. Observação clínica da fluorose.....	15
4.5. Análises Estatísticas	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Dosagens de flúor.....	17
5.1.1. Concentração de flúor no plasma.....	17
5.1.2. Concentração de flúor na urina	18
5.1.3. Concentração de flúor nos ossos.....	18

5.2. Análise do efeito da fluorose experimental sobre a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte.	19
5.2.1. Análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de polarização.....	19
5.2.2. Análise da absorbância da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz.	21
5.3. Observação clínica da fluorose.....	22
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	40
Anexo 1.....	40

1. INTRODUÇÃO

O flúor é um meio eficaz na prevenção e controle da cárie dental. É amplamente utilizado em todo mundo, desde adicionado à água de abastecimento público até dentifrícios (creme dental e bochechos), géis, materiais odontológicos (ionômero de vidro e vernizes fluoretados), entre outros. (Kozlowski & Pereira, 2003). A ingestão crônica e excessiva de fluoretos durante o período de formação dos dentes pode causar a fluorose, que é caracterizada pela hipomineralização do esmalte dentário.

Na fluorose dentária são observadas desde linhas brancas finas, seguindo as periquimáceas do esmalte, até uma aparência totalmente opaca e calcária. Nas formas mais graves, podem aparecer como manchas castanhas e podem evoluir com desprendimento de partes do esmalte após a erupção do dente, levando ao aparecimento de depressões na sua superfície.

A fluorose afeta tanto a dentição decídua como a permanente. Acredita-se que o dente está suscetível para surgimento de fluorose durante as fases secretória e de maturação da amelogenese, sendo o início do estágio de maturação da formação do esmalte o mais crítico; entretanto, há muita divergência na literatura sobre o mecanismo de ação do flúor no desenvolvimento do esmalte.

Pesquisas no Brasil mostraram que a prevalência da fluorose dentária ocorre principalmente nas formas leve e moderada. Até o momento não foi demonstrado risco para a saúde, mas apenas um problema de ordem estética. Porém, estudos recentes associam fluorose óssea a desmineralização mediada por PTH (Xu et al, 2009).

Trabalhos relacionados a fluorose, realizados em camundongos, demonstraram que a linhagem A/J foi a mais suscetível a fluorose dentária e a 129P3/J a mais resistente (Everett et al, 2002), indicando que a fluorose pode estar associada a características genéticas existente nestas linhagens (Everett et al, 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Esmalte Dentário

O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado do organismo, formado por células epiteliais de origem ectodérmica. Após completamente formado, é o único tecido totalmente acelular do organismo, pois não mantém relação com as células que o formaram. É constituído por 97% de material inorgânico (cristais de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, carbonato, sódio, magnésio, cloreto de potássio e flúor). Contém 1% de material orgânico, de natureza essencialmente protéica, com escassos carboidratos e lipídios, e 2% de água (Eisenmann, 2001).

Devido a sua composição, o esmalte dentário é considerado um tecido extremamente friável. Por isso, a dentina subjacente é a estrutura que confere sustentação ao esmalte, diminuindo assim a possibilidade de fratura durante o processo mastigatório.

Outra característica do esmalte dentário é que quanto maior o seu grau de mineralização, maior será sua natureza cristalina e sua translucidez, o que reflete, conseqüentemente, na coloração do dente. (Katchburian & Arana, 1999).

2.2. Amelogênese

A amelogênese é o processo responsável pela produção, desenvolvimento e amadurecimento do esmalte dentário. As células do epitélio interno do órgão do esmalte passam por um processo de diferenciação, originando os ameloblastos, células que serão responsáveis pela formação do esmalte. Contudo, a diferenciação dos pré-ameloblastos em ameloblastos somente ocorrerá após a deposição da primeira camada de dentina, ou seja, a formação do esmalte iniciará durante a fase de coroa. Os ameloblastos passam por fases de desenvolvimento, que têm início desde a diferenciação do epitélio interno do esmalte até a formação e a maturação pré-eruptiva do esmalte. O processo da

amelogênese é dividido nas seguintes fases: morfogênética, diferenciação, secretora, maturação e protetora. (Katchburian & Arana, 1999).

Os ameloblastos modificam sua forma e atividade durante o processo da amelogênese. No estágio de secreção, quando estão em alta atividade, tornam-se colunares com aumento progressivo em comprimento. Assim que inicia a fase de transição, há diminuição no tamanho dos ameloblastos devido à involução do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso/granular. Na fase de maturação, os ameloblastos secretam calicreína-4 (KLK4) (Simmer et al, 1998), uma das proteínas responsáveis pela degradação da parte orgânica do esmalte. No final da maturação do esmalte a KLK4 é reabsorvida (Sharma et al, 2008).

A biossíntese do esmalte dentário é um processo complexo. É iniciada pela formação de uma matriz rica em proteínas, a qual é secretada, sintetizada e organizada pelos ameloblastos. A referida matriz é proteoliticamente quebrada e remontada com íons minerais, que são depositados na forma de cristais de hidroxiapatita. Este processo em que a matriz orgânica é depositada com pequena quantidade de mineral ocorre durante a fase de secreção da amelogênese. Sua degradação tem início na fase de transição, e na fase de maturação, a matriz é intensamente degradada e quase totalmente substituída por componente mineral (Robinson et al, 1979; Bronckers et al, 1995). Em suma, o esmalte maduro é constituído por cristais de hidroxiapatita depositados em uma pequena quantidade de material orgânico (Espírito Santo et al, 2006).

2.3. Proteínas do Esmalte Dentário

O esmalte dentário é composto por vários tipos protéicos (proteínas estruturais e proteases) durante os estágios secretório e de maturação da amelogênese. As proteínas estruturais expressas na matriz orgânica do esmalte são as amelogeninas, ameloblastinas, enamelinas e amelotinas (Bartlett et al, 2006). A metaloproteinase enamelinina (MMP-20) e a serina protease calicreína-4

(KLK4) também estão presentes na matriz do esmalte e são responsáveis pela degradação protéica dessa matriz, respectivamente nas fases de secreção e maturação do esmalte (Hannas et al, 2007).

As amelogeninas são as principais proteínas estruturais do esmalte, constituindo 90% do total de proteínas da matriz no estágio secretório (Termine et al, 1980). Estas proteínas podem se apresentar diferentemente por três razões principais: (1) Existem duas cópias distintas do gene da amelogenina localizadas nos cromossomos X e Y; (2) Vários mRNAs de amelogeninas são produzidos por “splicing” alternativo; (3) Ocorre processamento proteolítico das formas de maior massa molecular.

Dentre as propriedades físicas da amelogenina está o fato dela ser altamente hidrofóbica, com exceção de uma porção hidrofílica na região carboxi-terminal, a qual é removida por proteólise. Através desta região hidrofílica a amelogenina interage com os cristais de hidroxiapatita. Esta região também é necessária para a inibição do crescimento dos cristais em soluções contendo amelogeninas (Aoba et al, 1987). Em solução, a amelogenina forma agregados, as chamadas “nanosferas”. As implicações biológicas destas características estariam relacionadas com a habilidade das amelogeninas de maior massa molecular, organizadas em nanosferas, de interagir com os cristais extremamente finos dos estágios precoces da formação do esmalte e protegê-los de fusões prematuras (Fincham et al, 1999). A localização da amelogenina contendo a região carboxi-terminal também é distinta da localização das demais amelogeninas geradas por proteólise, sendo a marcação da porção carboxi-terminal restrita aos 40 μ ms superficiais de esmalte em desenvolvimento (Uchida et al, 1991). Localizações distintas para a amelogenina de maior massa molecular e seus produtos de degradação sugerem funções distintas.

O papel fundamental das amelogeninas na mineralização do esmalte pode ainda ser verificado: (1) pelo fato do gene da amelogenina estar alterado nos casos de amelogênese imperfeita ligada ao cromossomo X (Lagerström-Fermer et al, 1995), doença em que há formação de esmalte pouco mineralizado e bastante

desorganizado; (2) Camundongos “knockout” para amelogenina desenvolvem amelogênese imperfeita (Gibson et al, 2001). Além das amelogeninas, a fase orgânica da matriz contém outras proteínas estruturais e várias proteínases (Overall & Limeback, 1988).

As amelogeninas normalmente são hidrolisadas e removidas da matriz lentamente no estágio secretório e de modo bastante intenso no estágio de transição/maturação precoce na formação do esmalte (Smith & Nanci, 1996; Smith, 1998). A remoção das amelogeninas durante a maturação é um passo crítico para a mineralização do esmalte, e parece depender apenas de proteases (Bartlett & Simmer, 1999): (1) porque até hoje não se demonstrou, consistentemente, a atividade fagocitária de ameloblastos (Smith, 1998); (2) porque a digestão de proteínas estruturais íntegras *in vitro* pelas proteases (particularmente a MMP-20) produz os mesmos produtos de clivagem já isolados a partir da matriz do esmalte (Ryu et al, 1999) e (3) porque quando se acompanha a degradação de proteínas presentes em extratos de matriz de esmalte, percebe-se a degradação das formas de maior massa molecular é gradual, exceto em situações em que a matriz é fervida (Smith & Chen, 1998). Estes achados tornam a inibição das proteases presentes na matriz do esmalte uma hipótese atrativa para explicar defeitos do esmalte com características histológicas de mineralização deficiente, e achados bioquímicos de acúmulo de proteínas.

