



Utilização de análise proteômica para estudo da Fluorose Óssea

Bianca Golzio Navarro Cavalcante¹; Rafael Mafaldo Bezerra¹; Rayanne Rilka Pereira da Silva²; Consuelo Fernanda Macedo de Souza¹; Maria Soraya Pereira Franco da Silva¹

¹Universidade Federal da Paraíba; ²Universidade Federal de Campina Grande – msorayapf@hotmail.com

RESUMO: Fluorose esquelética ou óssea é uma condição clínica endêmica em pelo menos 25 países do mundo. Essa morbidade é prevalente na Índia e em várias outras regiões da Ásia, como a China, além de alguns países da África, constituindo-se de um importante problema de saúde pública. A ingestão de água potável constante contendo níveis elevados de flúor, pode levar à toxicidade crônica, ocasionando a fluorose óssea. O diagnóstico desta doença é difícil, devido às semelhanças dos sinais e sintomas aos de outras doenças ósseas. Quanto ao fluoreto, sua toxicidade, ou ação preventiva, é decorrente de diversas interações enzimáticas presentes. O objetivo dessa revisão é mostrar a importância da identificação das diferenças na expressão proteica, através da análise proteômica, tornando possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos e o conhecimento molecular da doença. Realizou-se uma revisão da literatura obtida em banco de dados eletrônicos (BIREME, MEDLINE, SciELO, BBO, LILACS) dos últimos 20 anos. Para melhor compreensão, optou-se por dividi-la em: Flúor, Fluorose Óssea e considerações moleculares acerca da fluorose óssea. O flúor tem impacto relevante para a saúde da cavidade oral, todavia, quando as concentrações ultrapassam os valores recomendáveis, o fluoreto pode causar reações indesejáveis. No Brasil, existem relatos de indivíduos com fluorose óssea no sertão paraibano. Suas características clínicas incluem imobilização das articulações, exostose, osteoesclerose, osteoporose e pode chegar até ao comprometimento neurológico e deformidades incapacitantes. Deste modo, a análise proteômica proporciona entendimento da fisiologia normal, e dos mecanismos das doenças, sendo útil para a descoberta de biomarcadores para detecção precoce de doenças e identificação de novas terapias. Espera-se que com a identificação de proteínas envolvidas no metabolismo do flúor, possamos identificar indivíduos mais vulneráveis à fluorose óssea.

Palavras-chave: Fluorose óssea, Flúor, Proteoma.

INTRODUÇÃO

Fluorose esquelética ou óssea é uma condição clínica endêmica em pelo menos 25 países do mundo. Essa morbidade é prevalente na Índia e em várias outras regiões da Ásia, como a China, além de alguns países da África, constituindo-se de um importante problema de saúde pública (EVERETT, 2011; PECKHAM; AWOFOESO, 2014).

Estima-se que mais de 260 milhões de pessoas em todo o mundo, com a maioria vivendo em países tropicais, consomem água contendo altas concentrações de F⁻, em níveis maiores que 3 mg F⁻/L.

A ingestão de água potável constante e prolongada contendo níveis muito elevados de flúor, pode levar à uma toxicidade crônica, ocasionando a fluorose óssea, doença metabólica crônica de difícil diagnóstico. A principal consequência desta doença é aumentar a densidade óssea, gerando endurecimento das articulações e causando sintomatologia dolorosa, dificuldade de locomoção, podendo chegar à incapacidade, alterações metabólicas e deformidades. Um dos problemas encontrados para a



realização do diagnóstico dessa patologia, é a semelhança dos sinais pré-clínicos aos de outras doenças ósseas metabólicas e não metabólicas.

No que concerne à alteração em nível molecular, a literatura não descreve com precisão as ações do flúor no organismo humano, havendo relatos que sugerem que o flúor inibe enzimas presentes em variadas reações, mas ocasionalmente o mesmo estimula a atividade das enzimas. Portanto, sua toxicidade, ou mesmo sua ação preventiva, é decorrente dessa interação com enzimas. A exemplo, o efeito anticárie do flúor é derivado em parte de sua capacidade de perturbar as enzimas de bactérias cariogênicas. Estudos relatam que o fluoreto interfere, através dessa relação com as enzimas, nas principais vias metabólicas do sistema biológico, podendo causar várias alterações bioquímicas (IANO, 2012; PECKHAM; AWOFESO, 2014).

