



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO NÃO CLÍNICA DO EFEITO
DO IÃO FLUORETO SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA**

Trabalho submetido por
Arminda Maria Braz Vilares
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CONTRIBUTO PARA A AVALIAÇÃO NÃO CLÍNICA DO EFEITO
DO IÃO FLUORETO SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA**

Trabalho submetido por
Arminda Maria Braz Vilares
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.º Doutor José João Baltazar Mendes

e coorientado por
Prof.º Doutor Rui Manuel Amaro Pinto

setembro de 2020

Às Minhas Marias,

todo este esforço foi por vocês e para vocês, que seja um exemplo.

Ao Pedro,

um milhão de palavras!

Ao meu Pai,

no infinito, mas certa do seu orgulho.

À minha Mãe,

sem ti, não seria possível.

Ao meu Batalhão profissional,

pela paciência, destes cinco duros anos!

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico nunca está alheado de colaborações pessoais e de apoios, que se revestem de particular importância e ênfase no decurso de todo o trabalho de investigação. Assim, não poderia deixar de agradecer a todos que estiveram presentes nesta caminhada de grande intensidade.

Em especial ao Prof. Doutor José João Mendes, dirijo as minhas primeiras palavras, por me ter aberto as portas, pela orientação e suporte dado no decorrer deste projeto de investigação, por me ter acolhido e acreditado.

À sua equipa Mestre Vanessa Machado, uma palavra de reconhecimento pelo apoio, carinho e partilha de conhecimento científico tão oportunamente demonstrado, salientado eficiência e disponibilidade sempre presentes e ao Mestre João Botelho pela disponibilidade e conselhos.

Ao Prof. Doutor Rui Pinto, meu mentor na caminhada profissional, um exemplo de conhecimento e dedicação, coorientador deste projeto de investigação. Abriu-me as portas do seu conhecimento científico e do seu elevado saber-saber e saber-fazer.

Ao Prof. Doutor João Rocha, pela disponibilidade e dedicação, sempre presente nos momentos importantes da minha vida académica. À Prof.^a Doutora Vanessa Mateus, pelo exemplo, disponibilidade e conquistas.

À minha dupla, um especial agradecimento por estes dois últimos anos. Uma ótima companhia e um excelente colega de trabalho. Sem a sua ajuda certamente teria sido muito mais difícil. Muito obrigada Nelson! Ao amigo Pedro Ferreira, uma irmandade nesta caminhada. Um enorme obrigada!

Às colegas e amigas Carolina, Filipa e Sofia, ficam as merecidas palavras de reconhecimento na preciosa ajuda nos momentos mais difíceis e na amizade, certa para a vida.

Ao amigo Sérgio Paulino, pela paciência e estima de longos anos, os seus conselhos e estímulo marcam de um modo inquestionável a concretização deste objetivo. À amiga e colega Doutora Elisabete Valério pelo acompanhamento, revisão científica, amizade e paciência.

À Dr.^a Cristina Domingos, pelas suas qualidades, pela presença constante em pequenos gestos e palavras, acima de tudo por acreditar em mim, sem a sua compreensão, não teria sido possível. À amiga e colega Sílvia Pinto, pela sua bondade e amizade. A sua capacidade de trabalho e dedicação foi um grande veículo nesta caminhada.

Por fim, porque os últimos são sempre os primeiros, um agradecimento muito especial à minha família, por aquilo que são e representam para mim e porque sem eles nada disto teria sentido. Foi por vocês e para vocês!

Ao exemplo da minha vida (mãe), pela força e dedicação. Um enorme obrigada!

RESUMO

Introdução: A ingestão de doses significativas de ião fluoreto pode desencadear manifestações de natureza toxicológica. A fluorose dentária é um efeito colateral indesejável da ingestão excessiva de fluoreto. Para além dos efeitos negativos sobre o desenvolvimento dos dentes, uma exposição crónica e não-controlada a concentrações elevadas deste ião pode ter consequências nefastas noutros locais do organismo, nomeadamente nos órgãos reprodutores masculinos. No entanto, existe uma falta de consenso sobre os efeitos que o ião fluoreto nos órgãos de reprodução masculina.

Objetivo: Avaliar o efeito da ingestão reiterada do ião fluoreto na função e estrutura dos órgãos reprodutores masculinos de duas espécies de roedores.

Materiais e Métodos: Estudou-se o efeito da administração reiterada de fluoreto de sódio (NaF) (1mg/Kg/dia e 10mg/Kg/dia), durante 28 dias, na fertilidade dos ratinhos Charles River, através da medição de indicadores de fertilidade masculina (peso dos epidídimos, peso e capacidade secretória das vesículas seminais e avaliação do número e da mobilidade dos espermatozoides) e da realização de um teste de fertilidade, cruzando machos tratados e fêmeas não tratadas, assim como o efeito do ião fluoreto sobre a contratilidade do canal deferente de rato.

Resultados: A administração reiterada de ião fluoreto a ratinho e rato induz modificações no padrão de mobilidade dos espermatozoides e conduz à acumulação deste ião no epidídimo. O ião fluoreto promove o aumento da contratilidade do canal deferente em doses baixas, mas induz uma diminuição desta resposta em doses/concentrações altas.

Conclusões: O ião fluoreto interfere na modulação da fertilidade masculina em roedores. Este facto assume particular importância, uma vez que hoje em dia são prescritos em larga escala suplementos de flúor com o fim de prevenir a cárie dentária. Futuramente, torna-se necessário avaliar a concentração de ião fluoreto no organismo humano e as suas implicações na fertilidade masculina.

Palavras-chave: Flúor; Fertilidade; Epidídimo; Espermatozoides.

ABSTRACT

Introduction: Ingestion of significant doses of fluoride ion may trigger manifestations of toxicological nature. Dental fluorosis is an undesirable side effect of excessive fluoride intake. However, in addition to the undesirable effects on normal tooth development, chronic and uncontrolled exposure to this ion can also have harmful consequences on other parts of the body, for example in male reproductive organs. However, there is a lack of consensus about the effect of fluoride in male reproductive organs.

Objective: Evaluate the effect of the repeated administration of fluoride ion in the function and structure of male reproductive organs in two species of rodents.

Materials and Methods: The effect of the repeated administration of NaF (1 mg/Kg/day; 10 mg/Kg /day) was evaluated during 28 days, on the fertility of Charles River mice, through the measurement of male fertility indicators (weight of the epididymis, weight and secretory capacity of the seminal vesicles and evaluation of the number and mobility of epididymal sperm) and the performance of a fertility test using Wister rats, crossing between treated male and untreated females, as well as the effect of fluoride ion on the contractility of the rat vas deferens.

Results: The repeated administration of fluoride ion to mice and rats induces changes in the sperm motility pattern and leads to the accumulation of this ion in the epididymis. Fluoride ion promotes increased contractility of the vas deferens at low doses but induces a decrease in this response at high doses / concentrations.

Conclusions: The fluoride ion interfere in the modulation of male fertility in rodents. This fact is of particular importance, since fluoride supplements are prescribed on a large scale to prevent dental caries. In the future, it is necessary to evaluate the concentrations of fluoride in the human body, and its implications in human males fertility.

Keywords: Fluorine; Fertility; Epididymis; Sperm.

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO	15
1.	Natalidade e fecundidade	15
1.1.	Etiologia e biomarcadores associados à diminuição da fertilidade e infertilidade masculina	16
1.1.1.	Espermatozoides	17
1.1.2.	Canal Deferente	18
1.1.3.	Epidídimo	21
1.1.4.	Vesículas Seminais	22
1.1.5.	Teste de Fertilidade	22
2.	Flúor	22
2.1.	Distribuição do flúor pelo meio ambiente	22
2.2.	Utilização dos fluoretos como estratégia de prevenção em saúde oral	25
2.2.1.	Mecanismos de ação cariostática do Flúor	26
2.2.2.	Fluorose Dentária	28
3.	Metabolismo do Flúor no Organismo Humano	28
3.1.	Farmacocinética	29
3.1.1.	Absorção	29
3.1.2.	Distribuição	34
3.1.3.	Excreção	35
3.2.	Toxicologia do Flúor	36
3.2.1.	Toxicidade aguda	37
3.2.2.	Toxicidade crónica	38
II.	OBJETIVOS DO ESTUDO	41
III.	TRABALHO EXPERIMENTAL	43

FASE 1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO IÃO FLUORETO NO POTENCIAL REPRODUTOR DE RATINHO _____	43
FASE 2 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE BIOMARCADORES DE FERTILIDADE MASCULINA EM RATO APÓS ADMINISTRAÇÃO REITERADA DE NaF _____	57
FASE 3 - ESTUDO DO EFEITO DO IÃO FLUORETO NA CONTRATILIDADE DO CANAL DEFERENTE _____	69
IV. CONCLUSÕES FINAIS _____	77
V. PERSPETIVAS FUTURAS _____	81
VI. BIBLIOGRAFIA _____	83

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 -Representação esquemática de um espermatozoide humano (Ilustração oferecida por Sérgio Paulino, INSA, 2020)._____ 18
- Figura 2 - Aparelho reprodutor masculino: canal deferente (Ilustração oferecida por Sérgio Paulino, INSA, 2020)._____ 19
- Figura 3 - Estrutura do canal deferente. Corte transversal. 1: Fibras musculares longitudinais internas; 2: Fibras musculares circulares; 3: Fibras musculares longitudinais externas (Adaptado de Koslov, 2013). _____ 20
- Figura 4 -Distribuição do flúor pelo meio ambiente (Adaptado de Smith & Hodge, 1979). _____ 23
- Figura 5 - Teores de fluoretos nas águas de abastecimento da rede pública das 275 sedes de Concelhos de Portugal Continental (Adaptado de Pinto, 1998 – imagem autorizada). _____ 25
- Figura 6 - Variação da concentração plasmática de fluoretos ao longo do tempo, após administração de um bólus intravenoso de três miligramas (Ekstrand et al., 1977). ____ 29
- Figura 7 - Concentrações plasmáticas de ião fluoreto após a ingestão de quatro doses diferentes, por um adulto. O controlo corresponde aos teores plasmáticos de fluoreto num indivíduo sujeito a uma dieta pobre neste ião (Adaptado de Ekstrand et al., 1977). __ 30
- Figura 8 - Concentrações plasmáticas de ião fluoreto após a ingestão de três miligramas em quatro situações distintas: administração endovenosa (I.V.), ingestão em jejum (P.O. jejum), ingestão feita em simultâneo com o consumo de um copo de leite (P.O. leite) e ingestão após pequeno-almoço rico em cálcio (P.O. pequeno almoço), (Adaptado de Ekstrand & Ehrnebo., 1979). _____ 31
- Figura 9 - Concentração plasmática de ião fluoreto em quatro situações distintas após ingestão de 3 mg deste ião (Ekstrand et al.,1990). _____ 32

Figura 10 - Variações das concentrações plasmáticas de íon fluoreto observadas em indivíduos expostos a diferentes teores de fluoreto, através da água que consomem (Ekstrand, 1978). _____ 33

Figura 11 - Câmara de contagem Makler utilizada para avaliação do número e da mobilidade dos espermatozoides. _____ 46

Figura 12 - Sistema computadorizado de análise de esperma. Hamilton Thorn Motility Analyser (HTM-C), constituído por um microscópio adaptado com objetivas de contraste de fase negativa, uma câmara de vídeo, um monitor e um computador com programa para análise de esperma. _____ 47

Figura 13 - Avaliação de alguns indicadores de fertilidade masculina no grupo controlo e no grupo tratado com NaF (10mg/kg/dia). A – peso relativo dos epidídimos; B – peso relativo das vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo; C – teor de frutose nas vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo; D - número de espermatozoides do epidídimo. (n=5). 50

Figura 14 - A – Movimento típico de um espermatozoide obtido de um epidídimo controlo. A seta assinala a cabeça do espermatozoide. O quadrado que inclui uma célula serve de referencial para se visualizar melhor o movimento progressivo do espermatozoide. B – Movimento típico de um espermatozoide obtido de um epidídimo tratado com NaF. A seta assinala a cabeça do espermatozoide. O círculo serve de referencial para melhor se observar o movimento circulatório do espermatozoide. __ 51

Figura 15- Avaliação da capacidade fecundante de ratinhos através do cruzamento de machos tratados com NaF (10mg/kg/dia), com fêmeas não tratadas. A – Número de fêmeas grávidas; B – número de partos ocorridos por dia; C – número de crias por parto; D – peso médio das crias por parto. _____ 52

Figura 16 - Curva de calibração obtida por regressão linear utilizando soluções com concentrações conhecidas de NaF (0,03 a 2,0 mg F⁻/L; $y = -55,31x + 174,02$; $r = 0,9967$). _____ 60

Figura 17 - Avaliação de alguns indicadores de fertilidade masculina no grupo controlo e nos grupos tratados com NaF (1 e 10mg/kg/dia). A – peso relativo das vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo. †P<0,05 vs NaF 1mg/kg/d; B – peso relativo dos epidídimos.

*P<0,05 vs controle; C – peso relativo dos testículos. *P<0,05 vs controle. †P<0,03 vs NaF 1mg/kg/d ; D - número de espermatozoides do epidídimo; E - teor de frutose nas vesículas seminais. *P<0,05 vs controle;(n=6). _____ 62

Figura 18 - Teores de ião fluoreto no grupo controle e nos grupos expostos ao NaF: A – testículos; B – epidídimos; C – razão testículo/epidídimo. *P<0,05 vs controle; (n=6).63

Figura 19 - Via não fosforilada de síntese da frutose nas vesículas seminais. _____ 65

Figura 20 - Via fosforilada de síntese da frutose nas vesículas seminais. _____ 66

Figura 21 - Efeito do NaF (100nM e 100µM) nas c.c.r. de NA (n=4, *P versus controle <0,05). _____ 72

Figura 22 - Efeito da ingestão do NaF (1mg/kg/dia e 10mg/kg/dia), durante 28 dias, nas c.c.r. de NA (n=9, *P versus controle <0,05). _____ 73

Figura 23 - Efeito do NaF sobre a liberação de noradrenalina, após estimulação com fenilefrina. Controle - 100% ([Phe]=0) = 292,8 ± 29,1 pg NE/100 mg; (*P <0,05, para tendência linear da curva controle, n=8). _____ 75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Razão entre as concentrações dos fluoretos nos diferentes tipos de tecidos e no plasma de rato, obtidas no estado estacionário (razão T/P), (Whitford et al., 1979).....	34
Tabela 2 - Casos de intoxicação por fluoretos ocorridos nos Estados Unidos da América entre 1989 e 1992 (Litovitz et al., 1993).	37
Tabela 3 -Recomendações sobre a suplementação da dieta das crianças com flúor baseadas nos teores de fluoretos presentes nas águas de consumo. Doses expressas em mg/dia (pinto, 1998).	39
Tabela 4 - Peso dos diferentes grupos de ratinhos no início e no fim do estudo (média ± erro padrão).....	49
Tabela 5 -Volume de água consumida por cada grupo de ratinhos, durante todo o protocolo experimental (média ± erro padrão).	49
Tabela 6 - Composição da solução-tampão e de ajustamento da força iônica - TISAB (total ionic strength adjustor buffer)	58
Tabela 7 - Ganho de peso corporal observado durante o período de 28 dias, para o grupo controle e para os grupos tratados com NaF (média ± erro padrão).	61
Tabela 8 - Volume de água e quantidade de ração consumida por cada dois ratos de cada grupo, durante todo o protocolo experimental (média ± erro padrão).....	61
Tabela 9 - Efeito do NaF nos parâmetros das curvas concentração-resposta obtidas com noradrenalina (média ± erro padrão).	72
Tabela 10 - Efeito da administração reiterada de NaF, durante 28 dias, nos parâmetros das curvas concentração-resposta obtidas com noradrenalina (média ± erro padrão).....	74

Lista de Abreviaturas

AAPCC – American Association of Poison Control Centers

ATP - Trifosfato de adenosina

BSA - Albumina bovina

c.c.r. - Curva concentração-resposta

$\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$ - Fluorapatite

Ca_2^+ - Cálcio

CaF_2 – Fluorite

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CASA - Computer-assisted sperm analysis

CDTA – Ácido 1,2 – ciclo – hexilenodiaminotetra acético

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

EUA - Estados Unidos da América

HF – Ácido Fluorídrico

HTM - Hamilton-Thorn Motility Analyser

ISF - Índice sintético de fecundidade

min - Minutos

$\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ - Fluorofosfato de sódio

$\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ – Fluorofosfato de sódio

Na_3AlF_6 – Criolite

NaF - Fluoreto de sódio

NO – Óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato

PKA - Proteína quinase

ppm - Partes por milhão

rpm - Rotações por minuto

SNC – Sistema nervoso central

TISAB – Total Ionic Strength Adjustor Buffer

VD – Canal Deferente

I. INTRODUÇÃO

1. Natalidade e fecundidade

Há já mais de quatro décadas que a fecundidade portuguesa está em franco declínio (Cunha, 2013). Se bem que a ritmos variáveis, e apesar da ligeira inversão da tendência em dois períodos muito localizados, o número médio de filhos por mulher – medido convencionalmente através do índice sintético de fecundidade (ISF) – passou de 3,00 filhos em 1970, uma fecundidade elevada, para 1,28 em 2012, um mínimo histórico que coloca Portugal entre os países menos fecundos da Europa e do mundo (Cunha, 2013).

