

**Fluorose em ratos induzida pela ingestão contínua
de fosfatos brutos de rocha: Morfologia
do dente e osso alveolar**

(Fluorosis in rats due Brazilian rock phosphates: tooth and alveolar bone morphology)

E.G. Araújo¹, V.A. Nunes^{1,2}, O.B. Couto³, J.A.C. Viana^{1,2}, I.J. Nunes¹

¹Escola de Veterinária da UFMG, Cx. Postal 567 - 30161-970
Belo Horizonte, MG.

²Bolsista do CNPq

³EMATER, MG

RESUMO

Avaliaram-se os efeitos do flúor, presente em fosfatos brutos de rocha, sobre o dente e osso alveolar de ratos (*Ratus ratus*), alimentados com uma dieta básica acrescida dos fosfatos de Araxá, Patos de Minas e Tapira, em dois níveis de fósforo disponível (0,15 e 0,25%). Os animais controle receberam a mesma dieta básica, mas sem qualquer suplementação de fósforo. Independente da fonte testada, todos os animais apresentaram lesões típicas da fluorose dentária e comprometimento do osso alveolar.

PALAVRAS-CHAVE: Flúor, fluorose, fosfato de rocha, dente e osso alveolar, rato.

SUMMARY

The effects of fluoride toxicity due to Brazilian rock phosphates intake in rats (*Ratus ratus*) were evaluated by the microscopic examination of tooth and alveolar bone. The rats received a basic diet added Araxá, Patos de Minas and Tapira rock phosphate at two levels of disponible phosphorus (0.15 and 0.25%). The control rats were fed the same basic diet non-supplemented with any phosphate source. Regardless the rock phosphate sources, all the animals showed dental and bone fluorosis. The control rats did not show any lesions.

KEYWORDS: Fluor, fluorosis, rock phosphate, tooth and alveolar bone, rat.

* Recebido para publicação em 03 de janeiro de 1994.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte em caráter extensivo e semi-extensivo constitui atividade econômica e social de relevante importância em todo o território nacional. No entanto, os solos e as gramíneas tropicais apresentam, em geral, níveis de fósforo (P) abaixo dos ideais e, em condições de pastejo, torna-se indispensável o fornecimento do elemento na forma de suplementação mineral.

A adição de fósforo, por fontes convencionais, representa cerca de 60 a 75% do custo total da mistura mineral. Além disso, os gastos com a mineralização do rebanho constituem o segundo maior item de custo em uma propriedade de criação de bovinos de corte (Rosa & Cardoso, 1987). Os fosfatos brutos de rocha apresentaram-se, assim, como uma alternativa de suplementação de P, para bovinos, dado o seu custo inferior aos das fontes convencionais. Sua aparente abundância no território nacional, fez com que se vislumbresse a perspectiva de seu uso corrente. Há, todavia, duas restrições principais ao seu uso: a baixa disponibilidade do fósforo e os proporcionalmente elevados teores de flúor (Viana, 1986).

Apesar de polêmico, o uso desta fonte de fósforo para animais produtivos vem sendo difundido no Brasil, calcado em experimentos que levam em conta apenas parâmetros de avaliação econômica. Poucos são os trabalhos que procuram estabelecer o impacto sobre a saúde animal.

Além disso, as avaliações apenas clínicas da fluorose e com base nos critérios da National Academy of Sciences-NAS (Effects..., 1974) são consideradas falhas, por levar em conta apenas as alterações macroscópicas do esmalte. Outras estruturas dentárias (dentina e cimento) e o osso apresentam alterações típicas (Krook et al, 1983), quase sempre não demonstráveis clinicamente.

A maioria dos trabalhos, visando estudar a toxicidade do flúor para animais, envolve a adição de fluoretos à dieta, sendo poucos aqueles que utilizam os fosfatos de rocha (Ammerman et al, 1964).