Desse modo, o flúor pode agir anexando-se a íons metálicos localizados no sítio ativo de uma enzima, ou através da formação de ligações de hidrogênio que competem no sítio ativo enzimático (PECKHAM; AWOFESO, 2014).

Estima-se que 66 enzimas podem ser afetadas pela ingestão de flúor, podendo, portanto, interagir com uma vasta gama de processos celulares mediados por enzimas, incluindo os relacionados com a resposta ao estresse, metabolismo, ciclo celular, comunicações célula-célula, e transdução de sinal (PECKHAM; AWOFESO, 2014).

O efeito deletério do flúor sobre as células depende da concentração (micromolar a milimolar), duração da exposição, e do tipo de célula envolvida (indiferenciadas ou diferenciadas). Nesse contexto de interação enzimática, o fluoreto inibe a secreção e/ou síntese de proteínas e influencia distintas vias de sinalização envolvidas na proliferação e apoptose (EVERETT, 2011). Entretanto, há controvérsias quanto ao efeito dependendo da dose. Na concentração de ordem micromolar, o fluoreto induz a apoptose de células de várias linhagens, bem como induz alteração da resposta imunológica. Relatos indicam que em nível micromolar é considerado um agente anabólico porque promove proliferação celular, enquanto que, em concentrações milimolares inibe várias enzimas, incluindo fosfatases, *in vivo* e *in vitro*. Outra ação visualizada é a formação de radicais livres em ingestão de altos níveis de fluoreto, o que pode levar a danos teciduais e outras complicações secundárias (IANO, 2012).

As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, que ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, fatores de crescimento, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (PECKHAM; AWOFESO, 2014).



Dessa forma, o objetivo dessa revisão é mostrar e disseminar a importância da identificação das diferenças na expressão proteica, através da pesquisa proteômica, que torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução de tratamento. Através desse estudo pode-se perceber o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo e entendimento da função de proteínas em diferentes amostras biológicas, especialmente para fluorose, neste caso.

Estudos que possibilitem o conhecimento de técnicas, que visem o mapeamento, do ponto de vista biológico, físico-químico e molecular com atenção especial para estudo com espectrometria de massa, que pode possibilitar o acompanhamento da concentração de flúor (elemento causador da fluorose óssea), são importantes para o conhecimento molecular da doença, fomentando assim o conhecimento de como se comporta essa morbidade e, dessa forma, possibilitar a formação de políticas públicas de prevenção para essa doença.

2 METODOLOGIA

Foi realizada uma ampla revisão da literatura obtida em banco de dados eletrônicos (BIREME, MEDLINE (PubMed), SciELO, BBO, LILACS) afim de identificar estudos que avaliassem vários aspectos de proteoma e fluorose óssea. Foram também incluídos na pesquisa, alguns livros-texto notadamente citados nessa temática em um período de 20 anos, bem como, teses, dissertações e relatórios de pesquisa sobre o tema no banco de dados CAPES e CNPq.

Para seleção dos descritores recorreu-se a consulta ao DECs e ao MeSH. Utilizou-se ainda o operador lógico “AND” para combinação dos descritores e termos para busca ativa nas bases. Os termos em inglês foram utilizados nas cinco bases, e os em português na BIREME, SciELO e BBO. Para a pesquisa na base de dados eletrônica, foram usadas palavras chaves como: “Fluorose óssea” (“*skeletal fluorosis*”), “flúor” (“*fluoride*”), “Proteoma e “espectrometria de massas”. Os artigos selecionados foram inicialmente fichados e classificados segundo sua temática principal. Após leitura dos resumos e dos artigos, essa classificação foi verificada e discutida pela equipe de pesquisadores. Obedecendo as seguintes etapas 1) identificação da questão norteadora 2) seleção da amostragem; 3) categorização dos estudos 4) avaliação dos estudos 5) discussão e interpretação dos resultados; 6) apresentação da revisão.