As proteases da matriz do esmalte já identificadas pertencem às famílias das serino-proteinases e metaloproteinases (Carter et al, 1989; Denbesten & Heffernan, 1989; Moradian-Oldak et al, 1994; Cotrim et al, 2002; Fukae et al, 1998). Essas enzimas são responsáveis pela degradação proteolítica da matriz do esmalte durante a amelogênese (Nagano et al, 2009).

A protease do esmalte melhor caracterizada é uma metaloproteinase que se apresenta em zimogramas com as formas de 41 e 45 kDa, conhecida como enamelisina e classificada como MMP-20 (Bartlett et al, 1996; Bartlett et al, 1998; Bartlett & Simmer, 1999). A MMP-20 é expressa por ameloblastos durante a fase de secreção da amelogênese e o seu gene se localiza no braço longo do

cromossomo 11 (11q22.3) (Unigene # HS 129737). O papel da MMP-20 parece ser a remoção gradual da porção carboxi-terminal da amelogenina durante o estágio secretório (Ryu et al, 1999; Simmer & Hu, 2002).

Outra enzima que participa no processamento da matriz do esmalte é uma serino-protease conhecida como calicreina-4 ou KLK4, que é encontrada no tecido nas formas com 30 e 34 kDa (Simmer et al, 1998; Simmer & Hu, 2002). O gene da KLK4 está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.41) (Unigene # HS 218366). A função da KLK4 parece ser digestiva, isto é, cliva a amelogenina e outras proteínas da matriz do esmalte durante o início da fase de maturação. A degradação e remoção da matriz protéica do esmalte dentário permitem um crescimento rápido dos cristais de hidroxiapatita durante esta fase.

2.4. Fluorose Dentária

O uso tópico de flúor se mostra eficaz no combate e prevenção da cárie dentária (Kozlowski & Pereira, 2003). O efeito profilático tópico se deve: (1) à substituição dos grupos hidroxila das moléculas de hidroxiapatita por íons flúor, criando cristais de fluorapatita e tornando os dentes mais resistentes à ação do ácido das bactérias; (2) à atuação dos fluoretos presentes na superfície dos dentes que intensificam a deposição de cálcio e fosfato, causando a remineralização do esmalte com cárie. O flúor presente na água potável e sal de cozinha, quando ingerido, é absorvido no estômago e é distribuído pelo sangue para todo organismo. Atinge tecidos mineralizados e partes moles, retornando à cavidade oral através da saliva, reforçando o efeito tópico (Cury, 2001).

A fluorose dentária é uma hipomineralização do esmalte, causada por ingestão crônica de altos níveis de fluoreto durante o desenvolvimento dentário. Seu primeiro relato foi feito por Black e McKay (1916). A ingestão em excesso de fluoreto pode causar um aumento na quantidade de proteínas e um decréscimo na quantidade mineral do esmalte (Sharma et al, 2008). Outros fatores também estão associados à fluorose dentária como a suscetibilidade genética (Vieira et al, 2004;

Everett et al, 2002), o uso de água fluoretada potável, suplementos com flúor, pasta dental fluoretada e fórmulas infantis antes de 6 anos de idade (Mascarenhas, 2000). A fluorose pode ocorrer tanto na dentição decídua como na permanente (Levy et al, 2002).

O primeiro sintoma de ingestão excessiva de flúor por longos períodos é o aparecimento de formas leves de fluorose dentária (manchas esbranquiçadas em forma de linhas, seguindo as periquimáceas do esmalte) (Silva, 2003). Em água não tratada, como em poços, o fluoreto pode aparecer em concentrações desde menores que 0.1 ppm até maior que 100 ppm; mesmo na água potável, pode alcançar concentrações na faixa de 1.6 - 1.8 ppm, assim, sendo difícil determinar qual é o ponto inicial para o risco de fluorose em uma população. (Kubota et al, 2005).

2.5. Efeito da Fluorose no Esmalte Dentário

O excesso de ingestão de flúor durante a infância pode causar defeitos na estrutura do esmalte, tais como: aumento da porosidade e dos níveis protéicos, perda mineral, e em casos severos, presença de descoloração e depressões em sua superfície (Bronckers et al, 2006).

O esmalte dentário fluorótico possui uma subsuperfície hipomineralizada, profunda em comparação a uma superfície bem mineralizada. Há a presença de cristais hexagonais planos e altamente uniformes na parte exterior do esmalte, enquanto nas regiões mais internas existe um esmalte com cristais irregulares, sendo mais parecido com o esmalte normal adulto. O período de desenvolvimento em que os dentes estão mais sujeitos à fluorose parece ser dos 22 aos 26 meses de idade, em humanos. Para os incisivos, é perigosa a ingestão em excesso de flúor até 36 meses após esse período crítico. Dentes formados no mesmo período devem apresentar o mesmo grau de alteração e deve haver homologia, isto é, não irá ocorrer fluorose somente em um dente isolado (Cury, 2001).

Existem vários possíveis mecanismos que explicam o efeito do flúor na formação do esmalte dentário. O flúor parece afetar tanto o metabolismo dos ameloblastos quanto interferir diretamente na formação da matriz do esmalte dentário.

I - Efeito nos ameloblastos:

O flúor induz alterações do tipo “stress” no retículo endoplasmático rugoso de ameloblastos (Kubota et al, 2005; Sharma et al, 2008). Sendo este um mecanismo geral possivelmente responsável por alterações na diferenciação e proliferação dos ameloblastos, assim como possíveis alterações na capacidade de secreção e reabsorção destas células (Robinson et al, 2004). Altas doses ministradas em roedores causaram desorganização dos ameloblastos na fase secretória da amelogênese (Bronckers et al, 2006).

II - Efeitos na matriz extracelular.

A exposição ao fluoreto durante o desenvolvimento do esmalte dentário pode atrasar a remoção das amelogeninas, que são as proteínas mais abundantes na matriz orgânica extracelular do esmalte. O atraso na hidrólise das proteínas pode estar relacionado à interferência do flúor sobre as proteinases que atuam na degradação enzimática da matriz, podendo afetar especificamente a ação da MMP-20 durante a fase secretora. Como resultado, a matriz do esmalte fluorótico pode apresentar retenção de proteínas e desorganização na formação de cristais de esmalte (DenBesten et al, 2002; Hannas et al, 2007; DenBesten et al, 1985). O flúor pode também inibir a nucleação da mineralização pelas proteínas do esmalte dentário (Bronckers et al, 1984).

2.6. Birrefringência da Matriz Orgânica Extracelular do Esmalte Dentário

A matriz orgânica extracelular do esmalte dentário, quando observada em microscopia de luz polarizada, apresenta propriedades anisotrópicas na forma de birrefringência (Espírito Santo et al, 2006). A birrefringência é um fenômeno óptico que ocorre devido à diferença de índices de refração de um objeto, o que

significa propagação de luz com velocidades e direções diferentes. A birrefringência se expressa pela equação $B = n_e - n_o$, em que n_e constitui o índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário, e n_o é o índice de refração na direção do raio ordinário; este raio obedece às leis de refração ($n_o = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$) (Vidal, 1964). Quando um dos eixos de propagação de um objeto birrefringente é colocado a 45 graus dos dois filtros polarizadores (analisador e polarizador), este objeto exibirá brilho máximo. Este brilho ocorre devido à diferença de caminho óptico, ou retardo óptico, que é dado pela equação $RO = B.e$, onde B é o valor da birrefringência e e é a espessura do corpo por qual os raios irão se propagar (Vidal, 1987). O valor do retardo óptico é dado em nanômetros e é diretamente proporcional à espessura dos cortes. Por essa razão, cortes mais espessos de uma mesma amostra mostraram ter retardos ópticos altos. Cortes de estruturas biológicas formadas por macromoléculas paralelas, ordenadamente arranjadas e filamentosas, exibiram uma birrefringência significativa quando examinadas através de microscopia de luz polarizada (Vidal et al, 1975; Katoh et al, 1999). A birrefringência revela uma organização supramolecular ordenada. Em amostras biológicas, a birrefringência é observada em actina filamentosa (F-actin), filamentos intermediários, miosina, colágeno (Vidal et al, 1975; Bridgman & Dailey, 1989; Aldrovani et al, 2007a; Aldrovani et al, 2007b), matriz orgânica do esmalte dentário (Espírito Santo et al, 2006; Espírito Santo et al, 2007) e esmalte maduro (Saiani et al, 2009; Sousa et al, 2006).

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram que a matriz do esmalte dentário em incisivos de ratos é birrefringente quando analisada em microscopia de luz polarizada (Espírito Santo et al, 2006). Este fato mostra que a matriz orgânica do esmalte dentário possui uma organização supramolecular, que pode ser facilmente estudada pela microscopia de luz polarizada. Esta descoberta abriu novas perspectivas no estudo da formação do esmalte dentário, pois permite estudar o efeito de fatores genéticos e ambientais sobre a organização supramolecular da matriz do esmalte dentário e correlacionar com efeitos na estrutura do esmalte maduro. Neste sentido, em publicação

recente foi mostrado que alterações na organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário foram observadas em camundongos mutantes (*knockout*) para os genes da amelogenina e MMP-20, sendo este um possível mecanismo estrutural pelo qual estas mutações levam ao aparecimento da amelogênese imperfeita (Espírito Santo et al, 2007).