Como momentos chave deste declínio, devido aos seus efeitos decisivos na paisagem demográfica portuguesa, destacam-se três datas: 1982, ano em que o ISF foi abaixo de 2,1 filhos, constituiu um primeiro marco de viragem, já que a substituição natural das gerações deixou de ser assegurada; 1994, ano em que o ISF se cifrou pela primeira vez abaixo de 1,5 filhos, que colocou Portugal entre os países de muito baixa fecundidade; e 2012, ano em que o ISF caiu abaixo de 1,3 filhos, projetando a fecundidade para um novo patamar, considerado perigosamente baixo (Cunha, 2013).

De forma geral, tem havido um consenso relativo ao impacto das incertezas económicas e do prolongamento do percurso escolar e académico como a força motriz do adiamento da fecundidade. Consequentemente, existe uma saída mais tardia da casa dos pais e/ou responsáveis legais e uma entrada mais tardia no mercado de trabalho, traduzindo-se no que Livi-Bacci (2001) intitulou de “síndrome do adiamento”.

As implicações do adiamento da fecundidade sugerem ter outras consequências para além daquelas que incidem sobre o ISF momentâneo. A diminuição da fecundidade e/ou infertilidade tanto masculina como feminina como consequência do adiamento é um dos problemas de Saúde Pública mais importantes atualmente (Rowland, 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é um fenómeno que afeta cerca de 12% dos casais de todo o Mundo (Lanius et al., 2010; Kaufmann et al., 1998; Pearce et al., 1999).

Se anteriormente a etiologia da infertilidade era considerada como sendo de responsabilidade feminina, atualmente é encarada de outra forma (Santos et al., 2004). As causas de infertilidade ligadas ao sexo masculino constituem cerca de 26 a 46% da

taxa de esterilidade conjugal, enquanto que os distúrbios femininos atingem cerca de 50%. A restante percentagem é associada a causas idiopática ou desconhecidas, que pode ser atribuída a eventuais mecanismos de reprodução que ainda hoje não se encontra devidamente estudada (Santos et al., 2004).

A diminuição das taxas de fertilidade um pouco por todo o mundo justifica a necessidade da realização de estudos de investigação no domínio da fecundidade e da reprodução humana que possibilitem o conhecimento dos fatores que nas áreas cultural, social, económica e/ou biológica podem condicionar aquelas taxas (Jégou, 1995).

1.1. Etiologia e biomarcadores associados à diminuição da fertilidade e infertilidade masculina

As taxas globais de infertilidade, realizado de 1990 a 2010 em 190 países, revelou 48,5 milhões de casais foram considerados como inférteis, dos quais 19,2 milhões e 29,3 milhões sofriam de infertilidade primária e infertilidade secundária, respetivamente. Os casais em países desenvolvidos foram mais frequentemente de infertilidade primária, enquanto nos países em desenvolvimento a infertilidade secundária era mais comum (Mascarenhas et al., 2012).

Os motivos da infertilidade podem ser encontrados em mulheres ou em homens, às vezes até em ambos. Geralmente, existem causas conjuntas de fatores masculinos e femininos para a infertilidade do casal. Em 10% a 15% dos casos, a etiologia da infertilidade continua sendo a infertilidade idiopática (Knez et al., 2016; Raheem & Ralph, 2011). Relativamente à infertilidade masculina, existem três tipos de etiologia: etiologia não-obstrutiva (onde o problema é a produção de esperma), etiologia obstrutiva (onde o problema é o transporte do esperma através do trato genital), e infertilidade coital (causada por distúrbios que impede a ereção e a ejaculação) (Knez et al., 2016; Raheem & Ralph, 2011).

A disfunção erétil e a infertilidade masculina são consideradas substitutas para a saúde geral, o primeiro é subjacente a doenças cardiovasculares e o último a doenças cancerígenas e não-cancerígenas. Está a surgir o conceito de que a disfunção erétil em homens inférteis pode ser um marcador precoce de problemas de saúde geral, assim como

os medicamentos usados para problemas gerais de saúde podem causar anomalias no esperma e disfunção sexual (Lotti & Maggi, 2018).

A infertilidade masculina é frequentemente causada por astenospermia, que é marcada pela diminuição da motilidade do esperma e morfologia anormal do flagelo do esperma (Liu et al., 2019a, Liu et al., 2019b). A astenospermia tem muitos motivos, principalmente a estrutura anormal do flagelo do esperma (Coutton et al., 2018; Ortega et al., 2011).

Em certos locais da Índia foram descritos uma elevada prevalência de doentes com problemas de fertilidade sobretudo masculina, traduzidos pelo aumento da incidência de homens estéreis (Chinoy e Narayana, 1994; Neelam et al., 1987). Nestas mesmas populações verificou-se que fluorose endémica devido ao teor de fluoretos presentes nas águas de consumo poder estar compreendido entre 10 e 25 ppm é muito prevalente (Ghosh et al., 2002). Contudo, o efeito da exposição ao ião fluoreto sobre a fertilidade masculina permanece por clarificar já que os resultados obtidos em investigações são por vezes contraditórios (Li et al., 1987; Sprando et al., 1996; Kumar e Susheela, 1994; Ghosh et al., 2002). A falta de consenso em torno dos efeitos que o ião fluoreto pode exercer sobre a função e estrutura dos órgãos de reprodução masculina, motivou a realização do trabalho experimental descrito desta tese.

1.1.1. Espermatozoides

Os espermatozoides são células altamente especializadas que, por possuírem uma série de características funcionais e estruturais específicas, têm a capacidade única de transmitir a informação genética paterna ao ovócito (Eddy, 2006). Anatomicamente, o espermatozoide é composto por cabeça, peça intermédia e a cauda (ou flagelo) (Figura 1) (Sutovsky & Manandhar, 2006), e possuem cerca de 60 µm de comprimento, 55 µm dos quais pertencem ao flagelo (Eddy, 2006). O reduzido volume celular permite aumentar as propriedades hidrodinâmicas dos espermatozoides, facilitando desta forma a fertilização do ovócito (Sutovsky & Manandhar, 2006).

A motilidade espermática é altamente dependente de várias vias metabólicas e mecanismos regulatórios (Pereira et al., 2017). Além do envolvimento de defeitos génicos específicos, qualquer anormalidade desses fatores poderia ser responsável por casos de baixa motilidade espermática e, conseqüentemente, infertilidade (Pereira, 2017).

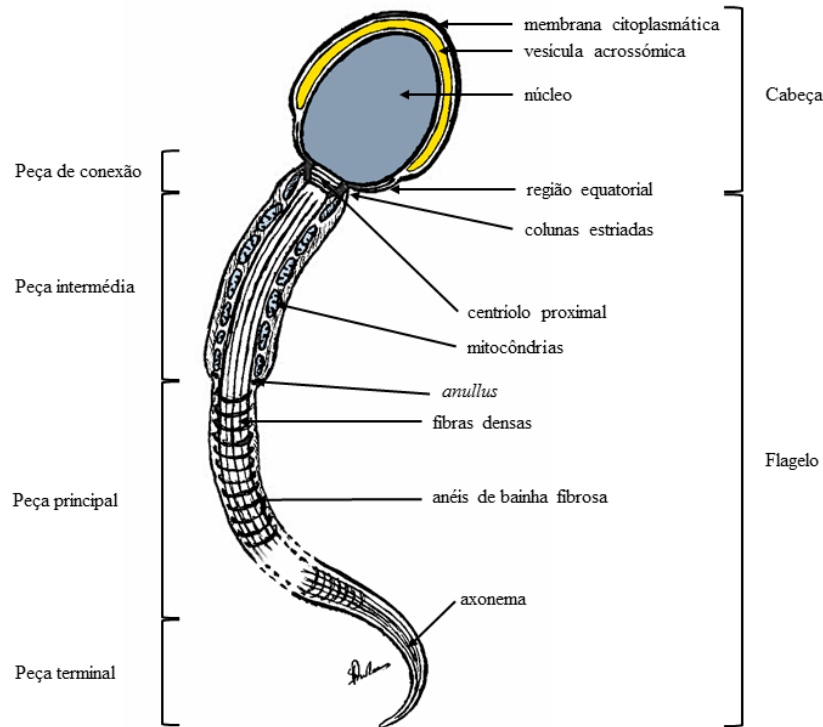


Figura 1 -Representação esquemática de um espermatozoide humano (Ilustração oferecida por Sérgio Paulino, INSA, 2020).

A via do cálcio (Ca^{2+}) e a via da proteína quinase ou proteína quinase A (PKA), dependente de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), são duas vias metabólicas importantes envolvidas na regulação da motilidade do esperma (Darszon et al., 2001 e 2006). Essas vias envolvem íons cálcio, adenilil ciclases, íons bicarbonato, diferentes canais de membrana e eventos de fosforilação. Todos são responsáveis pela aquisição de competências que permitirão aos espermatozoides fertilizar o oócito, nomeadamente capacitação, hiperatividade e reação acrossômica (Pereira, 2017).

1.1.2. Canal Deferente

O canal deferente é um conduto muscular que transporta os espermatozoides do epidídimo para a uretra (Koslov & Anderssen, 2013) (Figura 2). Este tecido específico tem sido utilizado nos avanços farmacológicos e fisiológicos do músculo liso (Koslov & Anderssen, 2013). Por outro lado, o canal deferente contribui para a secreção de fluido fundamental no transporte de esperma e possivelmente para a reabsorção de restos de espermatozoides do lúmen do ducto (Koslov & Anderssen, 2013).

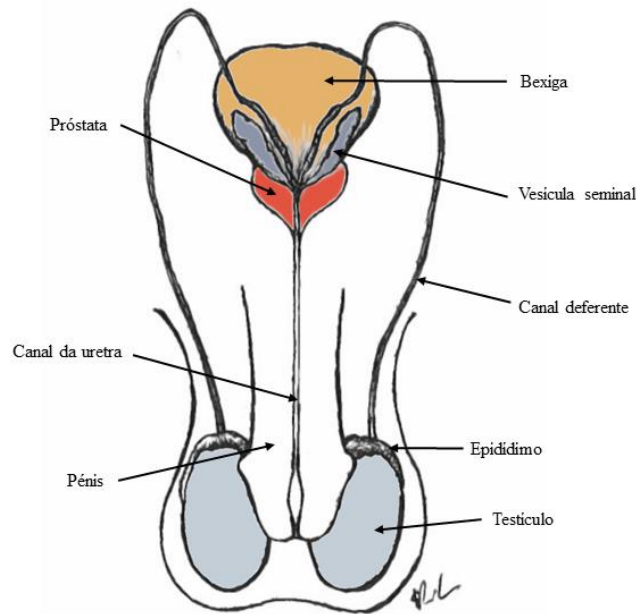


Figura 2 - Aparelho reprodutor masculino: canal deferente (Ilustração oferecida por Sérgio Paulino, INSA, 2020).

A estrutura geral e a função dos canais deferentes de humanos é semelhante às diferentes espécies animais (Steers, 1994; Dixon et al., 1998; Kaleczyc, 1998; Westfall & Westfall, 2001; Burnstock e Verkhatsky, 2010). O canal deferente é uma estrutura tubular com revestimento muscular, uma mucosa interna e uma adventícia externa. O revestimento do músculo liso, que pode ter uma espessura de 1–1,5 mm, consiste numa camada circular rodeada por camadas longitudinais interna e externa. A camada circular é a mais proeminente e forma uma espiral bem enrolada, enquanto as camadas longitudinais são formadas por feixes de músculos ligeiramente helicoidais. As células do músculo liso longitudinal externo têm até 30-40 μm de comprimento e 2-5 μm de diâmetro (Figura 3). Cada célula de músculo liso está intimamente associada a 6 - 12 outras células, com lacunas de 15–20 nm (Elbadawi & Goodman, 1980). A união e estreita intimidade celular permite a transmissão sináptica.

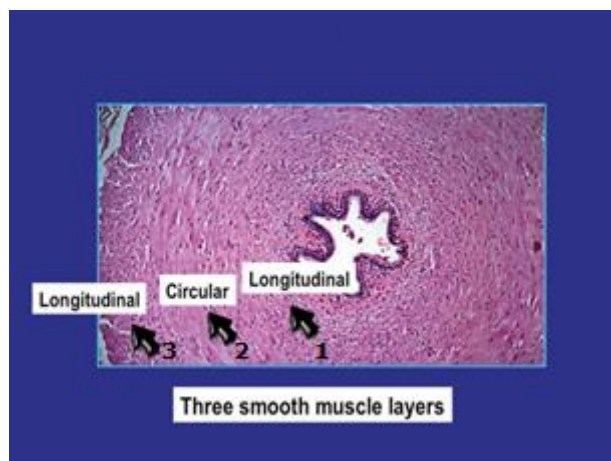


Figura 3 - Estrutura do canal deferente. Corte transversal. 1: Fibras musculares longitudinais internas; 2: Fibras musculares circulares; 3: Fibras musculares longitudinais externas (Adaptado de Koslov, 2013).