O presente trabalho teve por objetivo verificar, histologicamente, os efeitos do fornecimento contínuo de fosfatos brutos de rocha sobre o dente e osso de ratos (*Ratus ratus*).

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado originou-se de animais estudados por Couto (1987), segundo descrição sumariada a seguir.

Cento e doze ratos albinos, desmamados, de ambos os sexos e da linhagem Holzmann foram distribuídos em sete tratamentos, com duas repetições de quatro machos e uma de quatro fêmeas cada uma, por tratamento. Os animais foram alojados em gaiolas metálicas, separados por sexo, e alimentados com uma dieta básica, contendo 20% de proteína bruta, 3.015 kcal de energia metabolizável/kg, 0,4% Ca e 0,5% P, acrescida de fosfato de Araxá (FA), fosfato de Patos de Minas (FP) ou fosfato de Tapira (FT), em quantidade suficiente para fornecer 0,15 ou 0,25% de P disponível suplementar. No grupo controle, a única fonte de fósforo foi aquela fornecida pela dieta básica.

A caracterização dos tratamentos, bem como a estimativa dos teores de flúor fornecidos, constam da Tab.1. A Tab. 2 mostra a estimativa dos teores de Ca, P e F ingeridos, bem como os valores da ingestão de P disponível, nos fosfatos testados.

Tabela 1 - Caracterização dos tratamentos

Tabela 2 - Consumos médios diários da dieta, fósforo total, fósforo disponível, cálcio e flúor, por tratamento.

Tratamento	Dieta g/dia	P		Ca g/dia	F mg/dia
		P total g/dia	disponível g/dia		
CF	11,50	0,046	0,0379	0,0736	0
CM	17,70	0,0708	0,0584	0,1133	0
A1F	13,49	0,0643	0,0522	0,0951	5,2489
A1M	16,05	0,077	0,0626	0,1139	6,9348
A2F	12,51	0,0726	0,0487	0,1264	8,1690
A2M	18,25	0,1059	0,0712	0,1843	11,9172
P1F	13,55	0,065	0,528	0,1029	4,8915
P1M	16,50	0,0792	0,0644	0,1254	5,9565
P2F	11,93	0,0692	0,0465	0,124	7,1699
P2M	17,38	0,1009	0,0678	0,1807	10,4453
T1F	13,15	0,0631	0,0513	0,1118	3,2086
T1M	13,93	0,0669	0,0543	0,1184	3,3989
T2F	13,27	0,0769	0,0158	0,1712	5,4008
T2M	16,63	0,0965	0,0649	0,2145	6,7684

Fonte: Couto (1987)

Ao final de 16 semanas, os animais foram sacrificados, sendo a metade dos animais destinada ao presente estudo. A Tab. 3 mostra os escores médios da avaliação clínica da fluorose, àquela época.

Tabela 3 - Concentração de flúor das dietas e média dos escores da fluorose dentária, às 16 semanas de experimento, por fontes e níveis de suplementação de fósforo disponível

Fontes	Nível de suplementação (% P disponível)	F (ppm)	Escore clínico
Araxá	0,15	392	4,52
	0,25	653	4,50
Patos	0,15	361	4,43
	0,25	601	4,72
Tapira	0,15	244	3,06
	0,25	407	3,64

Fonte: Couto (1987)

O presente trabalho envolveu, então, 56 ratos: quatro fêmeas e quatro machos de cada tratamento. Destes, foram colhidos os ossos do crânio e da face, incluindo-se os dentes, em um só bloco, que foi fixado em formalina a 10%, neutra e tamponada, por um período de sete dias e, então, descalcificado em ácido fórmico a 10%, tamponado com citrato de sódio para pH 4,5, sob vácuo moderado. Após total descalcificação, determinada radiograficamente, foram obtidos fragmentos de 0,5 cm de espessura da maxila e da mandíbula (plano transversal ao nível dos dentes incisivos centrais e molares M1, M2 e M3). Os fragmentos obtidos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, seccionados a 5 micrômetros, corados pela hematoxilina-eosina (Luna, 1968) e examinados ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame microscópico do dente e do osso alveolar, foram observadas lesões de fluorose em todos os animais suplementados com os fosfatos brutos de rocha, corroborando os achados clínicos de descoloração e mosqueamento do esmalte, a partir da 3ª semana, nos fosfatos de Araxá e Patos de Minas e, da 4ª semana, no fosfato de Tapira, e de fluorose progressiva severa (desgaste dentário excessivo e alongamento dos incisivos), a partir da 6ª semana, apenas no fosfato de Araxá (Couto, 1987).