Resultados ainda não publicados de nosso laboratório, utilizando linhagens de camundongos *AJ* (conhecida por ter alta suscetibilidade ao flúor) (Everett et al, 2002) e *NOD*, mostraram que a birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário pode variar bastante e que parece ser proporcional à quantidade de flúor depositada nos ossos. Estes resultados indicam que os níveis sistêmicos de flúor podem ser preditores da susceptibilidade à fluorose dental e também que o flúor afeta a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário. A possibilidade de se observar e quantificar *in situ* a organização da matriz orgânica do esmalte dentário fluorótica em animais abre novas possibilidades no estudo desta alteração, pois, pode-se quantificar a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário pela medida do retardo ótico e também quantificar o atraso na maturação do esmalte dentário medindo-se a extensão da área birrefringente (i.e. matriz orgânica orientada).

3. PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi analisar o efeito do flúor na maturação e organização supramolecular em linhagens de camundongos *A/J*, *CBA* e *DBA/2* que possuem diferentes suscetibilidades à fluorose (Everett et al, 2002) e sua associação com níveis sistêmicos de flúor no plasma, na urina e nos ossos.

Outro objetivo foi estudar o efeito do flúor na degradação proteolítica da matriz orgânica do esmalte dentário através da análise da birrefringência e da absorbância de luz.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Projeto experimental

Este trabalho está em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número de protocolo 1458-1.

Noventa e seis camundongos (32 da linhagem A/Uni, 33 da linhagem CBA/Uni e 31 da linhagem DBA/2), machos e fêmeas, pesando inicialmente cerca de 25 g, com 4 a 5 semanas de idade, fornecidos pelo CEMIB/UNICAMP, foram aleatoriamente divididos em três grupos e submetidos a um tratamento de 49 dias da seguinte forma:

- **Grupo 11,25 ppm de flúor:** Adição de fluoreto de sódio em concentração de 25 ppm na água de beber dos animais;
- **Grupo 45 ppm de flúor:** Adição de fluoreto de sódio em concentração de 100 ppm na água de beber dos animais;
- **Grupo 0 ppm de flúor (controle):** Foi utilizada água de beber sem adição de fluoreto de sódio.

O solvente utilizado para preparo das soluções dos três grupos foi água deionizada. Durante o experimento, os camundongos receberam exclusivamente Dieta 2000 modificada (Keyes & Jordan, 1964) e água ad libitum. Ao final dos 49 dias (7 semanas), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80-100 mg/kg) e perfundidos com solução fixadora de paraformaldeído 2% com glutaraldeído 0,5% em 0.2 M de solução salina de tampão fosfato (phosphate buffered saline solution – PBS), pH 7.2, segundo técnica padrão. Suas hemimandíbulas foram extraídas e imersas na mesma solução fixadora durante 24 horas.

4.2. Análise do efeito da fluorose experimental sobre a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte.

4.2.1. Análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz polarizada.

As hemimandíbulas foram desmineralizadas por 12 horas em solução de ácido nítrico 5% em formaldeído 4%. As peças foram, então, desidratadas em banhos crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidos, desparafinizados, hidratados e analisados em microscópio *Leica DM LP (Leica Microsystems®)* equipado com filtros polarizadores, compensador de *Brace-Köhler (Wild Leitz, Wetzlar, Germany)* e luz policromática. O meio de embebição utilizado foi glicerina 80%. Os cortes foram deixados por 30 minutos no meio de embebição antes das mensurações do retardo óptico. A medição do retardo óptico (RO) foi feita em 5 cortes na área de maior brilho de birrefringência na matriz orgânica do esmalte de incisivo inferior no estágio de secreção da amelogênese em uma hemimandíbula de todos os animais. O retardo da maturação foi determinado pela extensão da área birrefringente da matriz orgânica do esmalte dental em relação à raiz distal do segundo molar.

4.2.2. Análise da absorbância da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz.

Para a realização dessa parte do trabalho, os mesmos cortes utilizados para a análise de birrefringência foram corados com solução de Ponceau SS por 1 minuto seguido de lavagem em ácido acético 3% por 1 minuto e depois em água. As lâminas, depois de secas, foram lavadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá natural (Vidal & Mello, 2005, modificado).

Os cortes foram analisados em microscópio *Leica DM LP* (*Leica Microsystems*[®]) equipado com filtro verde (546 nm) e capturados com câmera digital *Leica DFC280* com resolução de 96 DPI e dimensões 1280 x 1024 pixels. As imagens foram analisadas e mensuradas pelo software *Image J* versão 1.42q (*National Institutes of Health, USA* – <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

4.3. Dosagens de flúor.

Foram obtidas coletas semanais de urina dos três grupos de cada linhagem nas 5^a, 6^a e 7^a semanas, a fim de determinar a concentração urinária de flúor.

O sangue e os ossos (tíbias) foram coletados respectivamente antes e após a perfusão dos animais.

Os níveis de flúor nos ossos, na urina e no sangue foram medidos pela técnica do eletrodo específico.

4.3.1. Concentração de flúor no plasma

Cerca de 1 ml de sangue de cada animal foi coletado antes da perfusão, em tubos de plástico de 1.5 ml contendo 10 µl de heparina 5000UI/ml. O plasma sobrenadante foi obtido após centrifugação a 4000 RPM por 5 minutos e transferido para tubos de plástico separados na proporção de 200 µl de plasma e 20 µl de TISAB III. Um eletrodo específico *Orion 96-09* foi anexado ao analisador iônico *Orion EA-940*, previamente calibrado com vários padrões (0.15-5.0 µg F/ml) preparados sob as mesmas condições das amostras que foram utilizadas para as análises. Os resultados foram expressos em µg F/ml.

4.3.2. Concentração de flúor na urina

Para determinar a concentração de flúor foram usados 50 µl de urina, 200 µl de água destilada e 250 µl de TISAB II (pH 5.0). Um eletrodo específico Orion 96-09 foi anexado ao analisador iônico Orion EA-940, previamente calibrado com vários padrões (0.25-8.0 µg F/ml) preparados sob as mesmas condições das amostras que foram utilizadas para as análises. Os resultados foram expressos em µg F/ml.

4.3.3. Concentração de flúor nos ossos.

As tíbias dos camundongos foram removidas da solução fixadora, lavadas em água e secadas por 24 horas em estufa de 60°C. Depois de trituradas, permaneceram novamente em estufa de 60°C por mais 24 horas. Foram pesados 10 mg (\pm 0.01) dos ossos triturados e transferidos para tubos de plástico, nos quais foram adicionados 0.5 ml de 0.5M de ácido hidrocloreídrico (HCl).

Depois de 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação, foram adicionados 0.5 ml de TISAB (1.0 M tampão acetato, pH 5.0 com 1.0 M de NaCl e 0.4 % ácido ciclohexanediaminetetraacético). O pH foi neutralizado com NaOH em concentração de 0.5 M. Um eletrodo específico *Orion 96-09* foi anexado ao analisador iônico *Orion EA-940*, previamente calibrado com vários padrões (0.5-64 µg F/ml) preparados sob as mesmas condições das amostras que foram utilizadas para as análises. Os resultados foram expressos em µg F/g de osso e sua determinação foi feita de acordo com Bezerra de Menezes et al (2003).

4.4. Observação clínica da fluorose.

Com o intento de se correlacionar modificações na organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dental com alterações na mineralização, a porção mineralizada dos dentes incisivos superiores de cada animal foi seccionada com auxílio de micromotor de alta rotação.

Essas porções seccionadas foram examinadas e fotografadas com o auxílio de um estereoscópio DF Vasconcelos MCT – Referência UM-M19 com filtro azul e uma câmera digital *Samsung S630* (6.0 megapixels) para verificação de alteração de cor do esmalte dental dos animais.

As imagens obtidas foram convertidas em escala de cinza 8-bit e foram mensuradas pelo software *Image J* versão 1.49q (*National Institutes of Health, USA* – <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

4.5. Análises Estatísticas

As análises de variância das medidas de retardo óptico, das dosagens de flúor (no plasma, na urina, nos ossos), de absorbância e das mensurações de imagens da observação clínica de fluorose foram feitas utilizando o software *Bioestat 5.0* com o método Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Dosagens de flúor

5.1.1. Concentração de flúor no plasma

A concentração plasmática de flúor foi estatisticamente diferente nos grupos 0 e 11.25 ppmF (exceto na linhagem CBA). Todas as outras comparações (grupos 0 *versus* 45 ppmF e 11.25 ppmF *versus* 45 ppmF) também mostraram diferença estatística. Foi observado maior concentração de flúor no plasma nos grupos 11.25 e 45 ppmF da linhagem DBA/2 quando comparada com as demais ($p < 0.05$). (Figura 1).