O lúmen dos canais deferentes é revestido por células epiteliais colunares com microvilosidades que se estendem para o lúmen (Dixon et al., 1998). A irrigação sanguínea é garantida pela artéria vesical inferior e a inervação é através de fibras nervosas pós-ganglionares autónomas originadas principalmente de neurónios nos gânglios pélvicos e, em menor extensão, neurónios no gânglio mesentérico caudal e gânglios da cadeia simpática, e também por fibras nervosas sensoriais originadas dos gânglios da raiz dorsal (Kaleczyc, 1998; Kihara et al., 1998; Burnstock & Verkhratsky, 2010). Em roedores, o nervo hipogástrico fornece inervação bilateral aos canais deferentes, e as respostas contráteis podem ser induzidas com estimulação hipogástrica de ambos os lados (Kihara et al., 1996; Harji et al., 1998).

A emissão de espermatozoides é o resultado de uma contração rítmica das estruturas musculares dos órgãos sexuais secundários masculinos, incluindo o canal deferente. Apesar da contração do canal deferente humano ser modulada por mecanismos adrenérgicos, muitos mediadores intervêm na libertação de noradrenalina a partir das terminações adrenérgicas (Steers, 1994). Estes mediadores podem ser fatores endógenos ou neurotransmissores, como a acetilcolina e o neuropeptídeo Y. Outros mediadores são capazes de modificar a contratilidade do canal deferente, seja por ação sobre a libertação dos neuromoduladores, seja por modificação da tensão basal deste órgão (Steers, 1994). Uma vez que múltiplas vias e mediadores podem interferir com a contratilidade do canal deferente, vários fármacos e algumas disfunções metabólicas podem influenciar direta ou indiretamente a funcionalidade do canal deferente e, em última análise, a fertilidade masculina (Steers, 1994).

A compreensão mais completa da farmacologia da inervação e do neurotransmissor no canal deferente indicou que é uma estrutura altamente complexa e, atualmente utilizado como um modelo de investigação para a co-transmissão sináptica (Koslov & Anderssen, 2013). Muitos medicamentos, principalmente os antagonistas α -adrenérgicos, têm efeitos na contratilidade e conseqüentemente na ejaculação normal. Devido aos efeitos colaterais significativos, a adesão dos pacientes pode ser diminuída (Koslov & Anderssen, 2013).

Os mecanismos adrenérgicos desempenham um papel importante na contração do músculo liso do canal deferente, mas muitas substâncias, como a libertação de neurotransmissores ou o tônus basal das camadas de músculo liso, são capazes de alterar sua contratilidade. A interferência com a função contrátil, como a que ocorre nos distúrbios metabólicos e após a toma de alguns fármacos prescritos para tratamento de distúrbios do trato urinário inferior, pode ter como efeito secundário a disfunção ejaculatória e, conseqüentemente, anejaculação. Desta forma, a possível interferência dos alguns fármacos destinados ao controle da ejaculação no canal deferente é de extrema importância e interesse científico uma vez que os canais deferentes isolados provaram ser uma das preparações mais úteis para o estudo de mecanismos fisiológicos básicos e os efeitos de fármacos (Koslov & Anderssen, 2013).

1.1.3. Epidídimo

Ao longo do desenvolvimento embrionário e pós-natal inicial, o epidídimo dos mamíferos modifica-se, passando de um tubo reto para um ducto complexo altamente enrolado que liga os ductos eferentes aos canais deferentes (Robaire et al., 2006). Evidências avassaladoras apontam para a importância desse tecido na maturação dos espermatozoides que são células imóveis na saída do testículo e, desta forma, são incapazes de fertilizar oócitos, e tornam-se células totalmente maduras que têm a capacidade de “nadar”, reconhecer e fertilizar (Robaire et al., 2006). Em condições saudáveis, a aquisição dessas funções é essencialmente concluída no momento em que os espermatozoides entram na cauda do epidídimo proximal (Robaire et al., 2006).

Um microambiente altamente especializado e específico da região é criado ao longo do lúmen do epidídimo pela secreção e absorção ativa de água, iões, solutos orgânicos e proteínas, bem como pela barreira sangue-epidídimo. O principal fator que regula a função epididimal são os andrógenos, mas evidências crescentes acrescentam importância também

aos estrógenos, retinóides e outros fatores, como fatores de crescimento, como reguladores específicos em todas as funções relatadas (Robaire et al., 2006).

Além da maturação do esperma, o epidídimo também desempenha um papel importante no transporte, concentração, proteção e armazenamento do esperma (Robaire et al., 2006). Deste modo, uma modificação neste parâmetro pode ser revelador de um efeito adverso do NaF sobre os epidídimos (Sprando et al., 1996).

1.1.4. Vesículas Seminais

Esta glândula sexual acessória parece desempenhar um papel fundamental na mobilidade dos espermatozoides (Elzanaty et al., 2002). Para além de ser responsável pela síntese de semenogelinas que promovem a coagulação do sémen no momento da ejaculação (Gonzales, 2001; Elzanaty, 2002), secreta frutose que tem sido referida como fonte de energia para promover a mobilidade dos espermatozoides (Gonzales, 2001). Deste modo, a avaliação do peso e do teor de frutose nas vesículas seminais podem servir como marcadores funcionais destas glândulas (Chinoy et al., 1991; Ghosh et al., 2002).

1.1.5. Teste de Fertilidade

A capacidade fecundante dos ratinhos tratados com uma substância suspeita de interferir com a fertilidade masculina (por exemplo o NaF) pode ser avaliada através do cruzamento com fêmeas não tratadas. O número de fêmeas que conseguirem engravidar, o dia do nascimento de cada ninhada, o peso e o número de ratinhos nascidos por ratinho fêmea constituem os parâmetros que podem ser avaliados para realização deste teste de fertilidade. Esta abordagem experimental foi também adotada por outros autores (Araibi et al., 1989; Collins et al., 2001; Chaithra et al., 2020), que estudaram o efeito do NaF sobre a capacidade reprodutora dos ratos.

2. Flúor

2.1. Distribuição do flúor pelo meio ambiente

O flúor é um elemento químico do grupo dos halogéneos (Grupo VIIA) da tabela periódica, de número atómico 9 e massa atómica de 18,998403 (Bettelheim et al., 2010). Devido à sua grande reatividade, o flúor não surge na natureza na sua forma elementar, mas combinado quimicamente sob a forma de fluoretos. Estes concentram-se nas últimas

fases de cristalização dos magmas pelo que as rochas silicosas e as alcalinas, as águas geotérmicas e as caldeiras de origem vulcânica são muito ricas nestes compostos (Fuge & Anderews,1988).

O flúor foi isolado pela primeira vez em 1886 por Moissan (Wisniak, 2002), sendo produzido atualmente, a partir da eletrólise da mistura de ácido fluorídrico anidro e fluoreto de potássio fundido (Glemser, 1986). Os fluoretos metálicos encontram-se na natureza sob a forma iónica apresentando, de uma maneira geral, elevada solubilidade em água com exceção dos fluoretos de lítio, alumínio, estrôncio, bário, magnésio, cálcio e manganês (Glemser, 1986). Os compostos covalentes de flúor são formados por elementos não metais como por exemplo, o tetrafluoreto de sílica e o hexafluoreto de enxofre (Glemser, 1986).

A distribuição dos fluoretos pelo meio ambiente está representada na figura 4. Na atmosfera, os fluoretos resultam da atividade vulcânica e da ação do vento sobre os solos ou sobre a superfície da água (Lee et al., 1974). Estes podem regressar à superfície terrestre por depósito resultante do efeito da chuva, da neve, das poeiras e do nevoeiro.

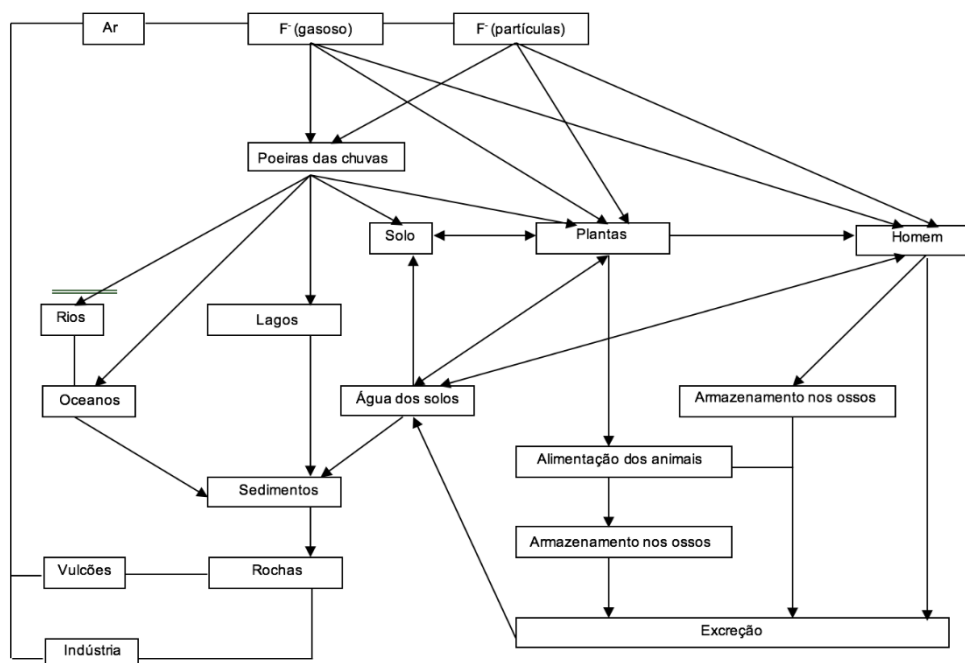


Figura 4 -Distribuição do flúor pelo meio ambiente (Adaptado de Smith & Hodge, 1979).

Uma vez nos solos os fluoretos podem sofrer filtração e, deste modo, serem arrastados para as águas quer em superfície quer em profundidade. Nas plantas, a sua presença

resulta da absorção ocorrida a partir dos solos, da água e da atmosfera (Sidhu, 1979; Weinstein & Davison, 2004). Os fluoretos podem regressar a estes pontos através da sua integração na cadeia alimentar do Homem e dos animais, ou por intermédio do metabolismo das plantas. Por outro lado, os compostos fluoretados entram nos processos industriais direta ou indiretamente a partir da acidificação de minerais contendo flúor ou de processos metalúrgicos. De entre as principais indústrias que libertam elevadas quantidades de fluoretos salientam-se as centrais termo elétricas, as indústrias produtoras de alumínio e de aço (Biersteker et al., 1977; Ozsvath, 2009), de fertilizantes contendo fosfatos, de ácido fosfórico e de fósforo, e a manufatura de vidros, cerâmicas e espelhos também nos produtos farmacêuticos (Davison, 1987, Fuge & Anderews, 1988, Haidouti et al., 1993, Matsui et al., 2007; Niu, et al., 2009; Mandinic, 2010; Barbier et al., 2010). Estes compostos possuem um grande impacto ambiental e na saúde humana e animal uma vez que são contaminantes ambientais persistentes (Matsui et al., 2007; Mandinic et al., 2010; Barbier et al., 2010).

Nas águas de abastecimento da rede pública, os fluoretos podem existir naturalmente ou resultar de um programa de fluoretação das águas (DGS, 2005). Como refere Domingos *et al.* (2018), “(...) A adição de flúor às águas de abastecimento público, como estratégia de saúde pública para prevenir a cárie dentária, teve início com três estudos pilotos em 1945 nos Estados Unidos da América (EUA) e no Canadá.”

Segundo o Departamento de Saúde e Serviços Humanos Federal dos Estados Unidos da América (2015), a fluoretação da água é atualmente reconhecida como o método mais eficaz, económico e abrangente de prevenção da cárie dentária, principalmente em locais onde a prevalência desta doença é elevada. A fluoretação da água é assim a medida preventiva da cárie dentária que apresenta o melhor custo-benefício para a Saúde Pública, quando utilizada na concentração ideal para cada região (Portela et al., 2016).

Em Portugal Continental, a determinação do teor de fluoretos nas águas de abastecimento da rede pública revelou que 263 sedes de concelho fornecem água com teores em fluoretos inferiores a 0,30 mg/L, 11 sede de concelhos abastecem a população com níveis de fluoretos compreendidos entre os 0,30 e os 0,60 mg/L e somente uma sede de concelho (em Vila Flor) apresenta um teor de fluoretos na água de consumo de 0,80 mg/L (Pinto, 1998) (Figura 5). A qualidade da água para consumo humano em Portugal encontra-se legislada através do Decreto-Lei n.º n.º 235/2017 de 7 de dezembro. Esta lei estabelece

que o teor de fluoretos nas águas para consumo humano o valor paramétrico deve ser inferior a 1,5 mg/L.

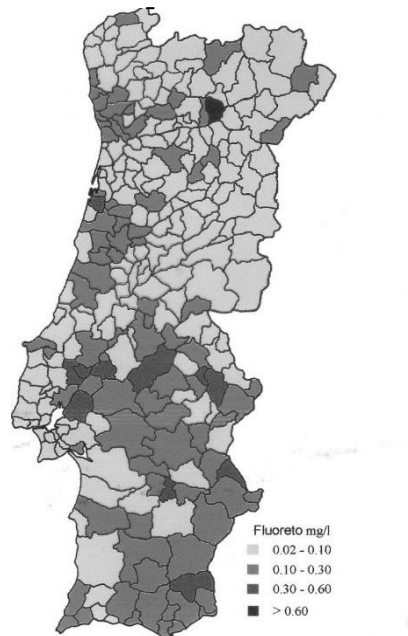


Figura 5 - Teores de fluoretos nas águas de abastecimento da rede pública das 275 sedes de Concelhos de Portugal Continental (Adaptado de Pinto, 1998 – imagem autorizada).

2.2. Utilização dos fluoretos como estratégia de prevenção em saúde oral

A cárie dentária é a doença crónica mais prevalente no mundo, e afeta uma proporção significativa da população mundial (Kassebaum et al., 2017). Na dentição permanente, a cárie dentária é a condição mais prevalente, afeta 34,1% da população mundial (2,5 bilhões de pessoas) de acordo com o estudo de carga de morbilidade global de 2015 (Kassebaum et al., 2017). Na dentição decídua, a cárie dentária é a décima condição mais prevalente, afeta 7,8% da população, ou seja, 573 milhões de crianças em todo o mundo (Kassebaum et al., 2017). As consequências da cárie dentária para a saúde são graves e esta doença também pode afetar muito a qualidade de vida de quem a sofre (Matamala-Santander et al., 2019).

Os benefícios do flúor no controlo da cárie dentária foram descobertos nas primeiras décadas do século XX, sendo desde então um útil aliado na prevenção da doença em Medicina Dentária. Vários foram os motivos para o uso do flúor, entre eles o seu baixo

custo, alta eficácia e grande variedade de métodos pelos quais pode ser administrado (Domingos et al., 2018). No decorrer do século XX, o flúor foi o principal agente utilizado no controlo da cárie dentária por todo o mundo, estando disponível às populações através de vários veículos com diferentes concentrações e modos de utilização (Santos, 2016).

Atualmente existem dois métodos aceites como eficazes na prevenção e terapêutica da cárie dentária, que são a fluoretação da água e a escovagem com dentífricos fluoretados (Rompano, 2006). O uso racional dos fluoretos na profilaxia da cárie dentária, com eficácia e segurança, baseia-se no conhecimento atualizado dos seus mecanismos de ação e da sua toxicologia.