Os estudos considerados relevantes foram avaliados pelo revisor principal e por um co-revisor, a fim de discutir a inclusão ou exclusão no presente estudo. Os estudos não foram



codificados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após leitura criteriosa dos artigos nas bases de dados nos referidos bancos de dados, realizou-se o fichamento catalográfico do material bibliográfico.

Dessa forma, com o intuito de dinamizar a leitura e compreensão dessa revisão, optou-se por dividi-la em três tópicos principais: 1. Flúor; 2. Fluorose óssea e 3. Considerações moleculares acerca da fluorose óssea.

1. *Flúor*

Flúor (F) é um elemento químico, pertencente ao grupo VII A ou 17 da tabela periódica dos elementos químicos, também chamado de halogênios. É o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela. É apresentado sob a forma de moléculas covalentes apolares F_2 , nas quais cada átomo de flúor atinge uma configuração eletrônica de oito elétrons na camada mais externa este elemento químico descoberto no ano de 1886 por Henri Mossan, está incluído como componente natural da biosfera (RAMIRES; BUZALAF, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS/ WHO (2006), o flúor pode ser encontrado naturalmente em concentrações variadas na comida, água, ar e no solo. Além de ser encontrado em produtos odontológicos e bebidas por vezes, é considerado um elemento químico importante para os tecidos mineralizados do corpo e o seu uso apropriado acarreta benefícios para a integridade óssea e dentária. Desse modo, tem impacto positivo e relevante para a saúde (SOUZA, 2012).

Todavia, quando as concentrações de F ultrapassam os valores recomendáveis, seja por administração crônica quanto aguda, o fluoreto pode causar reações indesejáveis. Tais efeitos se devem ao nível de exposição a essa substância, e não a substância propriamente dita (WHITFORD, 2008). Seus efeitos preventivos ou mesmo terapêutico, tornam-se inócuos causando reações indesejáveis. Dessa forma, os efeitos colaterais crônicos do flúor, ocorrem pela administração de doses pequenas e constantes, atingindo principalmente os tecidos mineralizados (FEJERSKOV, 2011; EKSTRAND, BURT, 1996; CARVALHO, 2007).

Portanto, o flúor é um elemento químico que é capaz de prevenir uma doença e provocar outra, a depender da concentração na qual é empregado. Desse paradoxo, surge o dilema ético do flúor. Logo, o íon flúor é o único elemento químico capaz de promover a prevenção da cárie dentária e, simultaneamente, provocar o aparecimento da fluorose (CARVALHO, 2007).

2. *Fluorose óssea*



Fluorose esquelética ou óssea (FO) é uma doença óssea causada pelo consumo em excesso de fluoreto, e endêmica em pelo menos 25 países em todo o mundo, sendo o mais grave difundido na Índia e na China. Países como o Paquistão Bangladesh, Argentina, Estados Unidos da América, Marrocos, países do Oriente Médio, Japão, Países da África do Sul, Nova Zelândia e Tailândia foram identificados com o problema da fluorose. No Brasil já existem relatos de indivíduos com esta condição clínica no alto sertão Paraibano. No entanto, acredita-se que a baixa prevalência e incidência dessa doença possa ser devido ao pouco conhecimento sobre essa ela a similaridade com outras patologias ósseas comuns (SOUZA, 2012).

As causas mais comuns incluem a inalação de poeiras ou fumos de fluoreto por trabalhadores de indústria, o uso de carvão como uma fonte de combustível interior, e consumo de fluoreto a partir de água potável (SIDDIQUI et al 2007). Mais de 260 milhões de pessoas em todo o mundo consomem água potável com uma concentração de fluoreto acima do que 3,0 mg F/L.

A fluorose óssea pode ser classificada em seis estágios de severidade crescente: fase assintomática, fase sintomática inicial, fase esquelética estabelecida, fase de complicações, fase de enfraquecimento e fase de incapacitação. As características clínicas da fluorose esquelética incluem imobilização das articulações e uma combinação de outras discrepâncias, como exostose, osteoesclerose, osteomalácia e osteoporose. O joelho vago (“genu varum”) e exostose dos joelhos (“Knock knee”) também são encontradas na Fluorose Esquelética (CARVALHO, 2007; LEMOS et al., 2013; PECKHAM, AWOFOESO, 2014; SAMPAIO, 2010).