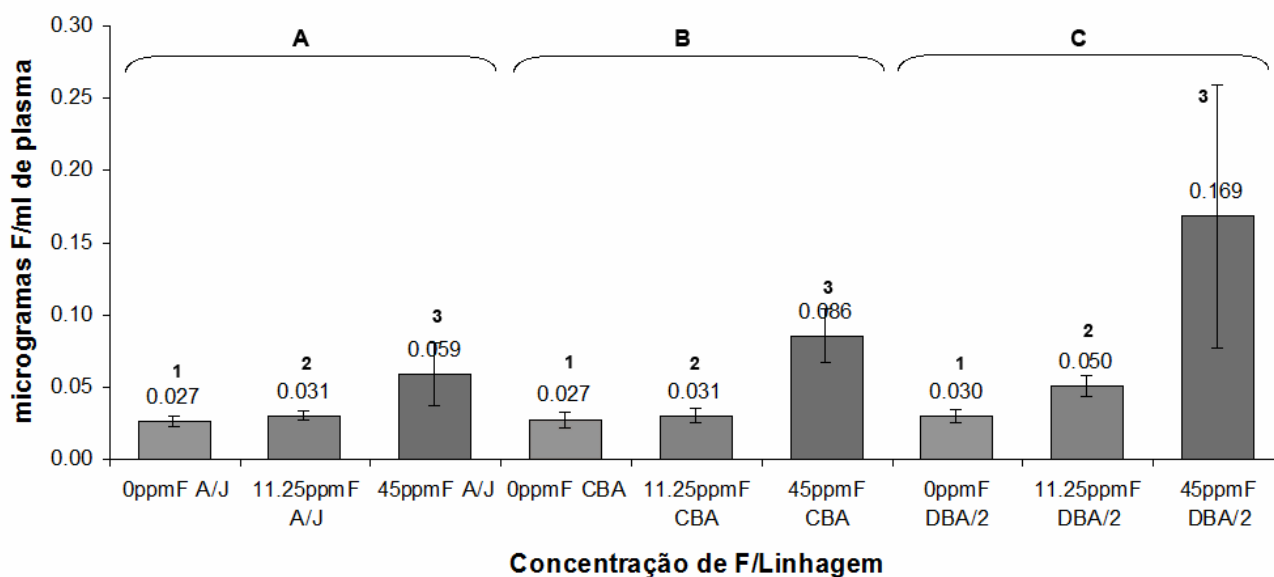


Figura 1 - Medianas e desvios padrões das concentrações de flúor no plasma (medidas em µg de F/ml de plasma). Apresentaram diferença estatística: Linhagem A/J: 1A e 2A ($p < 0.05$); 1A e 3A ($p < 0.0001$); 2A e 3A ($p < 0.05$); Linhagem CBA: 1B e 3B ($p < 0.0001$); 2B e 3B ($p < 0.05$); Linhagem DBA/2: 1C e 2C ($p < 0.05$); 1C e 3C ($p < 0.0001$); 2C e 3C ($p < 0.05$). Comparando as linhagens entre si, houve diferença estatística entre: 2A e 2C ($p < 0.0001$); 3A e 3C ($p < 0.0001$); 2B e 2C ($p < 0.05$); 3B e 3C ($p < 0.05$). (n = 95)

5.1.2. Concentração de flúor na urina

Houve maior concentração de flúor na urina nos grupos tratados com 45 ppmF em relação ao grupo 0ppmF em todas as linhagens ($p < 0.05$). Já entre os grupos 0 ppmF e 11.25 ppmF ocorreu o mesmo, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$), assim como entre os grupos 11.25 ppmF e 45 ppmF. (Figura 2).

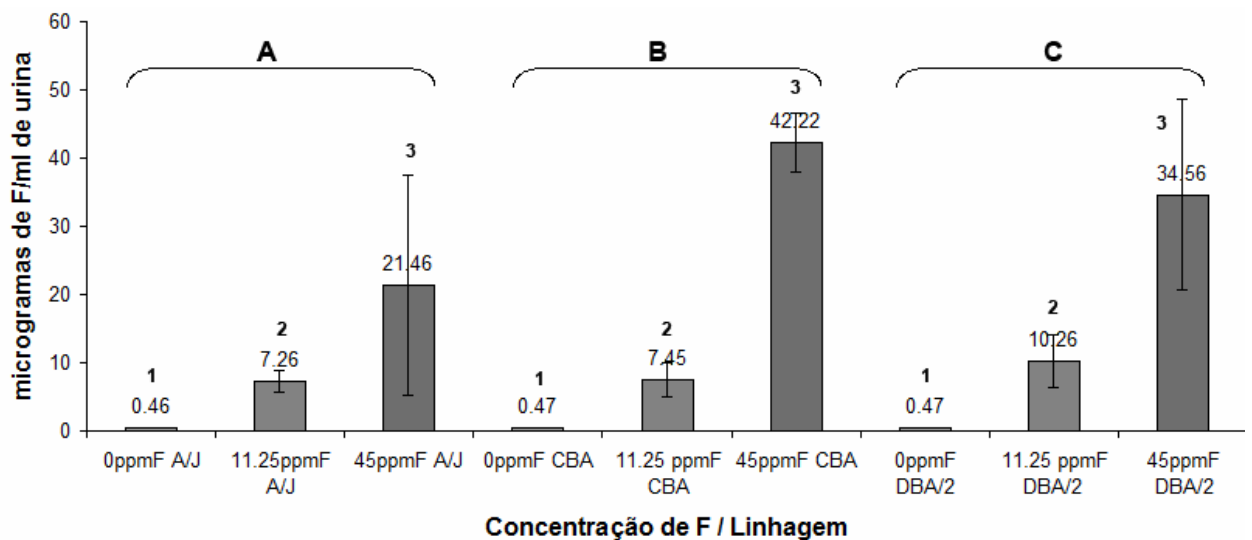


Figura 2 - Medianas e desvios padrões das concentrações de flúor na urina (medidas em μg de F/ml de urina). Apresentaram diferenças estatísticas: Linhagem A/J: 1A e 3A ($p < 0.05$); Linhagem CBA: 1B e 3B ($p < 0.05$); Linhagem DBA/2: 1C e 3C ($p < 0.05$).

5.1.3. Concentração de flúor nos ossos

A concentração de flúor nos ossos, em todas as linhagens, apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos. Foi observada maior concentração óssea de flúor na linhagem DBA/2 ($p < 0.05$), exceto no grupo 45 ppmF em que não diferiu da linhagem A/J (Figura 3).

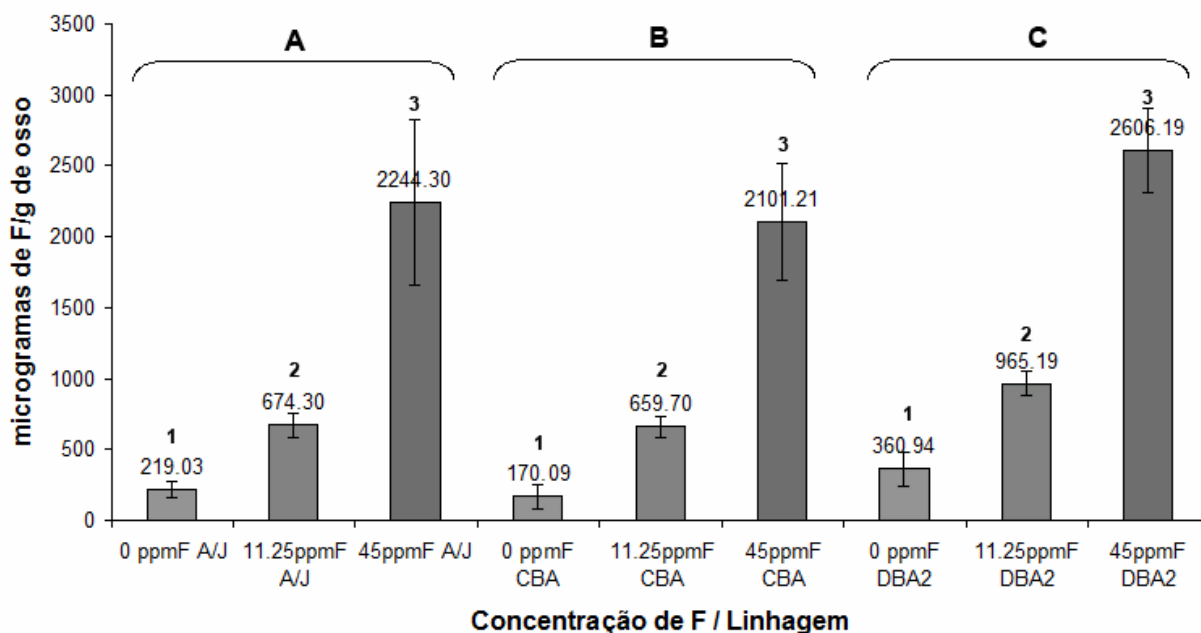


Figura 3 - Medianas e desvios padrões das concentrações de flúor nos ossos (medidas em µg de F/g de osso). Apresentaram diferença estatística: Linhagem A/J: 1A e 2A ($p < 0.05$); 1A e 3A ($p < 0.0001$); 2A e 3A ($p < 0.05$); Linhagem CBA: 1B e 2B ($p < 0.05$); 1B e 3B ($p < 0.0001$); 2B e 3B ($p < 0.05$); Linhagem DBA/2: 1C e 2C ($p < 0.05$); 1C e 3C ($p < 0.0001$); 2C e 3C ($p < 0.05$). Comparando as linhagens entre si, houve diferença entre: 1A e 1C ($p < 0.05$); 1B e 1C ($p < 0.05$); 2A e 2C ($p = 0.0002$); 2B e 2C ($p < 0.0001$); 3B e 3C ($p < 0.05$). (n = 96)

5.2. Análise do efeito da fluorose experimental sobre a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte.

5.2.1. Análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de polarização.

A birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário pode ser claramente observada nos cortes. O valor máximo da birrefringência ocorre quando os prismas estão alinhados cerca de 45° com o polarizador e o analisador. O retardo óptico (nm) foi medido na metade do estágio de secreção quando é observado o maior brilho da birrefringência (Figura 5).