Em Portugal foi realizado um estudo prospetivo numa população de idade pré-escolar, onde se aplicou o programa de Saúde Oral da Direção Geral de Saúde Escolar, tendo-se verificado que após dois anos de ingestão diária de comprimidos de 1 mg de fluoreto de sódio (NaF), as crianças de 6 anos apresentavam índices cariogénicos inferiores em aproximadamente 30% nos dentes tecíduos e cerca de 60% nos dentes definitivos, em comparação com o grupo controlo (Melo, 2001). Assim, de acordo com Leal e colaboradores (2015), o uso de flúor na forma de fluoreto ocupa um papel essencial na prevenção do aparecimento da cárie dentária, tendo contribuído para uma significativa redução na prevalência e severidade desta patologia em todo o mundo.

O século XX foi marcado, no âmbito da saúde oral coletiva, pela descoberta das possibilidades preventivas do flúor. O uso em larga escala em todo o mundo tornou possível beneficiar milhões de pessoas, protegendo-as da cárie ou diminuindo a severidade desta doença. A luta dos médicos dentistas contra a mutilação dentária teve no flúor um aliado fundamental, mas a continuidade do seu uso em ações de saúde pública requer medidas de vigilância sanitária cada vez mais precisas, sem as quais há risco de produção iatrogénica (Narvai, 2000).

2.2.1. Mecanismos de ação cariostática do Flúor

A ação cariostática do flúor parece ser conseguida, através de três mecanismos de ação tóxica (Featherstone, 2000; Featherstone, 1999; Miller et al., 2004; Jenkins, 1999; Triller, 1998; Ten Cate, 1999; Whitford et al., 2002): 1) Inibição do processo de desmineralização; 2) Potenciação do processo de remineralização; e 3) Inibição da ação da placa bacteriana. Estes mecanismos estão fortemente dependentes da concentração de

flúor na saliva, que é o veículo de transporte preferencial do flúor até aos dentes (Whitford et al., 2002). É mais importante a atividade do ião flúor no fluído oral do que a concentração do flúor no esmalte (Fejerskov, 2006).

O flúor incorporado durante o desenvolvimento mineral do dente em níveis normais de 20 e 100 ppm (mesmo em áreas de água potável com flúor ou com o uso de suplementos de flúor) não altera a solubilidade do mineral. Mesmo em níveis mais altos, como 1000 ppm nos micrômetros externos do esmalte, não há nenhum benefício mensurável contra a dissolução induzida por ácido. Somente quando está presente no processo de remineralização da apatite carbonatada é que o flúor consegue diminuir a solubilidade dos cristais e, se a dose de flúor for aumentada, a taxa de solubilidade desce logaritmicamente (Featherstone, 2000).

Neste caso, se o flúor estiver presente no fluído da placa na altura em que as bactérias produzem ácido, acompanhará o ácido na subsuperfície do dente adsorvendo-se à superfície do cristal e protegendo-o contra a dissolução. (Featherstone, 2000; Ten Cate, 1999). Este flúor, que se encontra no fluído da placa, provém dos suplementos tópicos, como por exemplo os produtos fluoretados (Featherstone, 2000).

A saliva, ao sustentar a desmineralização e iniciar a remineralização apresenta-se supersaturada de iões cálcio e fosfato (Jenkins, 1999). O flúor, presente na placa ou na saliva adjacente à placa, acelera a remineralização pois adsorve-se à superfície dos cristais e atrai os iões cálcio, seguido dos iões fosfatos, originando a formação de um novo mineral (Featherstone, 2000; Miller et al., 2004). Este novo mineral exclui os carbonatos, formando-se um cristal com uma composição entre a hidroxiapatite e a fluorapatite (Featherstone, 2000). Em resumo, se o flúor estiver disponível em baixas concentrações, por ação tópica, vai reforçar a remineralização através da rapidez na formação de uma nova superfície nos cristais desmineralizados da subsuperfície da lesão de cárie (Featherstone, 2000; Ogaard, 2001)

A nova superfície do cristal é tipo fluorapatite, que é muito menos solúvel do que a apatite carbonatada. Assim, os subseqüentes ataques ácidos terão de ser mais fortes e mais prolongados para dissolverem o esmalte remineralizado (Featherstone, 2000; Miller et al., 2004).

2.2.2. Fluorose Dentária

Estima-se que a fluorose endémica afete milhões de pessoas em todos os continentes (Fawell et al., 2006). A fluorose dentária é uma das várias manifestações crónicas da excessiva ingestão de flúor e está relacionada com a exposição a elevadas concentrações de fluoreto durante o período de formação do esmalte (amelogénese) (Verkerk, 2010). Esta exposição tem como consequência defeitos na mineralização do esmalte, com uma severidade proporcional à quantidade ingerida (Cangussu et al., 2002).

Para além da vertente estética, que se encontra fortemente ligada à fluorose dentária devido à diminuição da translucência e aumento da opacidade do esmalte, a alimentação do indivíduo que apresenta esta patologia fica também condicionada, já que devido à hipomineralização e aumento da porosidade do esmalte este torna-se frágil e mais propício a fraturas e a sensibilidade dentária (Lopes, 2012).

3. Metabolismo do Flúor no Organismo Humano

O Homem pode estar exposto ao flúor por uma via natural ou induzida (Ekstrand, 1996). A exposição natural ocorre devido ao contato com o flúor existente no meio ambiente, enquanto que a induzida pode resultar da fluoretação das águas de consumo ou da ingestão do flúor presente em alguns produtos de higiene oral ou especialidades farmacêuticas (Ekstrand, 1996). Apesar das suas propriedades benéficas no organismo, de uma forma sistémica e local nos dentes, até um valor de exposição, o flúor é considerado um elemento tóxico (Ekstrand, 1996). A ingestão de elevadas doses de fluoretos de forma aguda ou o inverso, isto é, baixas doses por longos períodos de tempo (forma crónica) podem causar distúrbios no organismo humano a nível gástrico e renal e também pode originar fluorose dentária e óssea, e em casos extremos pode provocar a morte (Ekstrand, 1996).

A compreensão dos efeitos biológicos do fluoreto a nível do organismo humano exige o conhecimento do seu metabolismo. De uma maneira geral, o plasma sanguíneo é considerado o compartimento central para os fluoretos sendo a partir deste compartimento que se realiza a distribuição e a eliminação dos fluoretos. Cerca de 50% da dose de fluoretos ingeridos são eliminados pela urina, sendo o restante incorporado em alguns tecidos, sobretudo no tecido ósseo. Os fluoretos não se ligam de forma irreversível aos tecidos, uma vez que se libertam durante a renovação óssea ou quando ocorrem alterações significativas

na ingestão diária de fluoretos. Durante o processo de distribuição dos fluoretos pelo organismo estabelece-se nos tecidos moles um equilíbrio entre a concentração intra e extracelular. Deste modo, qualquer alteração na concentração plasmática dos fluoretos pode conduzir a uma alteração deste equilíbrio fazendo com que este se desloque no sentido que permita o seu restabelecimento (Ekstrand, 1996).

3.1. Farmacocinética

Após a ingestão de uma determinada quantidade de fluoretos e a absorção, tanto a distribuição pelos tecidos moles, a sua utilização para mineralização de determinados tecidos como a excreção renal ocorrem em simultâneo. Contudo, a velocidade com que cada um destes fenómenos ocorre condiciona a concentração de fluoretos no plasma. A figura 6 ilustra a variação da concentração plasmática de fluoretos ao longo do tempo, após a administração de uma dose única de 3 mg (Ekstrand et al., 1977).

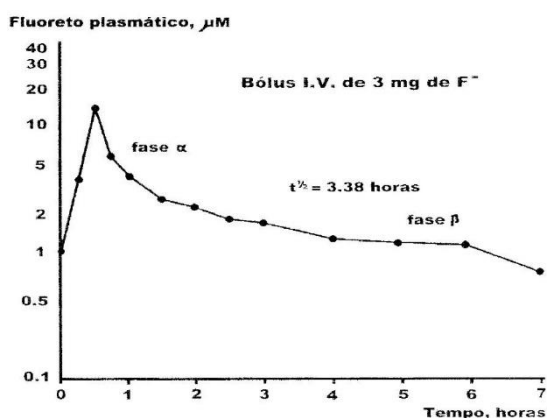


Figura 6 - Variação da concentração plasmática de fluoretos ao longo do tempo, após administração de um bólus intravenoso de três miligramas (Ekstrand et al., 1977).

3.1.1. Absorção

A principal via de absorção dos fluoretos é o trato gastrointestinal devido à dieta. Contudo, os fluoretos também podem ser inalados a partir do ar contaminado, ingeridos após a higiene oral com produtos fluoretados ou podem ser resultado da biotransformação de anestésicos que contêm flúor, como o halotano, o enflurano e o isoflurano (Ekstrand, 1977). A quantidade de flúor que é absorvida e que é capaz de exercer efeito sistémico depende da dose e das propriedades físicas e químicas do composto ingerido. A absorção do ião fluoreto ocorre rapidamente após a toma de um comprimido ou de uma solução de NaF, como ilustrado na figura 7.

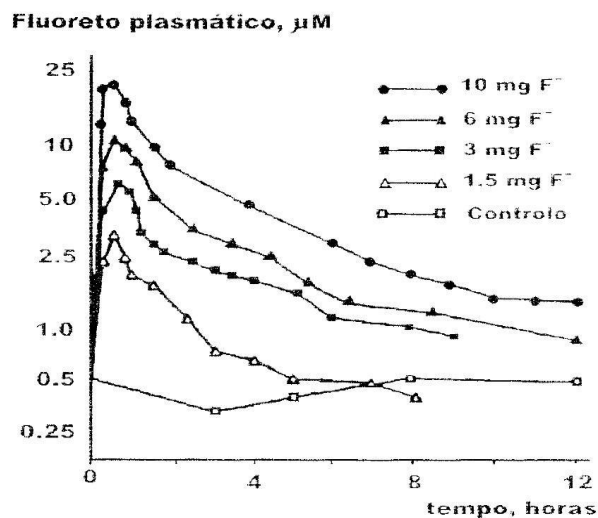


Figura 7 - Concentrações plasmáticas de ião fluoreto após a ingestão de quatro doses diferentes, por um adulto. O controlo corresponde aos teores plasmáticos de fluoreto num indivíduo sujeito a uma dieta pobre neste ião (Adaptado de Ekstrand et al., 1977).

O teor plasmático de fluoreto é mensurável alguns minutos após a toma de uma dose deste ião. O perfil farmacocinético do ião fluoreto mostra que o pico plasmático é dose dependente surgindo geralmente, 30 minutos após a ingestão de flúor (Ekstrand et al., 1977). Os compostos extremamente solúveis como o NaF são absorvidos praticamente na totalidade ao contrário do que sucede com os compostos com pouca solubilidade (Ekstrand, 1978; Spak et al., 1982). A absorção de fluoretos é influenciada pela presença de alimentos no trato gastrointestinal (Ekstrand & Ehrnebo, 1979 e 1980; Trautner & Einwag., 1989), como se pode observar na figura 8.

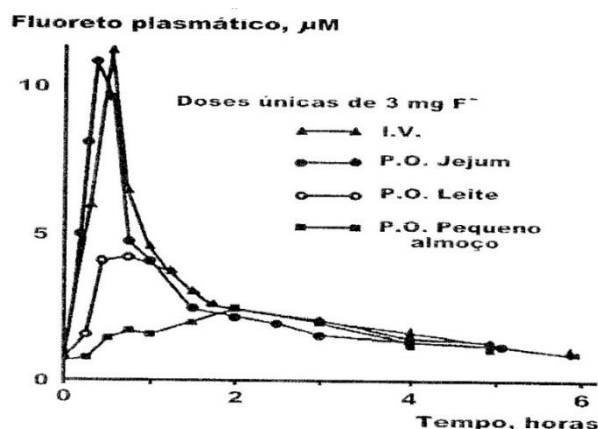


Figura 8 - Concentrações plasmáticas de íon fluoreto após a ingestão de três miligramas em quatro situações distintas: administração endovenosa (I.V.), ingestão em jejum (P.O. jejum), ingestão feita em simultâneo com o consumo de um copo de leite (P.O. leite) e ingestão após pequeno-almoço rico em cálcio (P.O. pequeno almoço), (Adaptado de Ekstrand & Ehrnebo., 1979).

Se um comprimido de NaF é ingerido em jejum, o grau de absorção do íon fluoreto é praticamente de 100%, contudo, se este é administrado juntamente com um copo de leite a quantidade de fluoreto absorvida decresce para os 70%. Esta relação diminuiu ainda mais atingido cerca de 60%, quando o mesmo comprimido é tomado juntamente com uma refeição rica em cálcio (Ekstrand & Ehrnebo, 1979). O decréscimo na quantidade de íon fluoreto absorvido na presença de certos alimentos como o leite deve-se provavelmente à ligação que ocorre entre o íon fluoreto e alguns dos seus constituintes, como sejam o cálcio e outros cátions di e trivalentes. Por outro lado, no caso de ingestão de fluoretos com estes alimentos, existe um incremento no teor de fluoretos que é excretado nas fezes. O tempo que medeia entre a ingestão de fluoretos e a toma de uma refeição é um ponto crítico em relação à sua biodisponibilidade como é demonstrado pela figura 9.

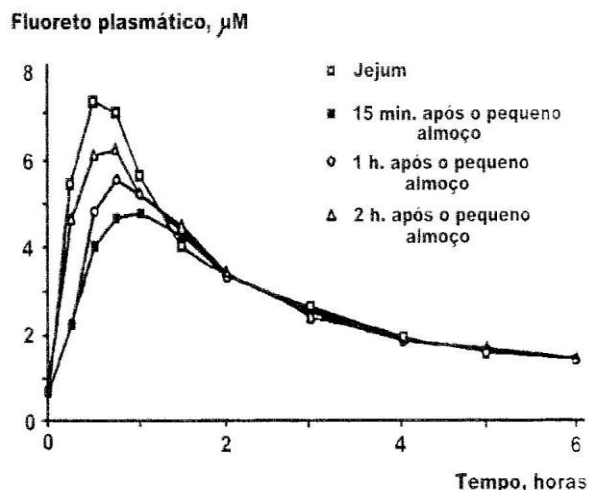


Figura 9 - Concentração plasmática de ião fluoreto em quatro situações distintas após ingestão de 3 mg deste ião (Ekstrand et al.,1990).

O pico plasmático após ingestão de 3mg de ião fluoreto em jejum atinge-se ao fim de 30 minutos. Contudo, quando a ingestão é precedida de uma refeição feita 15 minutos antes, o pico plasmático surge somente, uma hora após a ingestão do fluoreto e com uma menor amplitude (Ekstrand et al.,1990). Este facto pode ter importantes reflexos num contexto clínico já que a administração de suplementos de flúor pouco tempo depois de uma refeição pode comprometer a extensão de absorção deste ião, contribuindo e no caso particular das crianças cujos dentes se encontram ainda em formação, para uma diminuição na prevenção da cárie dentária.

A absorção do ião fluoreto ocorre por difusão passiva a nível gástrico e intestinal, sendo a extensão da absorção gástrica dependente do pH do estômago (Whitford, 1981). O ião fluoreto é absorvido sob a forma de ácido fraco, ácido fluorídrico (HF) (pK_a de 3,45), pelo que após a sua ingestão e por influência do pH ácido do lúmen gástrico é largamente convertido numa molécula neutra ($H^+ + F^- \rightleftharpoons HF$), que rapidamente se difunde pelas membranas citoplasmáticas. A quantidade que não é absorvida no estômago passa rapidamente para o intestino delgado, local onde ocorre a absorção da restante fração (Ekstrand et al., 1994).