A sintomatologia em pessoas com fluorose esquelética é variável dependendo do grau de alteração. Pode ser assintomático, onde as mudanças são visíveis apenas em Raio-X. No início do quadro de FO, os pacientes queixam-se frequentemente de um vago desconforto e parestesia nos membros e no tronco. A maioria dos casos mais avançados, desenvolve dores ósseas progressivas e rigidez de todo o corpo. Cifose progressiva e limitação de movimentos tornam-se aparentes, piorando progressivamente para o estado mais grave debilitante de fluorose incapacitante (REDDY, 2007).

Comprometimento neurológico é relatado no estágio avançado da doença, devido à compressão das raízes da medula espinhal e nervos, separadamente ou por combinação, e geralmente se desenvolve depois da exposição elevada ao fluoreto durante mais de 10 anos (SIDDIQUI et AL, 2007).

Face ao exposto, essa doença, em meio às suas características, afeta a qualidade de



vida de diversos moradores das localidades onde essa problemática é evidente, principalmente em comunidades rurais onde as fontes de água potável são limitadas e possuem alta concentração de flúor natural para seu consumo.

3. Considerações moleculares da Fluorose óssea

3.1 Aspectos acerca de proteoma

O proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um dado momento, sendo constantemente alterado pelas interações bioquímicas entre o genoma e o ambiente. Seu conhecimento em indivíduos com fluorose óssea, é útil para compreender a influência molecular quanto à presença de biomarcador específico que induz alteração no padrão de expressão proteica de indivíduos expostos a alta concentração de flúor (KOBAYASHI, 2011).

A utilização da análise proteômica para avaliar a toxicidade do fluoreto, é algo extremamente recente na literatura, tendo sido publicado poucos manuscritos. O primeiro trabalho publicado foi realizado por Thongboonkerd e colaboradores (THONGBOONKERD et al., 2002), onde foi avaliado se o fluoreto produziria alterações no padrão de expressão proteica de *Streptococcus pyogenes*. Para isso, as bactérias foram expostas a 5 mM de fluoreto de sódio e a análise proteômica revelou que o fluoreto afetou proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa, virulência e imunogenicidade do *S. pyogenes* (KOBAYASHI, 2011).

Uma vez que o fluoreto interfere nas principais vias metabólicas do sistema biológico, ele pode causar alterações bioquímicas e/ou moleculares e algumas variáveis influenciam os efeitos tóxicos dele na via metabólica, como idade, deficiência de cálcio, magnésio e/ou vitamina C, distúrbios ácido-básico, presença de problemas cardiovasculares ou renais, alterações genéticas, temperatura ambiente, entre outros, fazendo com que algumas pessoas sejam mais sensíveis à utilização desse íon e seus compostos, uma vez que são fatores que podem agravar ou reduzir os efeitos no organismo humano (DHAR; BHATNAGAR, 2016; SAMPAIO, 2010).

Deste modo, a análise proteômica completa gera novas hipóteses para um melhor entendimento da fisiologia normal, bem como dos mecanismos das doenças, sendo de grande utilidade para a descoberta de biomarcadores para detecção precoce de doenças, identificação de novas terapias e descoberta de novas drogas. Neste sentido, poderia ser empregada na análise da expressão diferencial de proteínas em tecidos corporais após a ingestão de doses excessivas de fluoreto (LEITE, 2010).

A análise global das proteínas tem-se constituído de múltiplas técnicas que abrangem



não somente seu aspecto funcional no contexto celular, (microscopia eletrônica e confocal, análise de interações entre proteínas, cristalização de proteínas, dentre outras) como também técnicas que abrangem o isolamento e identificação de proteínas em larga escala (cromatografia líquida, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas).

Os métodos para a quantificação de proteínas são geralmente baseados nas alterações de intensidade dos íons, (áreas ou alturas dos picos dos peptídeos na cromatografia), e/ou na contagem dos espectros das proteínas identificada após análises de MS/MS.