A média do retardo óptico do grupo 45ppmF foi menor que nos outros grupos da linhagem A/J ($p < 0.05$). Nas linhagens CBA e DBA/2 se observou que

as médias do retardo óptico dos grupos 45 ppmF e 11.25 ppmF foram menores que no grupo 0 ppmF ($p < 0.05$).

Comparando as linhagens entre si foi observado maior efeito do flúor na birrefringência no grupo 11.25 ppmF nas linhagens CBA e DBA/2 ($p < 0.05$) em relação à linhagem A/J. As diferenças entre os outros grupos não foram estatisticamente diferentes. (Figuras 4).

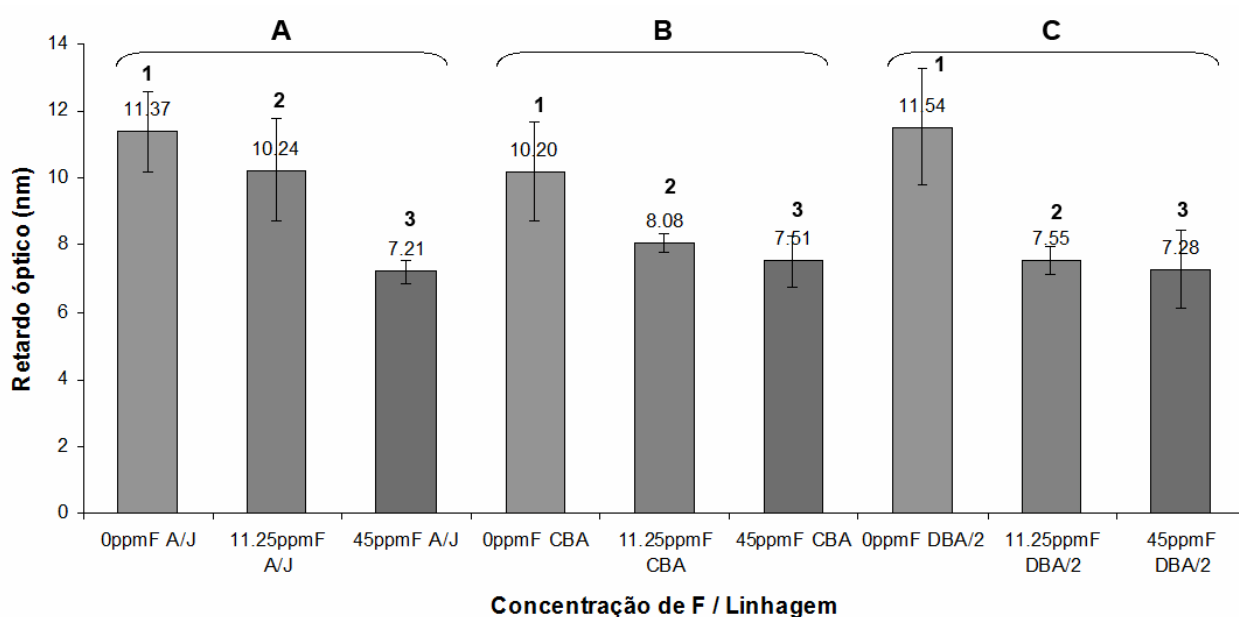


Figura 4 - Medianas e desvios padrões dos retardos ópticos (análise da birrefringência da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de polarização). Apresentaram diferença estatística: Linhagem A/J: 1A e 3A ($p < 0.0001$); 2A e 3A ($p < 0.05$); Linhagem CBA: 1B e 3B ($p < 0.0001$); 1B e 2B ($p < 0.05$); Linhagem DBA/2: 1C e 3C ($p < 0.05$); 1C e 2C ($p < 0.05$). Comparando as linhagens entre si, houve diferença estatística entre: 2A e 2B ($p < 0.05$); 2A e 2C ($p < 0.0001$). (n = 88)

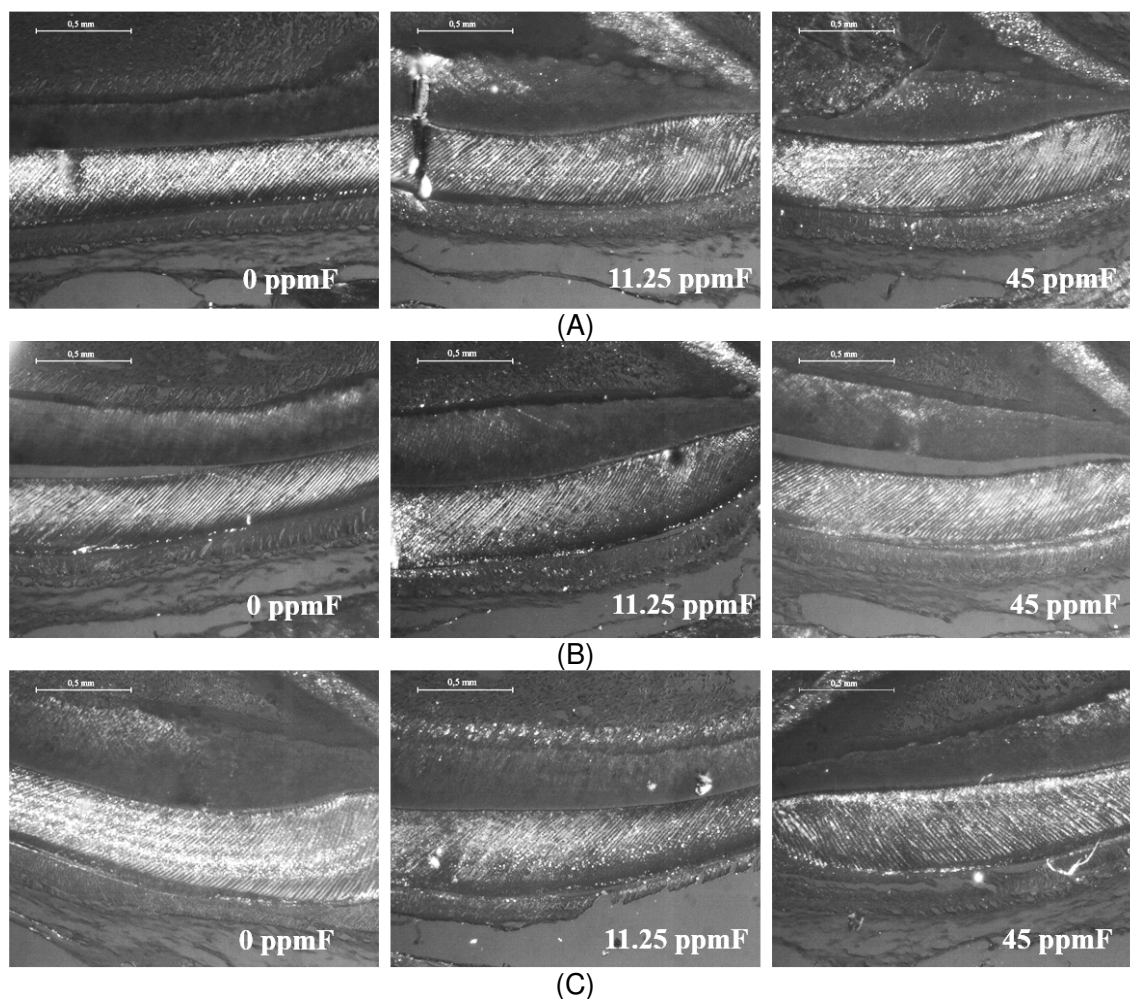


Figura 5 – Imagens que demonstram a birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário. (A) Linhagem A/J, (B) Linhagem CBA e (C) Linhagem DBA/2. Aumento de 20X.

5.2.2. Análise da absorbância da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz.

Não houve alteração na absorbância da matriz orgânica extracelular do esmalte entre os grupos em todas as linhagens ($p > 0.05$).