Na zona odontogênica da polpa dentária, que normalmente é composta por células colunares altas (Avery, 1978), havia picnose dos odontoblastos e vacuolização de seu citoplasma (Fig. 1A). A camada de pré-dentina era hipomineralizada e irregular, alternando áreas espessas e delgadas, provavelmente como reflexo da ação tóxica do flúor sobre os odontoblastos, impedindo-os de secretar matriz normal e francamente mineralizável (Jubb et al, 1985). Achados também constantes foram o de dentina globular (Fig. 1B) e proliferação de tecido conjuntivo fibroso denso na polpa dentária, considerados típicos da fluorose e descritas também em vacas que ingeriram compostos de rochas fosfáticas com altos teores de flúor (Maylin et al, 1987).

No cimento, havia hiper cementose e retardamento da cementólise cementocítica. A hiper cementose, caracterizada por espessamento exagerado e irregular do cimento, foi observada em todos os animais, à exceção daquelas fêmeas recebendo fosfato de Tapira no nível de 0,25% de P disponível. Na maioria dos animais, era focal e mais acentuada no ápice da raiz (Fig. 2A), mas distribuía-se ao longo de toda a junção cimento-dentina, em machos recebendo fosfato de Araxá no nível de 0,25% de P disponível. Diferencialmente, nos animais controle, o cimento mostrava cementólise acelerada e grandes escavações (Fig. 2B). O retardamento da cementólise cementocítica, a causa mais provável da hiper cementose, demonstrava-se por cementócitos inativos, pouco volumosos, alojados em lacunas estreitas e sem basofilia do anel lacunar. Krook (1988) afirma que o flúor é tóxico tanto para o cementócito quanto para o cementoblasto, mas preferencialmente para o cementócito ativo (reabsorçivo). A lesão tóxica do cementoblasto não foi um achado comum, indicando ser a hiper cementose realmente o resultado do desequilíbrio entre a aposição e a reabsorção, pelo retardamento desta última.

Das fontes testadas, o fosfato de Tapira era a que fornecia menor teor de flúor (Tab. 1), o que poderia explicar a ausência de hipercementose nas fêmeas recebendo aquela fonte, principalmente se se considerar que fêmeas em crescimento normalmente têm menor velocidade de metabolismo dos tecidos mineralizados. Por outro lado, o fosfato de Araxá forneceu os maiores teores de F, daí a acentuada hipercementose nos animais deste grupo, em especial nos machos.