Os fluoretos que apresentam elevada solubilidade em soluções aquosas são absorvidos praticamente, na sua totalidade. Também os provenientes da alimentação apresentam uma grande biodisponibilidade, na ordem dos 90% (Ekstrand et al., 1994). Os fluoretos presentes nos comprimidos de NaF e nos produtos de higiene oral destinados a uso tópico são

completamente absorvidos quando engolidos (Ekstrand et al., 1978; Ekstrand et al., 1980; Ekstrand et al., 1981). A biodisponibilidade dos fluoretos presentes nas pastas dentífricas é de cerca de 100% no caso da utilização do NaF e ligeiramente mais baixa no caso do fluorofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$). Este valor é menor devido aos compostos abrasivos e à presença de cálcio das diferentes marcas de pastas dentífricas e se ligar aos fluoretos, e, desta forma, diminuem a sua biodisponibilidade (Ekstrand et al., 1980).

Após a absorção dos fluoretos a nível gástrico e intestinas, fluoretos plasmáticos totais (Guy, 1976) não se ligam às proteínas plasmáticas (Ekstrand et al., 1977). No sangue a forma iónica distribui-se de um modo assimétrico entre o plasma sanguíneo e os elementos figurados do sangue. De facto, a concentração de fluoretos no plasma é duas vezes superior à encontrada nas células sanguíneas (Whitford, 1981). A gama de valores considerada normal para o teor de fluoretos no plasma está compreendida entre os 0,7 e os 2,4 μM (Guy, 1976). As concentrações plasmáticas de fluoretos não são reguladas por processos homeostáticos sendo influenciadas em larga medida pelo teor de fluoretos ingerido. Por exemplo, o teor de fluoretos que se espera encontrar numa população saudável exposta a um teor de 1 ppm pela água que consome deve ser aproximadamente de 1 μM (0,019 ppm), (Ekstrand et al., 1977).

A figura 10 mostra a variação no teor plasmático de fluoretos ao longo do dia, para diferentes níveis de exposição. Da análise da figura 10, conclui-se que a maior flutuação no nível plasmático dos fluoretos ocorre para os níveis de exposição mais elevados. O teor de fluoretos no plasma resultante de uma exposição crónica ou recente é influenciado por diversos fatores como a razão de reabsorção e crescimento do tecido ósseo e o valor da depuração renal dos mesmos (Ekstrand, 1978).

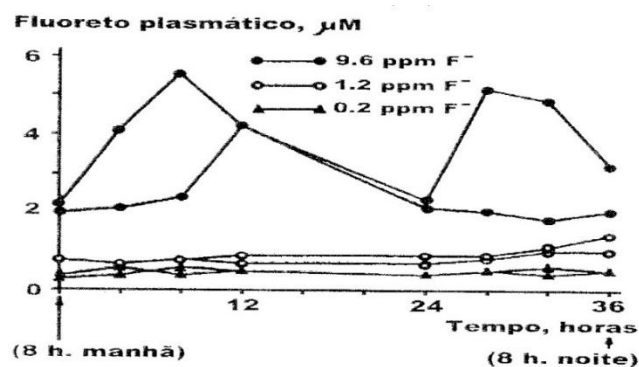


Figura 10 - Variações das concentrações plasmáticas de ião fluoreto observadas em indivíduos expostos a diferentes teores de fluoreto, através da água que consomem (Ekstrand, 1978).

3.1.2. Distribuição

A distribuição do ião fluoreto é realizada pelo plasma para os diferentes órgãos e tecidos. Os tecidos mais perfundidos como como o coração, o fígado e os rins são mais expostos do que nos tecidos onde a irrigação é menor como sucede com a pele e o tecido adiposo. A tabela 1 mostra a razão entre as concentrações dos fluoretos nos diferentes tipos de tecidos e no plasma de rato, obtidas no estado estacionário (Whitford et al., 1979).

Tabela 1 - Razão entre as concentrações dos fluoretos nos diferentes tipos de tecidos e no plasma de rato, obtidas no estado estacionário (razão T/P), (Whitford et al., 1979).

Tecido	Fígado	Pulmão	Rim	Língua	Diafragma	Coração	Cérebro	Tecido adiposo	Pele	Glândulas salivares
Razão T/P	0,98	0,83	4,16	0,69	0,61	0,46	0,08	0,11	0,43	0,63

A análise da tabela 1 permite estabelecer uma gama de valores entre 0,4 e 0,9 para a razão entre as concentrações de fluoretos nos tecidos e no plasma de rato. São exceção a esta gama de valores, o rim, o cérebro e o tecido adiposo. De facto, o teor em fluoreto é muito maior nos rins do que no plasma devido à sua tendência para se acumular nos túbulos renais. Por outro lado, também se conclui que a barreira hematoencefálica é efetiva contra a passagem do ião fluoreto para o sistema nervoso central. Os valores encontrados no cérebro e no tecido adiposo vêm demonstrar que o ião fluoreto não tem muita tendência para se acumular nos tecidos pouco irrigados. O fluoreto é por excelência um ião com elevada afinidade para os tecidos mineralizados. Aproximadamente 99% de todo o fluoreto existente no corpo humano localiza-se nos tecidos mineralizados (Whitford et al., 1979).

Atualmente em Portugal, existe um consumo significativo de flúor resultante da ingestão de água contendo elevados teores em fluoretos ou devido à suplementação alimentar e de produtos fluoretados. Estudos de metabolismo realizados em crianças sujeitas a uma dieta rica em ião fluoreto mostraram que a taxa de retenção de fluoretos está relacionada com a dose ingerida. Uma ingestão de 0,25 mg de fluoreto traduziu-se num índice de retenção próximo dos 80%. (Ekstrand et al., 1994a, 1994b). Contrariamente, na população adulta, os índices de retenção são mais baixos, podendo afirmar-se que em condições normais somente metade do que é ingerido de fluoretos se deposita no esqueleto sendo o restante excretado na urina (Ekstrand et al., 1990).

O ião fluoreto não se liga de um modo irreversível aos tecidos mineralizados como o osso. Em crianças com uma dieta pobre em flúor verifica-se a passagem de flúor do osso para o meio extracelular resultando deste modo, numa excreção urinária muito superior ao flúor ingerido, e desta forma existe um balanço negativo para o ião fluoreto (Ekstrand et al., 1984). Por outro lado, um estudo realizado em indivíduos que deixaram de residir em localidades onde a água de consumo tinha elevados teores de fluoretos, e passaram para locais onde esse teor era muito inferior, mostrou que a concentração de fluoretos encontrada na urina permaneceu consideravelmente elevada durante um largo período após essa mudança. Este estudo concluiu que o ião fluoreto foi mobilizado de modo lento, mas contínuo, a partir do tecido ósseo (Linkins et al., 1956). Assim, as concentrações plasmáticas e urinárias de fluoretos são o reflexo do balanço fisiológico deste ião no organismo humano. Este balanço é determinado pela extensão da exposição aos fluoretos, pelo grau de acumulação do ião no osso, pela sua capacidade de mobilização a partir deste tecido e ainda pela eficácia da sua excreção a nível renal (Ekstrand et al., 1977).

No contexto de gravidez, a passagem dos fluoretos da mãe para o feto verifica-se que a placenta não constitui uma barreira à passagem destes iões. Existe uma relação direta entre as concentrações séricas de fluoretos encontradas na mãe e no feto, sendo a concentração de fluoretos presente no cordão umbilical cerca de 75% do teor presente no soro da mãe. O fluoreto uma vez no sangue fetal é rapidamente captado pelo tecido ósseo fetal e dentes (Shen & Taves, 1974).

3.1.3. Excreção

O rim é a principal via de eliminação dos fluoretos. Paralelamente, os fluoretos, por não se ligarem às proteínas plasmáticas, difundem-se livremente através do glomérulo renal. A quantidade de fluoretos presente na urina depende da eficácia da filtração glomerular e da reabsorção nos túbulos renais que varia entre os 10% e os 90% (Ekstrand et al., 1977). Assim, paciente com patologia renal que afete a filtração, como sucede na insuficiência renal crónica, será de esperar que o teor de fluoretos se encontre aumentado no plasma e no tecido ósseo. Pelo contrário, em paciente saudáveis, os valores normais da depuração renal dos fluoretos no adulto situam-se entre os 30 e os 50 mL/min. Esta gama de valores contrasta com o valor encontrado para a depuração renal dos fluoretos que é aproximadamente de 1.0 mL/min. (Schiffel & Binswanger, 1980). Este intervalo de

valores depende não só do pH do líquido tubular como também do fluxo urinário (Ekstrand et al., 1980).

As outras vias de eliminação dos fluoretos do organismo são o suor e as fezes cuja contribuição não assume significativa importância. A quantidade de fluoretos que é excretada nas fezes constitui cerca de 10% da quantidade total de fluoretos que se ingerem. Este valor pode subir no caso de dietas ricas em catiões bi ou trivalentes (Ekstrand et al., 1994a, 1994b).

3.2. Toxicologia do Flúor

O uso dos fluoretos é muito anterior à sua introdução nos programas de Saúde Pública como meio de prevenção da cárie dentária, tendo sido inicialmente utilizados como pesticidas. O relato mais marcante de intoxicação pelos fluoretos ocorreu durante uma refeição num Hospital do Estado de Oregon (nos Estados Unidos da América), onde por engano e devido ao seu aspeto macroscópico, o NaF foi usado em vez de leite em pó. Foram contabilizados 263 casos de intoxicação, dos quais 47 se revelaram fatais. (Lidbeck et al., 1943)

Na tabela 2 estão referidos os casos de intoxicação por fluoretos ocorridos entre 1989 e 1992, nos Estados Unidos da América e que foram registados pela *American Association of Poison Control Centers* (AAPCC) (Litovitz et al., 1993). Cerca de 39% ocorreram por ingestão de medicamentos contendo fluoretos (categoria A), 34% por toma de suplementos vitamínicos (categoria B - suplementos para adultos, categoria C - suplementos para crianças) e 27% devido aos produtos de higiene oral (categoria D - pastas dentífricas, categoria E - elixires e outros produtos de ação tópica na boca).

De acordo com a gravidade da sintomatologia, a tabela 2 mostra que 35% dos casos não apresentaram sintomatologia, 5307 casos foram incluídos na categoria com sintomatologia ligeira, 118 casos na categoria com sintomatologia média e 3 casos na categoria com sintomatologia severa. Durante os quatros anos em análise só se verificou uma situação fatal que ocorreu por ingestão acidental de uma solução de fluoreto de sódio, por um indivíduo com 73 anos de idade. Também se conclui que a presença de produtos fluoretados em casa representa um perigo considerável no campo das intoxicações por fluoretos (Litovitz et al., 1993).

Estes factos fazem com que o uso do ião fluoreto em políticas de Saúde Pública nomeadamente, no campo da profilaxia da cárie, seja concretizado com precaução devido aos problemas de toxicidade aguda e crónica que podem resultar de uma ingestão descontrolada deste ião.

Tabela 2 - Casos de intoxicação por fluoretos ocorridos nos Estados Unidos da América entre 1989 e 1992 (Litovitz et al., 1993).

Ano	Categoria	Número total de casos	Tratados em unidades de Saúde	Consequências clínicas				
				Nenhuma	Ligeira	Moderada	Grave	Morte
1989	A	4028	375	1807	663	14	1	1
	B	289	39	144	20	0	0	0
	C	3477	254	1379	175	1	0	0
	D	1392	101	464	371	15	0	0
	E	1185	56	503	115	3	0	0
Totais		10371	825	4297	1351	33	1	1
1990	A	4437	338	1950	653	10	0	0
	B	254	22	126	12	0	0	0
	C	3421	189	1117	125	0	0	0
	D	1379	107	468	329	7	0	0
	E	1299	64	511	109	2	0	0
Totais		10790	720	4172	1228	19	0	0
1991	A	4350	368	1593	667	12	1	0
	B	334	36	129	19	1	0	0
	C	3431	194	946	140	4	0	0
	D	1623	120	497	403	15	0	0
	E	1418	72	556	112	0	0	0
Totais		11156	790	3721	1341	32	1	0
1992	A	4171	340	1579	624	12	0	0
	B	286	29	112	23	0	0	0
	C	3681	193	1027	151	4	0	0
	D	2331	141	700	497	17	1	0
	E	1388	52	545	92	1	0	0
Totais		11857	755	3963	1387	34	1	0
89-92	A	16986	1421	6929	2607	48	2	1
	B	1163	126	511	81	1	0	0
	C	14010	830	4469	591	9	0	0
	D	6725	469	2129	1600	54	1	0
	E	5290	244	2115	428	6	0	0
Totais		44174	3090	16153	5307	118	3	1

Legenda: A – Medicamentos; B – Suplementos vitamínicos adultos; C – Suplementos vitamínicos crianças; D - Pastas dentífricas; E – Elixires orais.

3.2.1. Toxicidade aguda

A intoxicação aguda pelos fluoretos é difícil de definir devido ao elevado o número de variáveis que podem contribuir. Os estudos realizados sobre a intoxicação observada em humanos calcularam que a dose letal por intoxicação aguda pelos fluoretos nos humanos, está compreendida entre 6 e 9 mg F/kg segundo Dreisbach (1980) 100 mg F/kg de acordo com Lidbeck e colaboradores (1943). Atualmente, a dose letal foi determinada nas investigações de Hodge & Smith (1965). Os autores concluíram após o estudo de vários casos de

intoxicação aguda pelos fluoretos que a dose letal, para um indivíduo de 70 kg, está compreendida entre 5 e 10 g em NaF, ou seja, entre 32 e 64 mg F/kg. De salientar que todos os valores atrás referidos correspondem a doses letais 100% (DL_{100%}).

Apesar do ponto de vista clínico e de Saúde Pública, o valor da dose letal 50% ser um parâmetro mais importante que a DL_{100%}, o facto é que esse valor para o Homem ainda não foi determinado. Os sinais e sintomas da intoxicação aguda pelo flúor envolvem a maior parte dos sistemas de órgãos e caracterizam-se principalmente, por gastroenterite hemorrágica, nefrite tóxica aguda e alterações hepáticas (Whitford, 1996). O mecanismo de ação do flúor no caso das intoxicações agudas parece resultar da sua atividade inibitória sobre diversos sistemas enzimáticos e/ou da sua ação irritativa direta sobre as mucosas (Whitford, 1996).

3.2.2. Toxicidade crónica

Um dos efeitos mais importante e indesejável no campo da exposição crónica aos fluoretos é a fluorose dentária, uma anomalia na mineralização dos dentes durante o seu período de formação (Burt, 1992). De uma maneira geral, considera-se que nas comunidades com fluoretação natural ou controlada das águas de consumo, onde a concentração de flúor não excede o 1,2 ppm, os efeitos tóxicos devidos ao flúor são mínimos ou inexistentes (Ostrom, 1984).