Quando as linhagens foram comparadas entre si foi observada variação estatisticamente significativa na absorbância da matriz orgânica extracelular do esmalte no grupo 0 ppmF (entre A/J e CBA e entre A/J e DBA/2). Nos demais

grupos houve diferença estatística somente entre as linhagens A/J e DBA/2 ($p < 0.05$). (Figura 6)

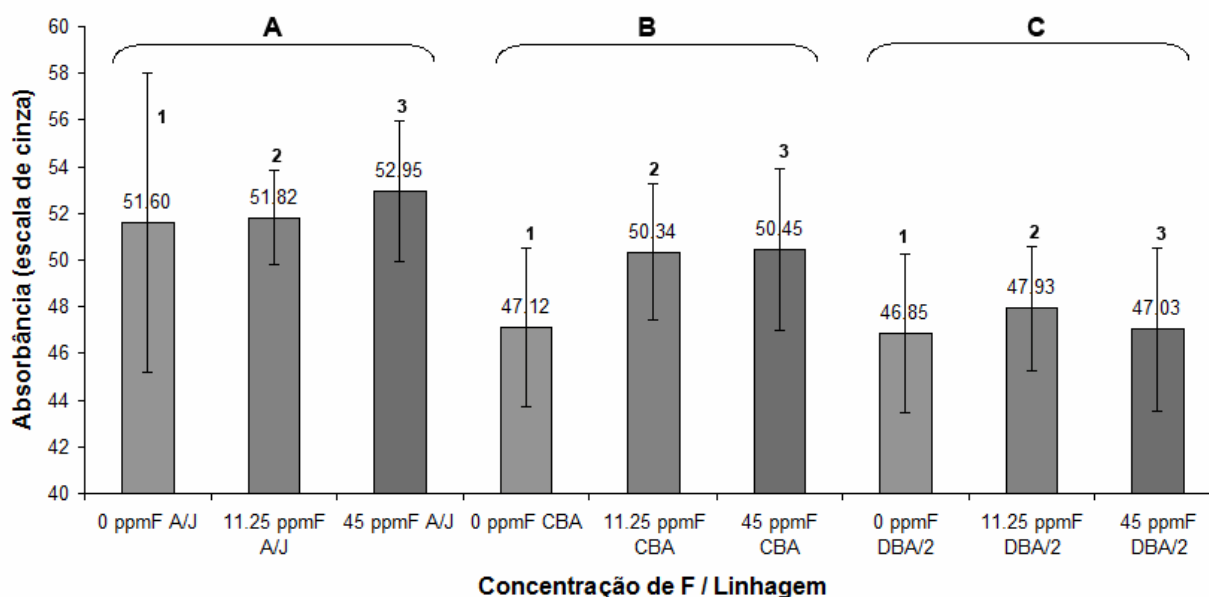


Figura 6 - Medianas e desvios padrões das medidas de absorvância da matriz orgânica do esmalte vista ao microscópio de luz. Houve diferença estatística ($p < 0.05$) entre: 1A e 1B; 1A e 1C; 2A e 2C; 3A e 3C. (n = 88)

5.3. Observação clínica da fluorose.

A fluorose se manifesta macroscopicamente como linhas esbranquiçadas no esmalte dentário o que altera tonalidade de cor dos dentes. A tendência é que dentes submetidos a maiores concentrações de flúor sejam mais claros.

As imagens dos dentes foram convertidas em escala de cinza sendo zero correspondente ao preto e 255 ao branco. Deste modo, dentes mais claros apresentaram valores maiores.

Na linhagem A/J houve variação estatisticamente significativa na tonalidade de escala de cinza das imagens dos dentes entre todos os grupos. Nas

outras linhagens (CBA e DBA/2) se observou que somente as imagens do grupo 45 ppmF são significativamente mais claras que 0 e 11.25 ppmF ($p < 0.05$). (Figuras 7, 8, 9 e 10).

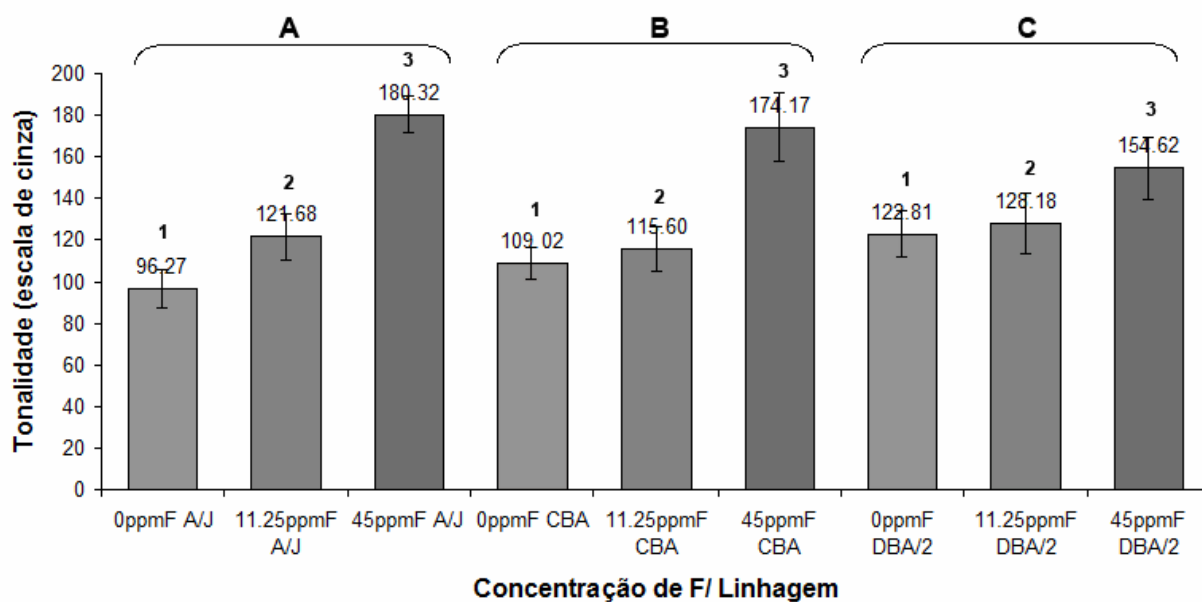


Figura 7 - Medianas e desvios padrões das medidas da tonalidade dos dentes (Observação clínica da fluorose). Apresentaram diferença estatística: Linhagem A/J: 1A e 2A ($p < 0.05$); 1A e 3A ($p < 0.0001$); 2A e 3A ($p < 0.05$); Linhagem CBA: 1B e 3B ($p < 0.05$); 2B e 3B ($p < 0.05$); Linhagem DBA/2: 1C e 3C ($p < 0.05$); 2C e 3C ($p < 0.05$). Comparando as linhagens entre si, foram observadas diferenças estatísticas entre: 1A e 1B ($p < 0.05$); 1A e 1C ($p < 0.0001$); 2A e 2B ($p < 0.05$); 2B e 2C ($p < 0.05$); 3A e 3C ($p = 0.0002$); 3B e 3C ($p < 0.05$). (n = 84)

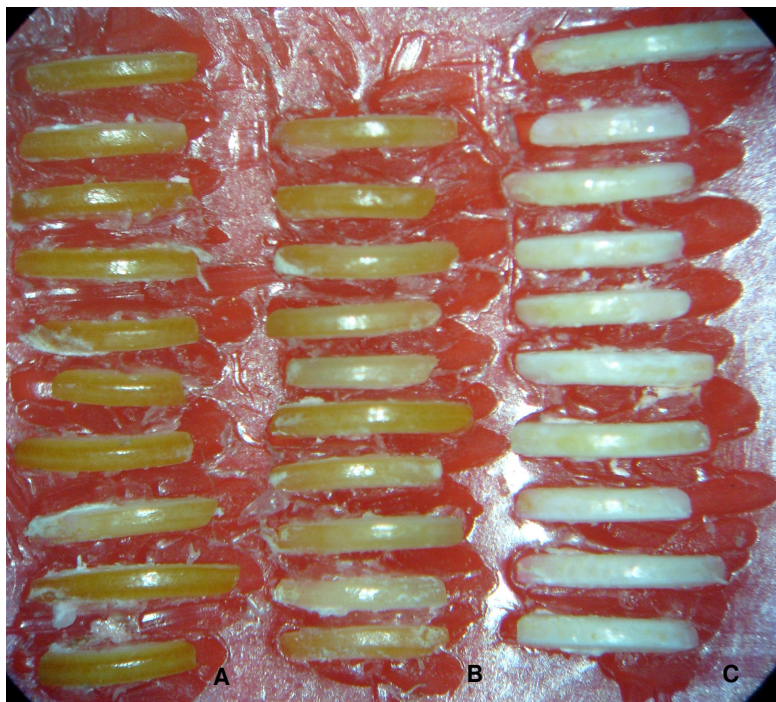


Figura 8 – Porção mineralizada dos dentes dos animais da linhagem A/J, em que (A) 0 ppmF, (B) 11.25 ppmF e (C) 45 ppmF



Figura 9 – Porção mineralizada dos dentes dos animais da linhagem CBA, em que (A) 0 ppmF, (B) 11.25 ppmF e (C) 45 ppmF

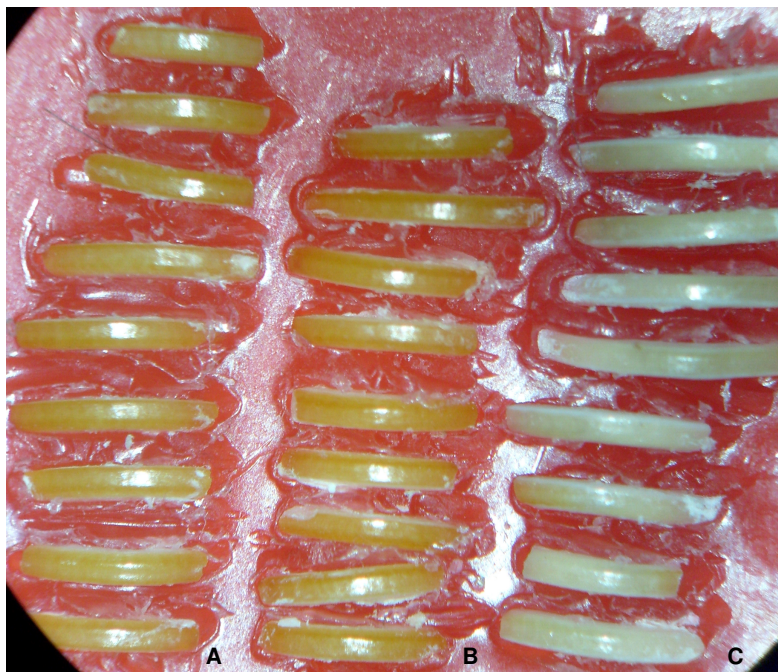


Figura 10 – Porção mineralizada dos dentes dos animais da linhagem DBA/2, em que (A) 0 ppmF, (B) 11.25 ppmF e (C) 45 ppmF