De forma análoga, o osso alveolar mostrou retardamento da osteólise osteocítica. Havia inatividade dos osteócitos, bem como sinais evidentes de sua degeneração. Eram inúmeras as linhas de cimentação finas e regulares que, nos animais dos tratamentos A1M, A1F, A2F, T1M E T2F (Tab. 1), conferiam ao osso um aspecto de mosaico. Este mesmo aspecto do osso alveolar é descrito na intoxicação de bovinos pelo flúor (Obel & Ernie, 1971; Krook et al, 1983). Entretanto, a lesão mais notável do osso alveolar foi a osteonecrose, também descrita em outras espécies (Krook et al, 1983, Riet-Corrêa et al, 1986). Extensas áreas do osso mostravam lacunas osteocíticas vazias (sinal inequívoco da necrose óssea), tumefação (Fig.3) e desintegração da matriz, principalmente nas cristas interdentária e interradicular. Assim, nas cristas alveolares predominava a osteonecrose e, na porção cortical, o retardamento da osteólise osteocítica e o aspecto de mosaico. Se se considerar a diversidade da velocidade do fluxo ósseo, em cada porção do osso alveolar (Krook et al. 1970) – mais rápido na primeira, pelo predomínio de osso lamelar (esponjoso) e mais lento na segunda, pelo predomínio de osso osteônico (compacto) – e, ainda, a predileção do flúor por células mais ativas, torna-se fácil entender o aspecto diferente da lesão em cada uma delas. Assim, enquanto a porção lamelar já apresenta uma resposta ao efeito necrosante do flúor, a osteônica ainda demonstra apenas a ação inibidora do elemento sobre a reabsorção óssea. Apesar da intensidade da necrose óssea, a atividade osteoclástica estava reduzida e restrita às áreas com evidente desintegração da matriz.

Foi possível, ainda no osso alveolar, sentir-se os efeitos, já enfatizados por Krook et al (1983) e Maylin et al, (1987), do flúor sobre os osteoblastos. Havia redução do número e da atividade destas células, com superfícies ósseas, às vezes, desnudas ou recobertas por células fusiformes. Entretanto, em algumas áreas podiam ser vistas hiperplasia osteoblástica focal e bandas de osteóide (matriz óssea não mineralizada). Este estímulo parcial à atividade osteoblástica pode ser creditado à perda óssea, pela necrose (Jubb et al, 1985), levando à proliferação de células pouco madu-

ras e com pouca capacidade de sintetizar matriz normal e mineralizável. Alguns autores, entretanto, enfatizam o efeito estimulador do flúor sobre os osteoblastos prolongadamente expostos a doses próximas às consideradas tóxicas (Gruber & Baylink, 1991). Sua atuação seria a de prolongar ou incitar a ação mitogênica dos fatores de crescimento, levando à proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Caso isso fosse verdadeiro, no presente caso, não seria de se esperar que células diferenciadas produzissem matriz anormal e pouco mineralizável. Assim, a hiperplasia osteoblástica observada seria realmente uma resposta fisiológica do osso à injúria tóxica, levando-o à necrose.

Considerando-se os escores médios da avaliação clínica da fluorose, às 16 semanas (Tab.2), houve diferença de intensidade na manifestação da intoxicação - menor para o fosfato de Tapira, embora o quadro histológico não a tenha confirmado. Como, pelos critérios da NAS (Effects..., 1974), leva-se em consideração apenas as lesões do esmalte e, pela avaliação histológica, a dos outros tecidos mineralizados (dentina, cemento e osso), é possível haver esta disparidade. Entretanto, há de se levar em consideração, quando da avaliação clínica da fluorose, que o cemento e a dentina acumulam muito mais flúor e em maior velocidade que o esmalte (Shearer et al, 1980), provavelmente pela taxa metabólica de cada um, já que Narita et al, (1990) encontraram variações da distribuição do flúor também no osso: maior no osso lamelar (maior fluxo) e menor, no osteônico (menor fluxo).

O encontro de lesões da fluorose de magnitude semelhantes em todos os animais examinados, independentemente da dose de flúor ingerida e da fonte, demonstra que o exame histológico é mais sensível em determinar a toxicose. Comprova ainda que as três fontes testadas provavelmente possuem quantidades de flúor disponível capazes de induzir à fluorose dentária e óssea.