Quando se refere ao método, a análise proteômica quantitativa livre de marcadores, incluem os seguintes passos fundamentais: Preparo da amostra (extração da proteína, redução, alquilação e digestão); separação dos peptídeos utilizando cromatografia líquida uni ou bidimensional (LC ou LC/LC) e análise por MS/MS; análises dos dados incluindo identificação peptídeos/proteína; quantificação, e análise estatística (SOHN, W. et. al, 2009).

A análise proteômica permite saber se um gene está sendo expresso, a concentração relativa desse produto, as modificações que podem ocorrer nas proteínas após a sua tradução. Além de mostrar como os processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (GALDOS, 2009).

Enquanto o proteoma indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo. O proteoma não é uma característica fixa de um organismo. A mesma altera com o estado de desenvolvimento, do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra. Portanto, há muito mais proteínas no proteoma do que genes no genoma, especialmente para eucariotos (HULKA, 1996).

3.2 Utilização da espectrometria de massas para caracterização e identificação da fluorose óssea

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa. De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização, moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas, os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados (DENBESTEN, 2011).

Considerando que a maioria das proteínas, na sua forma íntegra, são muito grandes



para serem corretamente identificadas pela espectrometria de massa, as mesmas precisam ser submetidos a uma digestão enzimática, geralmente feita com tripsina, originando fragmentos peptídicos com massas moleculares previsíveis que são analisadas por espectrometria de massa (CARVALHO, 2007).

Diante das possíveis combinações de aminoácidos, peptídeos distintos são gerados após a ação da protease usada, gerando uma “impressão digital das massas de peptídeos” (*peptide-mass finger printing - PMF*) para cada proteína (TEOTIA et al., 2004).

A utilização de análise proteômica para o conhecimento e entendimento da fluorose óssea poderá subsidiar futuras investigações que possam fornecer um conjunto potente de ferramentas para o estudo a nível molecular e celular em larga escala da função genética diretamente relacionado com a fluorose óssea em indivíduos expostos à alta dosagens de Flúor.

4 CONCLUSÕES

Considerando que a Fluorose Óssea (FO) é definida como uma doença óssea metabólica crônica causada pela inalação ou ingestão prolongada de quantidades elevadas de fluoreto, a sua sintomatologia pode simular outras patologias. Dessa forma, muitos indivíduos encontram-se em risco de desenvolver a doença, e em outros a doença não fora diagnosticada corretamente.

Como o efeito deletério do flúor sobre as células depende da concentração, duração da exposição, e do tipo de célula envolvida, e o fluoreto inibe a secreção e/ou síntese de proteínas e influencia distintas vias de sinalização envolvidas no processo celular, a utilização da análise proteômica poderá mostrar como os processos metabólicos, regulatórios e de sinalização ocorrem nessa morbidade, permitindo uma maior compreensão dessa patologia.

Com isso, o entendimento da doença com a utilização dessa metodologia, possibilitará a detecção precoce de FO constituindo o ponto chave do tratamento para pacientes com fluorose óssea.

Este trabalho representa um passo inicial de estudo molecular com a possibilidade de introduzir a análise proteômica em indivíduos portadores de fluorose óssea. Espera-se que com a identificação de proteínas envolvidas nos processos metabólicos do flúor, possamos elucidar o metabolismo desse íon, bem como identificar indivíduos mais vulneráveis à fluorose óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



CARVALHO, T. S.; KEHRLE, H. M.; SAMPAIO, F. C. Prevalence and severity of dental fluorosis among students from João Pessoa, PB, Brazil. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 21, n. 3, p.198-203, 13 abr. 2007.

DENBESTEN, P.; LI, W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. **Monographs in oral Science**, v. 22, p. 81-96, 2011. doi:10.1159/000327028. dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6):489-93.

DHAR, V.; BHATNAGAR, M. Physiology and toxicity of fluoride. **Indian Journal of Dental Research**, v. 20, n. 3, p. 350-355, jul./set. 2009.

EKSTRAND, J.; BURT, B. A. Fluoride in Dentistry. Munksgaard. 2. ed. v. 10, p. 167-184.1996.