No entanto, a exposição alargada ao ião fluoreto nas diversas fontes tem provocado um aumento nos sinais de toxicidade crónica pelos fluoretos (Kumar & Susheela, 1994). Alguns autores descrevem um aumento do número de alimentos e bebidas que são preparados com água fluoretada e, esta situação poderá ser responsável pelo aumento da incidência de fluorose (Leverret, 1982; Kumar & Susheela, 1994). Alguns estudos mostraram que os alimentos para crianças apresentam um aumento significativo do seu teor em flúor quando o seu processamento ocorreu em áreas com água fluoretada (McKnight et al., 1985). Aasenden & Peebles (1978) mostraram que 67% das crianças que ingeriram cerca de 0,5 mg de ião fluoreto por dia até aos 3 anos de idade e que a partir desta idade passaram a consumir 1 mg diário foram diagnosticadas com fluorose leve ou muito leve e que 14% apresentam fluorose moderada. Em Inglaterra, uma das principais fontes de flúor incluída na dieta é o chá, tendo-se calculado que em média cada criança ingere diariamente 0,4 mg de flúor a partir desta bebida (Duckworth e Duckworth, 1978).

Também o uso de suplementos de flúor que forneçam cerca de 0,5 mg de flúor /dia durante os dois primeiros anos de vida pode resultar na ingestão de uma dose diária de flúor 2 a 6 vezes superior à dose calculada a partir do consumo de água fluoretada contendo 1 ppm de flúor (Dowel, 1981).

A introdução dos fluoretos nos programas de Saúde Pública visa essencialmente, a prevenção da cárie dentária. Deste modo, os Especialistas em Medicina Dentária e Estomatologia são aconselhados a prescrever flúor a crianças, desde os 6 meses de idade até aos 16 anos (Pinto, 1998). A dose a introduzir neste programa deverá levar em linha de conta a quantidade de fluoretos que normalmente é ingerido a partir dos alimentos, dos produtos de higiene oral e essencialmente, a partir da água que se consome. Esta fonte de flúor é, de entre todas, a que melhor se controla o seu efeito (Pinto, 1998). Por esta razão, a Associação Americana de Estomatologia estabeleceu as suas recomendações em termos de prescrição de flúor, com base nos teores de fluoretos presentes nas águas a que a criança está exposta (tabela 3), (Pinto, 1998).

Tabela 3 -Recomendações sobre a suplementação da dieta das crianças com flúor baseadas nos teores de fluoretos presentes nas águas de consumo. Doses expressas em mg/dia (pinto, 1998).

Idade	Teor de fluoreto na água (ppm)		
	<0,30	0,30 – 0,60	>0,60
Até 6 meses	0	0	0
6 meses – 3 anos	0,25	0	0
3 – 6 anos	0,50	0,25	0
6 – 16 anos	1,00	0,50	0

Em Portugal Continental, a água que abastece Vila Flor apresenta um teor de fluoretos de 0,8 ppm, e assim as crianças que bebem a esta água são as únicas no nosso País e de acordo com a tabela 3 que podem estar dispensadas da suplementação com flúor. A análise das águas que abastecem as restantes 274 sedes de concelho revelou que só as que abastecem onze locais possibilitam que as crianças até aos 3 anos de idade não necessitem de suplementação com flúor. Os concelhos em causa são por ordem alfabética: Alcoutim (0,35 ppm; Distrito de Faro), Almeirim (0,35 ppm; Distrito de Santarém), Alter do Chão (0,42 ppm; Distrito de Portalegre), Azambuja (0,31 ppm; Distrito de Lisboa), Benavente (0,37 ppm; Distrito de Santarém), Cartaxo (0,32 ppm; Distrito de Santarém), Cuba (0,40 ppm; Distrito de Beja), Monforte (0,36; Distrito de Portalegre), Mourão (0,45 ppm; Distrito de Évora), Ponte de Sor (0,30 ppm; Distrito de Portalegre) e Vagos (0,44 ppm; Distrito de Aveiro). As crianças que consomem a água da rede pública das restantes Sedes

de Concelho de Portugal Continental e de acordo com a tabela 3 devem ser sujeitas a uma suplementação com flúor a partir dos 6 meses (Pinto, 1998). Deve-se salientar que as recomendações sugeridas não aconselham a suplementação com flúor à nascença. Com esta indicação pretende-se evitar que os efeitos indesejáveis do ião fluoreto se possam sobrepor aos interesses da saúde pública nomeadamente, no campo da prevenção da cárie dentária (Pinto, 1998).

Pelo exposto conclui-se que a ingestão de quantidades excessivas de ião fluoreto pode desencadear manifestações de natureza toxicológica. É consensual a ideia de que a fluorose dentária constitui o maior dos problemas de toxicidade crónica provocada pela ingestão descontrolada de fluoretos. Contudo e, para além dos efeitos indesejáveis sobre o desenvolvimento normal dos dentes, uma exposição crónica e não controlada a este ião também pode apresentar consequências nefastas sobre outros locais do organismo (Ghosh, 2002).

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

A falta de consenso em torno dos efeitos que o ião fluoreto na função e estrutura dos órgãos de reprodução masculina motivou a concretização do trabalho experimental apresentado nesta dissertação. Desta forma, objetivo geral foi estudar o efeito do ião fluoreto na alteração das principais estruturas anatômicas dos órgãos sexuais masculinos de roedores, avaliar contratilidade do canal deferente de rato, a mobilidade dos espermatozoides e avaliar o efeito de alguns biomarcadores de fertilidade masculina em rato e ratinho.

Especificamente, os objetivos foram:

1. Avaliar o efeito da ingestão de NaF, em alguns indicadores de fertilidade masculina: peso dos epidídimos, peso e capacidade secretória das vesículas seminais e avaliação do número e da mobilidade dos espermatozoides do epidídimo de ratinhos Charles River;
2. Avaliar o efeito da ingestão de NaF na capacidade fecundante de ratinhos Charles River;
3. Estudar o efeito da ingestão de NaF na fertilidade de ratos macho Wistar, através da medição de indicadores de fertilidade masculina: peso dos epidídimos, peso e capacidade secretória das vesículas seminais, peso dos testículos, avaliação do número dos espermatozoides do epidídimo e determinação dos teores de ião fluoreto nos testículos e nos epidídimos;
4. Quantificar a contratilidade do canal deferente induzida por noradrenalina de rato Wistar após a ingestão de NaF;
5. Investigar os possíveis mecanismos envolvidos no ponto 4, através da medição da noradrenalina endógena nas preparações de canal deferente estimuladas com fenilefrina, na presença de NaF.

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

FASE 1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO IÃO FLUORETO NO POTENCIAL REPRODUTOR DE RATINHO

I. Introdução

A capacidade de alguns fármacos poderem modificar o processo de reprodução, tanto nas espécies animais como no Homem, tem motivado o desenvolvimento de trabalho por parte de alguns farmacologistas e toxicologistas. Neste sentido, foi descrito que o papel do NaF na modificação da resposta contrátil do canal deferente de rato, após estimulação com fenilefrina, no entanto permanece por clarificar esta relação uma vez que os resultados obtidos são por vezes contraditórios. De entre os estudos que mostram não existir qualquer efeito do ião fluoreto sobre a fertilidade masculina incluem-se os de Li et al., (1987) que demonstraram que a ingestão diária de 70 mg/kg de NaF durante 5 dias consecutivos não provoca alterações na morfologia dos espermatozoides de rato. Também Sprando et al. (1996) observaram que a espermatogénese no rato não foi afetada pela exposição direta ao ião fluoreto, através de uma administração intratesticular, numa concentração 200 vezes superior à obtida em condições normais de exposição. Contrariamente a estes resultados, Kumar e Susheela (1995) demonstraram que a ingestão diária de 10 mg/kg de NaF, durante 18 meses, provoca alterações na espermatogénese dos coelhos, com produção de espermatozoides anormais (Kumar e Susheela, 1994). Chinoy *et al.*, (1992) verificaram que ratos machos adultos exposto a doses de 5 e 10 mg/kg/dia de NaF, administradas por via oral, durante 30 dias consecutivos revelou alterações nalguns parâmetros fundamentais na avaliação da função reprodutora masculina, como sejam, a redução do número e da mobilidade dos espermatozoides nos ratos expostos ao NaF. Também Ghosh et al., (2002) demonstraram que a administração através da água de beber de NaF na dose de 20mg/kg/dia, durante 29 dias, induz efeitos adversos no aparelho reprodutor masculino de rato, através de mecanismo associados ao stress oxidativo. Mais recentemente, Dey & Giri (2016) descreveram que as consequências mais significativas na reprodução masculina resultantes da exposição ao fluoreto, são alterações na estrutura e atividade funcional dos espermatozoides, perturbação da espermatogénese e instabilidade de múltiplos sistemas hormonais. Também foram relatados casos em que a concentração de testosterona circulante diminuiu em doentes do sexo masculino que apresentavam fluorose esquelética.

Em 2020 Liang et al., publicou um estudo que revelou que a exposição ao flúor alterou as estruturas das bainhas fibrosas e axonemais no flagelo do espermatozóide por meio da regulação negativa dos níveis de expressão de proteína e mRNA de AKAP3, AKAP4, CFAP43, CFAP44 e HYDIN, o que fornece uma nova visão do flúor que altera a estrutura dos flagelos do espermatozóide e fornece certas orientações teóricas e novas referências para a influência do flúor na qualidade do espermatozóide e na baixa fertilidade.

A falta de consenso, em torno dos efeitos que o ião fluoreto pode exercer sobre a função e estrutura dos órgãos de reprodução masculina, motivou a realização dos protocolos experimentais descritos nesta dissertação. Assim, o objetivo desta parte experimental foi estudar o efeito da administração reiterada de NaF, durante 28 dias, na fertilidade de ratinhos Charles River. Especificamente, foi avaliado o efeito do NaF no peso dos epidídimos, peso e capacidade secretória das vesículas seminais, e avaliação do número e da mobilidade dos espermatozóides do epidídimo comparando com o grupo controlo não exposto ao NaF. Por outro lado, avaliou-se a capacidade fecundante de ratinhos Charles River através da realização de um teste de fertilidade, com cruzamento entre ratinhos machos tratados e ratinhos fêmea não tratados.

II. Materiais e Métodos

Declaração da ética

Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela comissão de Ética Egas Moniz (processo: 835), Almada, Portugal, assim como da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. A investigação experimental foi realizada de acordo com as regras e recomendações mais recentes para o cuidado e processamento de animais de laboratório, nomeadamente com os regulamentos da Comissão Europeia atualmente adotados (Diretiva 2010/63 / UE). Além disso, os estudos foram realizados de acordo com o ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research.

Animais e exposição

Vinte ratinhos machos adultos saudáveis Charles River com um peso médio de $31,5 \pm 0,79$ gramas foram alojados em gaiolas de polipropileno com livre acesso a água e dieta padronizada (formulação A04: PANLAB, Espanha). Foram mantidos a uma temperatura

de 18–25°C e 40%–60% de humidade em um ciclo claro / escuro de 12 horas, no Biotério da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal). Os ratinhos foram aleatoriamente alocados em dois grupos uma semana após adaptação ao ambiente. O grupo controlo foi alimentado com dieta e água *ad libitum* e o grupo de estudo foi mantido com dieta e 65 mg/L NaF dissolvido em água (10 mg/kg/dia).

Considerou-se desprezável o valor de 0,07 mg F⁻/L naturalmente existente na água de abastecimento da rede pública de Lisboa (Pinto,1998). A concentração de NaF na água de beber foi estabelecida após um estudo preliminar ter demonstrado que cada grupo de ratinhos consumia em média 50,0±1,3 mL de água. No protocolo experimental descrito neste capítulo foi usada uma dose diária de 10mg/kg/dia de NaF (4,5 mg F⁻/kg/dia), o que representa uma dose aproximadamente 100 vezes superior à obtida em condições normais de exposição ao ião fluoreto. Por este motivo, esta dose foi utilizada somente durante 28 dias, seguindo o modelo já descrito por outros autores (Chinoy et al, 1992; Collins et al, 2001; Ghosh et al., 2002).

Avaliação de parâmetros de fertilidade

A dieta e a água foram fornecidas *ad libitum* até às 24 horas anteriores do final da experiência, altura em que os animais foram colocados em jejum, mantendo somente a água. Ao longo da experiência de 28 dias, foi medido o volume de água ingerida por cada grupo. Por outro lado, após 28 dias, os ratinhos foram pesados e submetidos a anestesia por exposição a uma atmosfera saturada em éter etílico, confirmada pela ausência de resposta dolorosa a um estímulo mecânico, sendo posteriormente sacrificados por deslocamento cervical.

Procedeu-se em seguida a uma laparotomia longitudinal para acesso à cavidade abdominal e isolamento dos órgãos estudados: epidídimos e vesículas seminais. O peso destes órgãos foi expresso como percentagem do peso total de cada animal – peso relativo (Ghosh et al., 2002).

As amostras de sémen foram obtidas a partir dos epidídimos pelo método de difusão (Slott & Perreault, 1993). Cada epidídimo foi colocado numa caixa de Petri contendo 10 mL de tampão fosfato (PBS - Sigma) com 10mg/mL de albumina bovina (BSA – Sigma), aquecido a 37°C. Com o auxílio de uma lâmina foram realizados pequenos cortes ao nível

da cauda do epidídimo de modo a assegurar a libertação dos espermatozoides para o meio. Os epidídimos foram retirados deste meio, após uma incubação de 15 minutos, a 37 °C. A contagem e a avaliação da mobilidade dos espermatozoides foram feitas em alíquotas de 20 µL de meio utilizando uma câmara de contagem Makler (Figura 11, SEFI-Medical instruments), pré-aquecida a 37°C, e um microscópio adaptado com objetivas de contraste de fase negativa (Olympus).



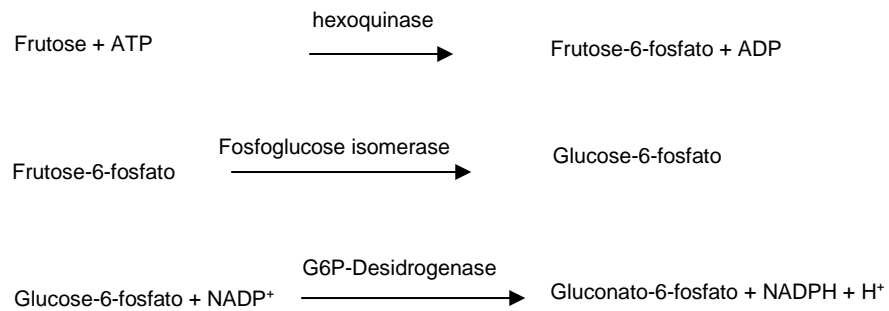
Figura 11 - Câmara de contagem Makler utilizada para avaliação do número e da mobilidade dos espermatozoides.

O número de espermatozoides foi expresso por 100 mg de epidídimo. A avaliação da mobilidade dos espermatozoides foi registada através de um sistema computadorizado de análise de esperma (computer assisted sperm analysis - CASA), que permite a captação de imagens obtidas a partir da análise de diferentes campos observados ao microscópio. Foi utilizado, para o efeito, o analisador Hamilton-Thorn Motility Analyser (HTM - C, da Hamilton-Thorn Research, Beverly, MA) (Figura 11), que tem sido utilizado por alguns autores, desde 1990, em estudos farmacológicos e toxicológicos que envolvem a análise de esperma de rato (Boyers et al., 1989; Slott et al., 1990; Slott & Perreault, 1993; Klinefelter et al., 1990).