A disponibilidade do flúor é variável conforme a fonte e também com a quantidade de cálcio ingerida concomitantemente (Gruber & Baylink, 1991). Embora as fontes e o fornecimento de cálcio de cada uma delas tenham sido diferentes, o comportamento dos tecidos mineralizados foi o mesmo. Considerando-se as concentrações de Ca e F nos fosfatos testados (Fosfato de Araxá = 22,39%Ca e 1,6%F; Fosfato de Patos de Minas = 20,59%Ca e 1,71%F; Fosfato de Tapira = 34,03%Ca e 1,36%F), pode se inferir que a resposta idêntica ao flúor tenha sido influenciada pela



Figura 1A. Polpa dentária, rato do tratamento A1M (macho, fosfato de Araxá, 0,15% P disponível). Vacuolização do citoplasma de odontoblastos. HE, 125x.

Figura 1B. Dentina, rato do tratamento P2M (macho, fosfato de Patos de Minas, 0,25% P disponível). Dentina globular. HE, 125x.

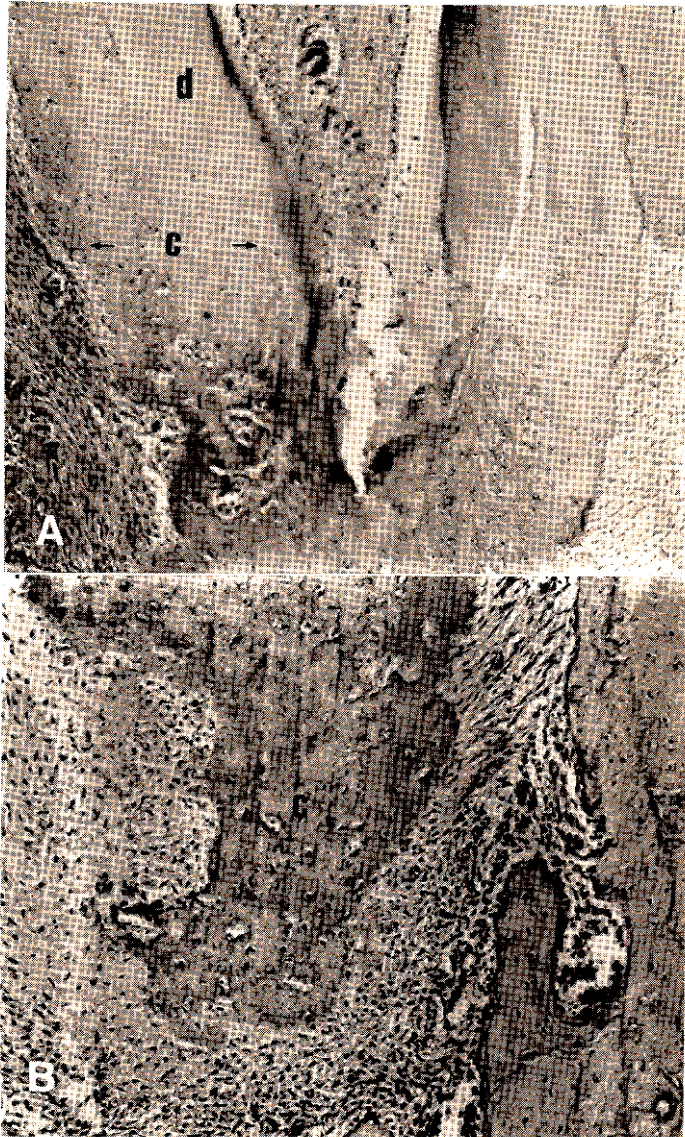


Figura 2A. Cimento (c) e dentina (d), rato do tratamento A2F (fêmea, fosfato de Tapira, 0,25% P disponível). Hiper cementose. HE, 25x.

Figura 2B. Cimento (c), rato do tratamento CM (macho, controle). Escavação do cimento. HE, 40x.



Figura 3 - Osso alveolar, rato do tratamento T1M (macho, fosfato de Tapira, 0,15% P disponível). Necrose e tumefação da matriz óssea. HE, 125x.

concentração de cálcio. Assim, no estudo de fontes de fósforo não processadas, talvez seja necessário a determinação não só do fósforo disponível, mas também do cálcio. Da mesma forma, o estabelecimento dos limites de flúor de uma dieta ou suplemento mineral deveria levar em consideração também a razão Ca:F e não só a razão P:F.