EVERETT, E.T. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 5, p. 552-560, Mai. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144112/>>. Acesso em: 20 Ago. 2016.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. Segunda. São Paulo.: Santos., 2011. 616.

HULKA, B. Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologists. **Cancer Epidem Biomarkers Prev**, v.1, n.1, p.13-19. 1991.

IANO, F. G. **Efeito da ingestão crônica do fluoreto sobre o sistema oxidante/antioxidante de ratos**. 2012. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru. São Paulo, 2012.

KOBAYASHI CAN, Belini MR, Italiani FM, Pauleto ARC, Julianelli de Araújo J, Tessarolli V, Grizzo LT, Pessan JP, Machado MAAM, Buzalaf MAR. Factors influencing fluoride ingestion from dentifrice by children. **Community Dent Oral Epidemiol** 2011; 39: 426–432. 2011

LEITE, AF. **Correlação entre os índices radiomorfométricos de radiografias panorâmicas e a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB. Brasília, 2007.

LEMOS, G. C. et al. Desempenho ponderal de bovinos Nelore suplementados com fontes



alternativas de fósforo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 188-192, fev. 2013.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 22 Ago. 2016.

PECKHAM, S.; AWOFOSE, N. Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-10, fev. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956646/>>. Acesso em: 12 Ago. 2016.

RAMIRES, I.; BUZALAF, M. A. R. Histórico do Uso de Fluoretos em Saúde Bucal. In: BUZALAF, Marília Afonso Rabelo. **Fluoretos e Saúde Bucal**. São Paulo: Santos, 2008. Cap. 1. p. 1-10.

REDDY, D. Raja; Neurology of endemic skeletal fluorosis. **Neurology India** Disponível em: <<http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=00283886;year=2009;volume=57;issue=1;page=7;epage=12;aulast=Reddy>>. 2009. Acesso em 01 de Maio de 2017.

Reis - Bauru, 2007. 162 p.; il.; 30cm.

SAMPAIO, F. C. et al. Natural fluoride levels in the drinking water, water fluoridation and estimated risk for dental fluorosis in a tropical region of **Brazil**. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 71-75, 2010.

SIDDIQUI, M.; et al. Fluorosis: a rare cause of spinal Cord compression. **Pakistan Journal of Neurological Sciences**. v. 2, n. 4, p. 217-219, 2007.

Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/275088_FLUOROSIS_A_RARE_CAUSE_OF_SPINAL_CORD_COMPRESSION>. Acesso em: 10 jun. 2016.

SOHN, W; NOH, H; A BURT, B. Fluoride ingestion is related to fluid consumption patterns. **Journal Of Public Health Dentistry**, Michigan, v. 4, n. 69, p.267-275, 2009.

SOUZA, C. F. M. et al. Assesment of groundwater quality in a region of endemic fluorosis in the northeast of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 11, p. 1-11, nov. 2012.

TEOTIA, S. P. S.; TEOTIA, M.; SINGH, K. P. Highlights of Forty Years of Research on Endemic Skeletal Fluorosis in India. In: **International Workshop on Fluorosis and Defluoridation of Water**, 4, 2004, Colombo. Workshop. Sri Lanka: ISFR, 2004. p 107-125. Disponível em: <<http://www.de-fluoride.net/4thproceedings/107-125.pdf>>. Acesso em: 10



jun. 2016.

THONGBOONKERD, V., GOZAL, E., SACHLEBEN, L.R., JR, ARTHUR, J.M., PIERCE, W.M., CAI, J., CHAO, J., BADER, M., PESQUERO, J.B., GOZAL, D., KLEIN, J.B..Proteomic analysis reveals alterations in the renal kallikrein pathway during hypoxia-induced hypertension. **Journal of Biology Chemistry**. 277, 34708/ 34716, 2002.

WHITFORD, G. M. Fluoride toxicology and health effects. In: FEJERKOV, O.; XIANG, Q.; et al. **Serum fluoride and skeletal fluorosis in two villages in Jiangsu province, China**. Fluoride 2005;38(3):178-184.

World Health Organization (WHO). **Fluoride in Drinking-water** by J. Fawell, K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell and Y. Magara. London, UK, 2006.