Figura 12 - Sistema computadorizado de análise de esperma. Hamilton Thorn Motility Analyser (HTM-C), constituído por um microscópio adaptado com objetivas de contraste de fase negativa, uma câmara de vídeo, um monitor e um computador com programa para análise de esperma.

As vesículas seminais depois de pesadas foram homogeneizadas num Potter Elvehjem e a suspensão obtida foi centrifugada a 16000g durante 10 minutos a 4°C, para determinação no sobrenadante do teor em frutose. Este marcador da atividade secretora das vesículas seminais foi determinado, após desproteinização do sobrenadante, por um método enzimático (Roche), de acordo com as seguintes reações:



Este conjunto de reações pode ser monitorizado num determinado intervalo de tempo, através da medição do aumento da absorvância, lida a 340 nm, que ocorre devido ao NADPH que se vai formando a partir da frutose.

Deste modo, a frutose presente no sobrenadante, obtido por homogeneização das vesículas seminais, foi determinada de acordo com o seguinte protocolo: 1) Num tubo de centrífuga misturar 100 µL do sobrenadante com 3,9 mL de ácido perclórico (0,3 M).

Colocar a mistura num banho de gelo durante 10 min. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos; 2) Adicionar a 2 mL do sobrenadante obtido em a), 1 mL de carbonato de potássio (0,75M). Colocar de novo em banho de gelo durante 15 min. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos; 3) Utilizar o sobrenadante obtido em b) para determinar o teor de frutose de acordo com o procedimento descrito a seguir (Roche, produto nº 10139106035, lote 42288200, validade: 31-07-2021).

	Branco	Amostra
Reagente 1 (NADP e ATP)	1,0 mL	1,0 mL
Sobrenadante obtido em c)	-----	0,5 mL
Água bidestilada	2,0 mL	1,5 mL
Reagente 2 (hexoquinase e G6P-desidrogenase)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar. Incubar à temperatura ambiente durante 20 min. Ler a absorvância da amostra contra o branco a 340 nm (A1). Adicionar:		
Reagente 3 (fosfoglucoase isomerase)	0,02 mL	0,02 mL
Misturar. Incubar à temperatura ambiente durante 20 min. Ler a absorvância da amostra contra o branco a 340 nm (A2).		

A frutose presente no sobrenadante obtido da homogeneização das vesículas seminais foi determinada a partir da seguinte equação:

$$C \text{ (mmol/L)} = \frac{V \times F}{d \times vol \times \varepsilon \times 1000} \times (A_2 - A_1)$$

onde:

V = volume final da reação (3,04 mL);

F = fator diluição obtido após desproteínização da amostra (60);

vol = volume da amostra (0,5 mL);

d = comprimento da cuvete de leitura do espectrofotómetro em cm;

ε = Coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm (6,3 L mmol⁻¹ cm⁻¹)

Análise estatística

Os teores de frutose presente em cada vesícula seminal foram expressos em μ mole por 100 mg de glândula. Os valores dos diferentes parâmetros analisados no presente protocolo experimental foram comparados, entre o grupo controlo e o grupo tratado com NaF, pelo método *t* de student, para amostras desemparelhadas.

Avaliação do efeito da ingestão de NaF na capacidade fecundante

A capacidade fecundante foi avaliada em cinco ratinhos de cada um dos grupos referidos no ponto anterior, decorrido os 28 dias de exposição ao NaF no grupo de estudo. Cada um dos ratinhos acasalou com 2 ratinhos fêmeas, sujeitas a dieta e água *ad libitum*, por um período diário de 8 horas durante 7 dias consecutivos. Durante este período, os ratinhos macho mantiveram a dieta a que estiveram sujeitos antes do acasalamento. O número de fêmeas que conseguiram engravidar, o dia do nascimento de cada ninhada, o peso e o número de ratinhos nascidos por ratinho fêmea constituíram os parâmetros de avaliação.

III. Resultados

Efeito do NaF no ganho de peso corporal e no consumo de água

Na avaliação do peso dos ratinhos no início e após 28 dias realizada em 10 ratinho aleatoriamente escolhidos de ambos os grupos verificou-se o aumento de peso ocorreu no grupo de estudo e no grupo controlo, sendo que o grupo controlo aumentou significativa o peso em comparação com o grupo experimental (tabela 4). Por outro lado, apesar do consumo de água ser superior no grupo de estudo ($51,7 \pm 1,2$ mL/dia) com comparação com grupo controlo ($49,0 \pm 1,3$ mL/dia), não existiram diferenças estatísticas entre os grupos (tabela 5).

Tabela 4 - Peso dos diferentes grupos de ratinhos no início e no fim do estudo (média \pm erro padrão).

	Grupo controlo	Grupo tratado com NaF (10mg/kg/dia)
Peso inicial (g)	31 \pm 1.0	32 \pm 0.8
Peso final (g)	36 \pm 0.4*	35 \pm 1.0

*P<0.05 vs peso inicial; n=10

Tabela 5 -Volume de água consumida por cada grupo de ratinhos, durante todo o protocolo experimental (média \pm erro padrão).

	Grupo controlo	Grupo tratado com NaF (10mg/kg/dia)
Água consumida por dia (mL)	49,0 \pm 1,3	51,7 \pm 1,2

n= 10

Efeito do NaF nos indicadores de fertilidade masculina

A figura 13 mostra o efeito da exposição do consumo de NaF sobre alguns indicadores de fertilidade masculina em comparação ao grupo controlo. Desta forma, conclui-se que a exposição ao NaF não modificou o peso relativo e o número de espermatozoides dos epidídimos em comparação com o grupo controlo. Pelo contrário, as vesículas seminais dos ratinhos tratados com NaF apresentam um peso relativo estatisticamente inferior ao do grupo controlo. Contudo, o teor em frutose nestas glândulas é estatisticamente maior para o grupo de ratinhos exposto ao NaF comparativamente ao grupo não-exposto.

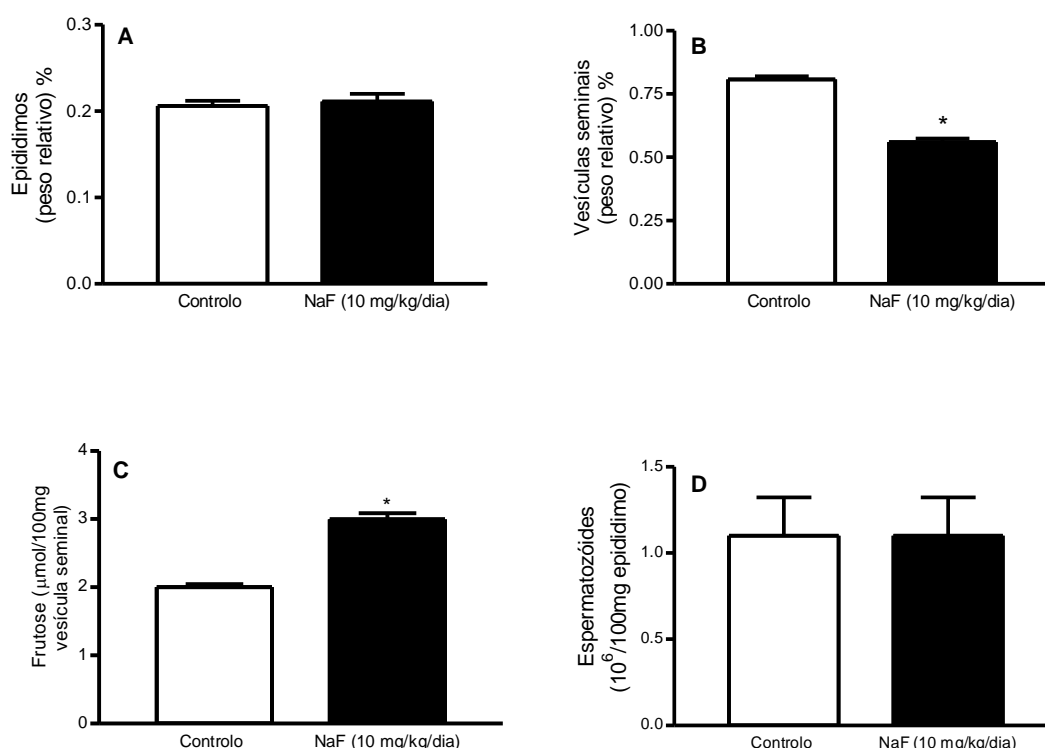
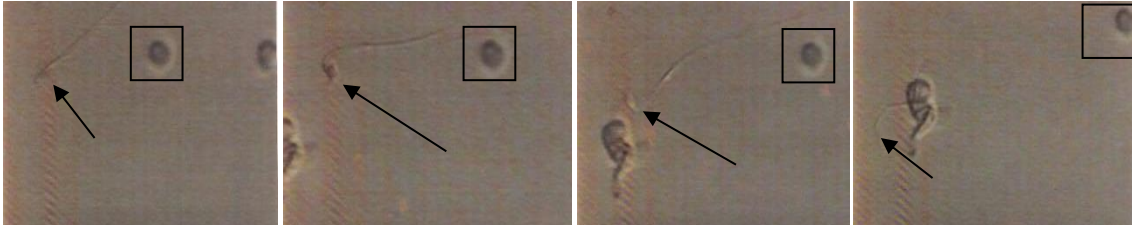


Figura 13 - Avaliação de alguns indicadores de fertilidade masculina no grupo controlo e no grupo tratado com NaF (10mg/kg/dia). A – peso relativo dos epidídimos; B – peso relativo das vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo; C – teor de frutose nas vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo; D - número de espermatozoides do epidídimo. (n=5).

A figura 14 mostra um conjunto de fotografias sequenciais de um espermatozoide obtido a partir de um epidídimo controlo (figura 14 - A) e de um outro pertencente a um ratinho exposto ao NaF (figura 14 - B). Estas fotografias refletem a maioria dos campos observados com espermatozoides provenientes de epidídimos controlo e tratados com NaF. A ingestão de NaF produziu alterações qualitativas na mobilidade dos

espermatozoides. No grupo controle, os espermatozoides revelaram essencialmente um movimento progressivo linear, enquanto que no grupo tratado com NaF os espermatozoides mostraram já um movimento circular com progressão comprometida.

A



B

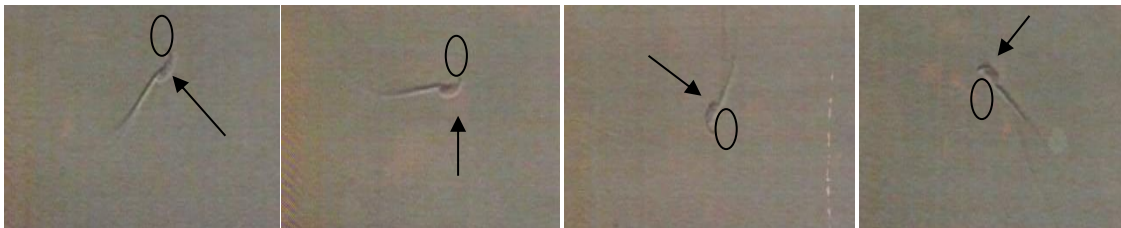


Figura 14 - A – Movimento típico de um espermatozoide obtido de um epidídimo controle. A seta assinala a cabeça do espermatozoide. O quadrado que inclui uma célula serve de referencial para se visualizar melhor o movimento progressivo do espermatozoide. B – Movimento típico de um espermatozoide obtido de um epidídimo tratado com NaF. A seta assinala a cabeça do espermatozoide. O círculo serve de referencial para melhor se observar o movimento circulatório do espermatozoide.

Efeito da ingestão de NaF na capacidade fecundante

O efeito da exposição ao NaF sobre a capacidade fecundante de ratinhos avaliada através do cruzamento de machos tratados com fêmeas não tratadas está demonstrado na figura 15. O número de fêmeas que engravidaram, o dia do nascimento de cada ninhada, o número e o peso dos ratinhos nascidos por ratinho fêmea constituíram os parâmetros de avaliação nos testes de fertilidade.

O cruzamento de ratinhos machos expostos ao NaF com fêmeas não tratadas não mostrou diferenças em relação ao grupo controlo no número de ratinhos grávidas e no número e no peso das crias por parto. Por outro lado, a análise do número de partos que ocorreram por dia mostrou que 66% dos ratinhos fêmea que acasalaram com o grupo controlo deram à luz no dia um e que somente 20% dos ratinhos fêmea que acasalaram com o grupo tratado com NaF deram à luz nesse dia. De salientar que o dia um coincidiu com o dia em que nasceram as primeiras crias. De referir, ainda, a morte de um ratinho fêmea durante a gestação, a qual tinha acasalado com um ratinho proveniente do grupo tratado com NaF.

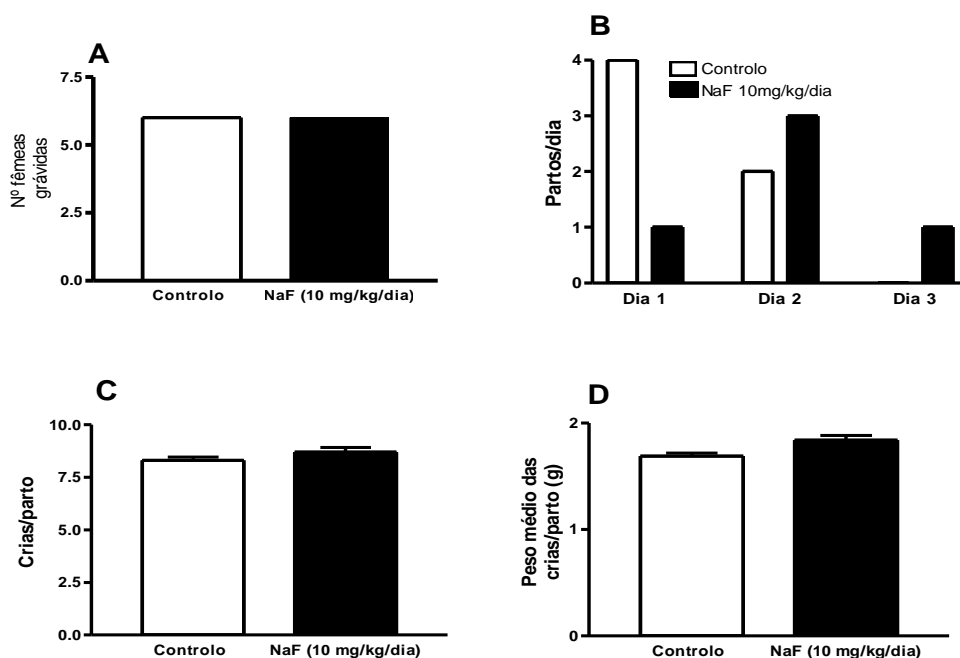


Figura 15- Avaliação da capacidade fecundante de ratinhos através do cruzamento de machos tratados com NaF (10mg/kg/dia), com fêmeas não tratadas. A – Número de fêmeas grávidas; B – número de partos ocorridos por dia; C – número de crias por parto; D – peso médio das crias por parto.