No presente estudo, quantidades acima de 244 ppm (menor quantidade de flúor ingerida) foi tóxica, mas não letal, para ratos, embora a DL_{50} oral para a espécie tenha sido estabelecida em 80-114ppm (Gruber & Baylink, 1991).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a ingestão continuada de dietas suplementadas com fosfatos de Araxá, Patos de Minas e Tapira provocam fluorose dentária e óssea, de magnitude semelhante, em ratos. Sugerem

que o exame histológico é mais eficiente na avaliação de fontes alternativas de fósforo para animais e que a adoção dos fosfatos brutos de rocha na alimentação animal, com base apenas em dados de biodisponibilidade de fósforo, nível de flúor e dados clínicos, deve ser considerada com reserva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMERMAN, C.B., ARRINGTON, L.R., SHIRLEY, R.L., et al. Comparative effects of fluorine from soft phosphate, calcium fluoride and sodium fluoride on steers. *J. Anim. Sci.*, v. 23, p. 409-413, 1964.
- AVERY, J.K. Dentina. In: BHASKAR, S.N. (ed.). *Histologia e embriologia oral de Orban*. 8.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1978. p. 107-142.
- COUTO, O.B. *Biodisponibilidade do fósforo em concentrados de rochas fosfáticas e fluorose em animais de laboratório*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1987. 95 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).
- EFFECTS of fluoride in animals. Washington: National Academy of Sciences, 1974. 64 p.
- GRUBER, H.E., BAYLINK, D. The effects of fluoride on bone. *Clin. Orthop.*, n. 267, p. 265-277, 1991.
- JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 3ª ed. San Diego: Academic Press, 1985. v.1, p. 1-85: Bones and joints.
- KROOK, L. Doenças metabólicas do osso. *Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG*, n. 3., p. 1-66, 1988.
- KROOK, L., BÉLANGER, L.F., HENRIKSON, P.A. et al. Bone flow. *Rev. Can. Biol.*, v. 29, n. 2., p. 157-167, 1970.
- KROOK, L., MAYLIN, G.A., LILLIE, J. et al. Dental fluorosis in cattle. *Cornell Vet.*, v. 73, n. 4, p. 340-362, 1983.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology*. 3.ed. New York: MacGraw-Hill, 1968. 258 p.
- MAYLING, G.A., ECKERLIN, R.H., KROOK, L. et al. Fluoride intoxication in dairy calves. *Cornell Vet.*, v. 77, n. 1, p. 84-98, 1987.
- NARITA, N., KATO, K., NAKAGAKI, H. et al. Distribution of fluoride concentration in rat's bone. *Calcif. Tissue Int.*, v. 46, n. 3, p. 200-204, 1990.
- OBEL, A.L., ERNIE, K. Bovine fluorosis in Sweden. *Acta Vet. Scand.*, v. 12, n. 12, p. 164-184, 1971.

- RIET-CORRÊA, F., MENDEZ, M.D.C., SCHILD, A.L. *et al.* Lesões dentárias em bovinos e ovinos devidas à poluição industrial causada pela combustão de carvão. *Pesq. Vet. Bras.*, v.6, n. 1, p. 23-31, 1986.
- ROSA, I.V., CARDOSO, J.L.A. Fósforo, fosfato de rocha e fluorose em bovinos. *Bol. Pesq. EMBRAPA/CNPQC*, n. 4, p. 7-33, 1987.
- SHEARER, T.R., BRITTON, J.L., DESART, D.J. *et al.* Microhardness of molar teeth in cattle with fluorosis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 4, n. 9, p. 1543-1545, 1980.
- VIANA, J.A.C. Fontes de sais minerais para bovinos e o desafio de suplemento de fósforo no Brasil. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n. 1, p. 47-64, 1986.