6. DISCUSSÃO

Há consenso entre diversos autores (Wright et al, 1996; Eastoe & Fejerskov, 1984; DenBesten & Crenshaw, 1984; DenBesten, 1986; Zhou et al, 1996) em relação à associação da fluorose com retenção protéica na matriz do esmalte, refletindo um retardo na remoção de peptídeos. A medida da absorvância de luz em cortes corados com Ponceau SS é uma maneira indireta de se mensurar a quantidade de proteínas presentes na matriz orgânica do esmalte dentário no estágio secretório (Vidal & Mello, 2005). Foi observado neste trabalho que a quantidade de proteínas presente na matriz orgânica da fase secretória não diferiu quando o grupo controle foi comparado com os tratados com flúor, nas diferentes linhagens. Estes resultados indicam que o flúor não afeta a secreção das amelogeninas. No entanto, a diminuição da birrefringência, observada em nossas análises, indica que a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário é afetada. A birrefringência ocorre quando um objeto que possui dois índices de refração diferentes, ao ser atravessado pela luz polarizada, apresenta um brilho característico (Vidal, 1987). A birrefringência aparece como consequência de uma organização supramolecular ordenada em tecidos biológicos. Estudo anterior mostrou que a matriz orgânica extracelular do esmalte dentário é altamente birrefringente no início da fase secretora da amelogênese, e a birrefringência tende a desaparecer durante o começo do estágio de maturação (Espírito Santo et al, 2006).

O flúor interfere diretamente na mineralização do esmalte dentário. A presença de íons flúor durante as fases iniciais da mineralização parece interferir com a formação de precursores de hidroxiapatita (Bachra & Fisher, 1969). Experimentos feitos por Bronckers et al (1984) mostraram que isto possivelmente se deve a inibição da nucleação da mineralização pelas proteínas do esmalte dentário. O flúor parece interferir nos mecanismos responsáveis pela remoção dos componentes da matriz orgânica, que resulta na retenção de proteínas e na desorganização na formação de cristais de esmalte (Drinkard et al, 1983;

Denbesten et al, 1985; Robinson et al, 2003). A hipótese mais aceita atualmente, ainda não comprovada experimentalmente, é que o flúor incorporado a hidroxiapatita interfere com a interação entre proteína-cristal tornando a matriz orgânica menos susceptível a degradação enzimática. A degradação enzimática e a remoção das proteínas da matriz orgânica do esmalte dentário são feitas principalmente por duas enzimas proteolíticas. A MMP-20, que é produzida nos estágios secretório e transição, cliva a molécula da amelogenina no seu domínio c-terminal. Esta clivagem faz com que as moléculas de amelogenina se polimerizem para formar nanosferas, que modulam o crescimento axial dos cristais de hidroxiapatita (Simmer & Hu, 2002). Numa segunda etapa, que ocorre durante a fase de maturação, a serina proteinase KLK4 degrada extensivamente as proteínas do esmalte, o que permite o crescimento em largura dos cristais, tornando o esmalte o tecido mais mineralizado do organismo. A interferência do flúor na degradação enzimática da matriz orgânica do esmalte dentário pode explicar tanto a redução de birrefringência quanto o retardo na remoção das proteínas do esmalte dentário. A clivagem parcial das amelogeninas pela MMP-20 durante a fase secretória parece ser um fator determinante para a organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário (Espírito Santo et al, 2007), ao mesmo tempo trabalhos têm mostrado que a ação da MMP-20 no estágio secretório também é um fator importante para a completa degradação e remoção da matriz orgânica do esmalte dentário nas fases de maturação (Bartlett et al, 2004; Espírito Santo et al, 2010).

Os roedores são modelos convenientes para o estudo do efeito da fluorose dentária na amelogênese, pois apresentam crescimento contínuo dos incisivos (Zegarelli, 1944). A manifestação de fluorose dentária neste estudo foi clinicamente observada em todas as linhagens e analisada através de comparação do aspecto macroscópico dos dentes, principalmente pelas alterações de tonalidade e presença de estriações, que são características em incisivos de ratos fluoróticos (Saiani et al, 2009). A análise estrutural do esmalte maduro mostrou que a linhagem A/J foi a que apresentou maior suscetibilidade

dose-dependente ao flúor, em concordância com a literatura (Everett et al, 2002; Vieira et al, 2005; Mousny et al 2006; Everett et al, 2009). Isto pode estar relacionado ao fato de que a matriz orgânica da linhagem A/J apresentou maior concentração protéica na fase secretória. É importante também mencionar que, além de estar presente em maior quantidade, a estrutura supramolecular da matriz orgânica secretora da linhagem A/J é menos afetada pelo flúor do que as outras duas linhagens estudadas. Estes dados sugerem que a retenção de proteínas no esmalte maduro, observada na fluorose dentária, pode ser devida a maior presença de proteínas estruturais na fase secretora e maior resistência destas proteínas à desorganização estrutural, sendo estas características intrínsecas desta linhagem, portanto, geneticamente determinadas. Estes resultados vão de encontro a estudo recente mostrando que a suscetibilidade a fluorose dentária na linhagem A/J está relacionada a lócus genéticos nos cromossomos 2 e 11 (Everett et al 2009).

Os indicadores bioquímicos de absorção sistêmica do flúor comprovadamente aceitos pela literatura são plasma, urina, saliva e ossos. As concentrações de fluoreto medidas no plasma, na urina e nos ossos foram dose-dependentes e estão em acordo com Carvalho et al (2009), Saiani et al (2009), Chouhan et al (2009), Mousny et al (2006), Everett et al (2002), Buzalaf et al (2002), DenBesten & Crenshaw (1984) e DenBesten (1986) mostrando que a administração de flúor via ingestão na água de beber é um meio efetivo de induzir a fluorose dentária experimental. A linhagem A/J apresentou menores níveis de flúor no plasma e nos ossos. Carvalho et al (2009) mostrou que a linhagem A/J teve excreção de flúor na urina maior que a linhagem 129P3/J, resistente a fluorose. Estes dados sugerem que a maior suscetibilidade à fluorose dentária observada na linhagem A/J é principalmente devida a características intrínsecas do esmalte dentário em formação do que fatores sistêmicos gerais.

7. CONCLUSÃO

A linhagem A/J foi a mais suscetível a fluorose dentária, pois apresentou alterações mais evidentes no esmalte maduro. No entanto, a matriz orgânica do esmalte na fase secretória foi menos afetada nesta linhagem do que nas linhagens CBA e DBA/2.

O flúor promoveu uma alteração na organização supramolecular da matriz orgânica do esmalte dentário na fase secretória, haja vista que este composto promoveu uma diminuição na birrefringência sem causar diminuição significativa na quantidade de proteínas presente na matriz.

A linhagem A/J apresentou menores concentrações plasmática e óssea de flúor, sugerindo que a maior suscetibilidade à fluorose dentária presente nesta linhagem esteja associada às características próprias do esmalte dentário durante o seu desenvolvimento e não a fatores sistêmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aldrovani M, Guaraldo AM, Vidal BC. Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. *Vision Res.* 2007a; 47(26):3229-37.

Aldrovani M, Aparecida Guaraldo AM, de Campos Vidal B. Fluorescence, birefringence and confocal microscopy of the abdominal aorta from nonobese diabetic (NOD) mice. *Acta Histochem.* 2007b; 109(3):248-54.

Aoba T, Fukae M, Tanabe T, Shimizu M, Moreno EC. Selective adsorption of porcine-amelogenins onto hydroxyapatite and their inhibitory activity on hydroxyapatite growth in supersaturated solutions. *Calcif Tissue Int.* 1987; 41(5):281-9.

Bachra BN, Fisher HR. The effect of some inhibitors on the nucleation and crystal growth of apatite. *Calcif Tissue Res.* 1969; 3(4):348-57.

Bartlett, JD, Simmer JP, Xue J, et al. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene.* 1996; 183: 123-128.

Bartlett JD, Xue J, Simmer JP, Margolis HC. Enamelysin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin. *Connect Tissue Res.* 1998; 39: 405-413.

Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4):425-41.

* De acordo com a norma da UNICAMP / FOP, baseada no modelo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J. Dent. Res.* 2004; 83: 909-913.

Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Wen X, White SN, Zhou YL. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol.* 2006; 74:57-115.

Bezerra de Menezes LM, Volpato MC, Rosalen PL, Cury JA. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. *Forensic Sci Int.* 2003; 137(2-3):209-14.

Black GV, McKay FJ. Mottled enamel. *Dent Cosmos.* 1916; 53:129-56.

Bridgman PC, Dailey ME. The organization of myosin and actin in rapid frozen nerve growth cones. *J Cell Biol* 1989; 108:95–109.

Bronckers AL, Jansen LL, Wöltgens JH. A histological study of the short-term effects of fluoride on enamel and dentine formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(10):803-810.

Bronckers AL, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Woltgens JH. Degradation of hamster amelogenins during secretory stage of enamel formation in organ culture. *Matrix Biol.* 1995; 14 (7): 533-41.

Bronckers AL, Bervoets TJ, Wöltgens JH, Lyaruu DM. Effect of calcium, given before or after a fluoride insult, on hamster secretory amelogenesis in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114 Suppl 1:116-22; discussion 127-9, 380.

Buzalaf MAR, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride*. 2002; 35(3): 185-192. (Research Report)

Carter J, Smillie AC, Shepherd MG. Purification and properties of a protease from developing porcine dental enamel. *Archs Oral Biol* 1989; 34(3): 195-202.

Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):1054-8.

Chouhan S, Lomash V, Flora SJS. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Appl Toxicol*. 2009 Sep 9 [Epub ahead of print]

Cotrim P, De Andrade CR, Line SRP, Almeida OP, Coletta RD. Expression and activity of matrix metalloproteinase -2 (MMP-2) in the development of the rat first molar tooth germ. *Braz Dent J*. 2002; 13: 97-102.

Cury J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri, L.N., editor. *Odontologia Restauradora: Fundamentos e Possibilidades*. Editora Santos. 2001. p. 33-68.

DenBesten PK, Crenshaw MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol*. 1984; 29(9):675-9.

DenBesten PK, Crenshaw MA, Wilson MH. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res*. 1985; 64(12):1365-1370.

DenBesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res.* 1986; 65(10):1272-7.

DenBesten PK, Heffernan LM. Enamel proteases in secretory and maturation enamel of rats ingesting 0 and 100 ppm of fluoride in drinking water. *Adv Dent Res.* 1989; 3(2): 199-202.

DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(11):763-70.

Drinkard CR, Crenshaw MA, Bawden JW. The effect of fluoride on the electrophoretic patterns of developing rat molar enamel. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(12):1131-4.

Eastoe JE, Fejerskov O (1984). Composition of mature enamel proteins from fluorosed teeth. In: *Tooth enamel IV.* Fearnhead RW, Suga S, editors. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., pp. 326-330.

Eisenmann DR. Estrutura do Esmalte. In: Ten Cate A.R., editor. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, estrutura e função.* 5ª edição. Editora Guanabara-Koogan. 2001. p. 205-221.

Espírito Santo AR, Novaes PD, Line SRP. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. *Eur J Oral Sci.* 2006. 114 (Suppl.1): 333-337.

Espírito Santo AR, Bartlett JD, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Line SR. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connect Tissue Res.*

2007; 48(1):39-45.

Espírito Santo AR, Marques MR, Line SRP. A study in situ of the effect of metalol- and serine proteinase inhibitors on the birefringence of the secretory stage enamel organic extracellular matrix. *Biotechnic & Histochemistry*. (Aceito para publicação em 2010).

Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res*. 2002 Nov;81(11):794-8.

Everett ET, Yan D, Weaver M, Liu L, Foroud T, Martinez-Mier EA. Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189(1-4):212-8.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*. 1999; 126 (3): 270-99.

Fukae, M; Tanabe, T; Uchida, T.; et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*. 1998; 77: 1580-1588.

Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T et al. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*. 2001; 276 (34): 31871-5.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65(1):1-13.

Katchburian E, Arana V. Esmalte. In: Histologia e Embriologia Oral. Editora Guanabara-Koogan. 1999. p. 237-279.

Katoh K, Hammar K, Smith PIS, Oldenbourg R. Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous actin in living growth cones. Mol Biol Cell 1999; 10: 197–200.

Keyes PH, Jordan HV. Periodontal lesions in the Syrian hamster. HI. Findings related to an infectious and transmissible component. Arch. Oral Biol. 1964; 9:337-400.

Kozlowski FC, Pereira AC. Aspectos clínicos e epidemiológicos da fluorose dentária. In: Pereira, AC, editor. Odontologia de Saúde Coletiva: Planejando ações e promovendo saúde. Editora Artmed. 1ª edição. 2003: p 326-339.

Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett E, Martinez-Mier EA, et al. Fluoride Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Ameloblasts Responsible for Dental Enamel Formation. The Journal of Biological Chemistry 2005; 280(24): 23194-23202.

Lagerström-Fermér M, Nilsson M, Bäckman B, et al. Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. Genomics. 1995; 26(1):159-62.

Levy SM, Hillis SL, Warren JJ, et al. Primary tooth fluorosis and fluoride intake during the first year of life. Community Dent Oral Epidemiol 2002; 30: 286-295.

Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. Pediatr Dent 2000; 22(4):269-277.

Moradian-Oldak J, Simmer PJ, Sarte PE, Zeichner-David M, Fincham AG. Specific cleavage of a recombinant murine amelogenin at the carboxy-terminal region by a proteinase fraction isolated from developing bovine tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 1994; 39 (8): 647-56.

Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, et al. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone.* 2006;39(6):1283-9.

Nagano T, Kakegawa A, Yamakoshi Y, et al. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. *J Dent Res.* 2009; 88(9):823-8.

Overall CM, Limeback H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem J* 1988; 256: 965-972.

Robinson C, Briggs HD, Aktinson PJ, Weatherell JA. Matrix and mineral changes in developing enamel. *J Dent Res.* 1979; 58 (Spec Issue B):871-82.

Robinson C, Shore RC, Wood SR, et al. Subunit structures in hydroxyapatite crystal development in enamel: implications for amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res.* 2003; 44 Suppl 1:65-71.

Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM. The Effect of Fluoride on the Developing Tooth. *Caries Research.* 2004; 38: 268-276.

Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, Simmer JP. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res.* 1999; 78(3):743-50.

Saiani RA, Porto IM, Marcantonio Junior E, Cury JA, de Sousa FB, Gerlach RF. Morphological characterization of rat incisor fluorotic lesions. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(11):1008-15.

Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(9):1142-6.

Silva MFA. Flúor: Metabolismo, Toxicologia, Fluorose e Cárie Dental. In: Krieger, L., coordenador. *Aboprev: Promoção de Saúde Bucal - Paradigma, Ciência e Humanização.* Editora Artes Médicas. 3ª edição. 2003; p 153-179.

Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD. Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res.* 1998; 77(2):377-86.

Simmer JP, Hu C. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect. Tissue Res.* 2002; 43: 441-449.

Smith CE, Nanci A. Protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec.* 1996; 245: 186-207.

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

Smith CE, Chen WY. Degradative changes in whole enamel homogenates incubated in vitro in the presence of low calcium ion concentrations. *Connect Tissue Res.* 1998;39(1-3):75-87; discussion 141-9.

Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *J Microsc.* 2006; 221(Pt 2):79-83.

Termine JD, Belcourt AB, Christner PI, Conn KM, Nylen MU. Properties of dissociatively extracted foetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980; 255: 9760–9768.

Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M, Yamada M, Miake K, Kobayashi S. Immunochemical and immunohistochemical studies using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and the 13-17 kDa nonamelogenins, on immature enamel of pig and rat. *Histochemistry* 1991; 96:129-138.

Vidal BC. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma* 1964, 59:472–479.

Vidal BC, Mello MLS, Godo C, Caseiro Filho AC, Abujadi JM. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. *Ann Histochem* 1975; 20: 18–26.

Vidal BC. Métodos em Biologia Celular. Em: Vidal, B.C & Mello, M.L.S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro. Atheneu, 1987. 348p. pp.05-34.

Vidal BC, Mello ML. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to collagen fibers. *Biopolymers*. 2005; 78(3):121-8.

Vieira AP, Hancock R, Limeback H, Maia R, Grynpas MD. Is Fluoride Concentration in Dentin and Enamel a Good Indicator of Dental Fluorosis? *J Dent Res* 2004; 83(1): 76-80.

Vieira A, Hancock R, Dumitriu M, Schwartz M, Limeback H, Grynypas M. How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization? *J Dent Res.* 2005; 84(10):951-7.

Wright JT, Chen SC, Hall KI, Yamauchi M, Bawden JW. Protein characterization of fluorosed human enamel. *J Dent Res.* 1996; 75(12):1936-41.

Xu H, Liu QY, Zhang JM, Zhang H, Li GS. Elevation of PTH and PTHrp Induced by Excessive Fluoride in Rats on a Calcium-deficient Diet. *Biol Trace Elem Res.* 2009 Nov 14. [Epub ahead of print]

Zegarelli, EV. Adamantoblastomas in the Slye Stock of Mice. *Am J Pathol.* 1944; 20(1): 23–87.

Zhou R, Zaki AE, Eisenmann DR. Morphometry and autoradiography of altered rat enamel protein processing due to chronic exposure to fluoride. *Arch Oral Biol.* 1996 Aug-Sep;41(8-9):739-47.

ANEXOS

Anexo 1



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

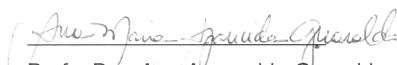
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1458-1, sobre "Efeito do flúor sobre a birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line / Luciana Souto Mofatto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 22 de abril de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1458-1, entitled "Fluoride effect on birefringence of the enamel organic matrix", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 22, 2008.

Campinas, 22 de abril de 2008.


Prof. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>