IV. Discussão

Os resultados obtidos neste capítulo mostram que não houve diferença no consumo médio diário de água entre o grupo controlo e o grupo exposto ao NaF, Elbetieha et al., (2000), também demonstraram que quantidades de NaF entre 100 e 300 mg/L, não modificaram o consumo diário de água pelos ratinhos expostos a este composto, durante 4 semanas, em relação ao grupo controlo. Por outro lado, a exposição à dose de 10 mg/kg/dia de NaF, durante os 28 dias, não provocou um aumento significativo do peso corporal ao contrário

do que foi observado no grupo controlo. Esta observação foi também referida por outros autores (Chinoy et al., 1998; Chinoy & Sequeira, 1989), em protocolos de exposição de ratinhos ao NaF similares ao descrito neste ensaio experimental e pode ser indicadora de efeitos tóxicos devidos a este composto (Chinoy et al., 1992; Gupta et al., 2007). Em relação ao peso relativo dos órgãos estudados verificou-se uma ausência de efeito do NaF sobre os epidídimos, enquanto que sobre as vesículas seminais, o grupo exposto ao NaF apresentou valores inferiores ao do grupo controlo. Este resultado é contraditório ao encontrado na literatura (Chinoy & Sequeira, 1989).

Em relação à capacidade secretora destas glândulas observou-se um aumento dos teores de frutose no grupo tratado com NaF. Este efeito foi também observado por outros autores (Chinoy & Sequeira, 1989), num protocolo experimental semelhante ao descrito neste capítulo, ou seja, após exposição de um grupo de ratinhos ao NaF na dose de 10 mg/kg/dia, durante 30 dias. Contudo, este efeito não foi observado noutras espécies. Chinoy et al., (1995) demonstraram que os teores de frutose das vesículas seminais provenientes de ratos expostos ao NaF, na dose e por um período de tempo idêntico ao protocolo descrito, eram inferiores aos dos controlos. Esta observação irá ser discutida no capítulo seguinte, já que o protocolo realizado utilizou ratos macho Wistar. Deve-se salientar, contudo, que estas diferenças refletem a variabilidade que por vezes se observa entre as respostas obtidas a partir de diferentes espécies animais expostas ao mesmo composto. Deste modo e de acordo com as normas que regulamentam os estudos de toxicidade de reprodução (Chinoy & Sequeira, 1989), estas variações devem ser cuidadosamente avaliadas quando se pretendem extrapolar os resultados obtidos a partir de animais de laboratório para o Homem.

O número de espermatozoides nos epidídimos obtidos a partir de ratinhos tratados com NaF não foi diferente do calculado para o grupo controlo. Esta observação foi também referida num estudo realizado por Li et al., (1987), no qual a administração da dose máxima tolerável de NaF (70 mg/kg), a ratinhos durante 5 dias, não modificou os espermatozoides dos epidídimos analisados 35 dias após o primeiro dia de exposição ao composto. Estas observações não são consensuais com outros estudos (Chinoy & Sharma, 2000; Chinoy et al., 1992). Por exemplo, Chinoy et al. (1992), demonstraram que a administração de 10 e 20 mg/kg/dia de NaF a ratinhos durante 30 dias produz uma redução no número de espermatozoides em relação ao grupo controlo. A espermatogénese é um processo que conduz à formação dos espermatozoides a partir de células germinais,

as espermatogónias, e ocorre no interior dos túbulos seminíferos (Clermont, 1972). Por outro lado, no epidídimo ocorre o armazenamento e a maturação dos espermatozoides, incluindo a aquisição de capacidade para se tornarem móveis (Kirchhoff et al., 1998; Elzanaty et al., 2002; Elzanaty, 2007). O processo da espermatogénese no ratinho dura cerca de 35 dias (Clermont, 1972; Amann, 2008), pelo que qualquer alteração, pelo menos a partir das células germinais, só será quantificável a nível do epidídimo após decorrido um período de tempo superior ao próprio processo de formação dos espermatozoides. Como o nosso estudo envolveu a exposição dos ratinhos ao NaF durante 28 dias, isto é, por um período de tempo inferior ao da própria espermatogénese, seria expectável que pelo menos a nível quantitativo não se observassem alterações. De facto, estas ao ocorrerem surgiriam durante o processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo. Os resultados demonstram que a mobilidade dos espermatozoides dos epidídimos provenientes de ratinhos tratados com NaF apresentam características de mobilidade que comprometem a sua progressão linear. Esta observação vem ao encontro do referido por outros autores que utilizaram protocolos experimentais similares ao descrito neste capítulo (Chinoy & Sharma, 2000; Chinoy et al., 1992). De facto, o ião fluoreto é um inibidor de muitas enzimas, algumas das quais desempenham um papel fundamental na produção de ATP (Zakrzewska & Udala., 2006). Deste modo, pode ficar comprometida a mobilidade dos espermatozoides devido à deficiente produção de energia. Este assunto irá ser abordado com maior pormenor no capítulo seguinte, já que o protocolo experimental realizado inclui o doseamento do teor de fluoretos nos epidídimos e nos testículos de ratos expostos ao NaF.

A avaliação da capacidade fecundante dos ratinhos realizada através do cruzamento de ratinhos machos expostos ao NaF com fêmeas não tratadas não mostrou diferenças em relação ao grupo controlo no número de grávidas e no número e no peso das crias por parto. Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por outros autores (Araibi et al., 1989), que demonstraram que a exposição durante 60 dias ao NaF na água de beber na concentração de 100 mg/L não provocou alterações na capacidade fecundante de ratos, avaliada por uma metodologia semelhante à descrita neste capítulo. De facto, o cruzamento de cada rato tratado ou controlo com duas fêmeas não expostas ao NaF, durante 4 dias, também não mostrou diferenças entre os dois grupos a nível do número de grávidas e do número e do peso das crias por parto. Somente uma quantidade de 200

mg/L de NaF na água de beber provocou uma redução no número de grávidas resultantes do cruzamento com ratos expostos a este teor de NaF.

Por outro lado, a análise do número de partos que ocorreram por dia mostrou que 66% dos ratinhos fêmea que acasalaram com o grupo controlo deram à luz no dia um e que somente 20% dos ratinhos fêmea que acasalaram com o grupo tratado com NaF deram à luz nesse dia. Esta observação pode ser atribuída às alterações observadas na mobilidade dos espermatozoides dos epidídimos obtidos a partir de ratos tratados. De facto, a redução da capacidade de mobilidade dos espermatozoides tem sido apontada como uma das causas para a infertilidade ou hipofertilidade masculina (Auger et al., 1994). Por este motivo, a avaliação da mobilidade dos espermatozoides tem sido utilizada em muitos estudos farmacológicos e toxicológicos (Slott & Perreault 1993).

No capítulo seguinte vai ser realizado um protocolo experimental semelhante ao descrito, mas utilizando como animal de experiência o rato (Wistar), com o objetivo de complementar os resultados obtidos. Esta abordagem experimental vai ao encontro da utilizada por outros autores que também têm realizado estudos nesta área (Chinoy et al., 1991, 1992, 1995).

FASE 2 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE BIOMARCADORES DE FERTILIDADE MASCULINA EM RATO APÓS ADMINISTRAÇÃO REITERADA DE NaF

I. Introdução

Como já foi referido, a falta de consenso em torno dos efeitos que o ião fluoreto pode exercer sobre a função e estrutura dos órgãos de reprodução masculina e a necessidade de complementar os estudos desenvolvidos no capítulo anterior motivou a realização dos protocolos experimentais descritos neste capítulo.

Deste modo, o objetivo deste ensaio experimental foi avaliar o efeito da ingestão de 1 e de 10 mg/kg/dia de NaF (0,45 e 4,5 mg F⁻/kg/dia), através da água de beber, durante 28 dias, sobre o potencial reprodutor do rato macho Wistar, nomeadamente no peso dos epidídimos, peso e capacidade secretória das vesículas seminais, peso dos testículos, avaliação do número dos espermatozoides do epidídimo e determinação dos teores de ião fluoreto nos testículos e nos epidídimos.

II. Materiais e Métodos

Declaração da ética

Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela comissão de Ética Egas Moniz (processo: 835), Almada, Portugal, assim como da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. O ensaio experimental foi realizado segundo as regras e recomendações no cuidado e processamento de animais de laboratório (Diretiva 2010/63/UE) e segundo o *ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research*.

Animais e exposição

Dezoito ratos machos adultos saudáveis Wistar com um peso médio de $462,25 \pm 8,89$ gramas foram alojados em gaiolas de polipropileno com livre acesso a água e dieta padronizada (formulação A04: PANLAB, Espanha). Foram mantidos a uma temperatura de 18–25°C e 40% –60% de humidade em um ciclo claro / escuro de 12 horas, no Biotério da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal). Os ratos foram aleatoriamente alocados em três grupos aleatoriamente. O grupo controlo foi alimentado

com dieta e água *ad libitum*, e os ratos dos dois grupos de estudo foram tratados com 15,5 mg/L e 155 mg/L de NaF *ad libitum* dissolvido em água (1mg/kg/dia de NaF e 10mg/kg/dia, respetivamente) e dieta. Estes teores representam doses aproximadamente 10 e 100 vezes superior à obtida em condições normais de exposição ao ião fluoreto.

Avaliação de parâmetros de fertilidade

No final da exposição ao NaF os ratos foram pesados e submetidos a anestesia por exposição a uma atmosfera saturada em éter etílico, e após confirmação de ausência de resposta dolorosa a estímulo mecânico, foram sacrificados por deslocamento cervical. Procedeu-se à laparotomia longitudinal na cavidade abdominal para acesso e isolamento dos seguintes órgãos: epidídimos, vesículas seminais e testículos. O peso destes órgãos foi expresso como percentagem (%) do peso total de cada animal – peso relativo (Ghosh, 2002).

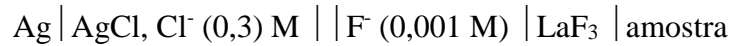
As amostras de sémen, para avaliação do número de espermatozoides, foram obtidas a partir dos epidídimos pelo método de difusão (Slott & Perreault, 1993), tal como foi descrito na fase 1. O teor de frutose das vesículas seminais foi determinado, após desproteinização do sobrenadante, por um método enzimático (Roche), seguindo o mesmo protocolo experimental descrito na fase 1. Os epidídimos e os testículos depois de pesados foram homogeneizados em 2 mL de uma solução tampão e de ajustamento da força iónica (Tabela 6) num Potter Elvehjem e a suspensão obtida foi utilizada para determinação do teor em fluoretos.

Tabela 6 - Composição da solução-tampão e de ajustamento da força iónica - TISAB (total ionic strength adjustor buffer)

Ácido acético glacial	57 mL
NaCl	58 g
Ácido 1,2-ciclo-hexilenodiaminotetra acético (CDTA)	4 g
Água bidestilada	500 mL
Ajustar o pH da solução a 5,0 – 5,5 com uma solução de NaOH	6 N
Água bidestilada	q.b.p. 1 L

O teor de fluoretos foi determinado utilizando um eletrodo-tipo seletivo de ião (eletrodo de fluoreto) que apresenta como membrana sensível um cristal de fluoreto de lantânio. O eletrodo ao entrar em contacto com a solução contendo fluoreto, origina uma diferença

de potencial, através do cristal, a qual está relacionada com a respetiva atividade do ião de fluoreto. Uma das faces do cristal contata com a solução em análise enquanto que a oposta entra em contato com uma solução interna de referência. A célula em causa pode ser representada pelo seguinte esquema:



O desenvolvimento deste tipo de eletrodo surgiu após a publicação da investigação realizada por Frant & Ross (1966) e permitiu a resolução de alguns problemas de interferência provocados por alguns aniões, como os sulfatos e os fosfatos, associados à utilização de métodos colorimétricos para a determinação dos fluoretos. Contudo, este método potenciométrico está também sujeito a algumas interferências: presença de agentes complexantes do ião fluoreto, pH e força iónica da amostra. Estes fatores foram controlados pela adição de uma solução tampão a pH 5,0 – 5,5 às amostras e às soluções padrão que contém um agente complexante e que fornece às soluções a força iónica adequada para a determinação dos fluoretos. Por este motivo foi usada a solução TISAB, atrás referida, que é constituída por um tampão de ácido acético / acetato de sódio e que contém como agente complexante o CDTA (Venkateswarlu, 1994).

A determinação do teor de fluoretos nos preparados de testículos e de epidídimos quer do grupo controlo quer dos grupos expostos ao NaF, foi realizada num analisador de ião seletivo, acoplado a um eletrodo seletivo do ião fluoreto, ORION mod. 94-09, e a um eletrodo de referência, ORION mod. 90-01.

Aos preparados obtido após homogeneização das amostras foi adicionado um volume de tampão TISAB até perfazer 5 mL. Completou-se o volume para 10 mL utilizando água bidestilada. Estas misturas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos e depois decantadas por filtração antes da colocação dos eletrodos.

A concentração de ião fluoreto nas diferentes amostras em análise foi determinada por comparação com uma curva de calibração utilizando soluções de NaF numa gama de concentrações entre 0,03 e 2,0 mg F⁻/L (Figura 16).

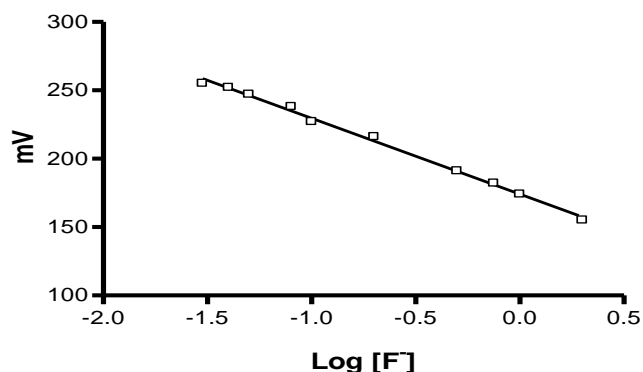


Figura 16 - Curva de calibração obtida por regressão linear utilizando soluções com concentrações conhecidas de NaF (0,03 a 2,0 mg F⁻/L; $y = -55,31x + 174,02$; $r = 0,9967$).

O teor de fluoreto presente em cada epidídimo e testículo foi expresso em μg por g de tecido. Foi ainda calculada a razão entre o teor de fluoreto presente no testículo e no epidídimo para cada animal.

Análise estatística

Os valores dos diferentes parâmetros analisados no presente protocolo experimental foram comparados método *t* de student, para amostras desemparelhadas.

III. Resultados

Efeito do NaF no ganho de peso corporal e no consumo de água e de ração

Na avaliação de ganho de peso dos ratos no início e após 28 dias verificou-se o aumento foi superior no grupo controlo ($87,8 \pm 5,4$ g) e significativamente menor nos ratos do grupo exposto a 10mg/kg/dia ($57,7 \pm 3,7$ g) (tabela 7). Por outro lado, apesar do consumo de água e a ração consumida foi semelhante nos três grupos do estudo (tabela 8).

Tabela 7 - Ganho de peso corporal observado durante o período de 28 dias, para o grupo controlo e para os grupos tratados com NaF (média ± erro padrão).

	Controlo	NaF (1mg/kg/dia)	NaF (10 mg/kg/dia)
Ganho peso corporal (g)	87,8±5,4	88,3±5,4	57,7±3,7*

*P<0.01 vs controlo; n=6

Tabela 8 - Volume de água e quantidade de ração consumida por cada dois ratos de cada grupo, durante todo o protocolo experimental (média ± erro padrão).

	Controlo	NaF (1mg/kg/dia)	NaF (10mg/kg/dia)
Água consumida (mL)	60,2±1,3	60,1±1,6	59,2±1,6
Ração consumida (g)	67,4±0,9	66,9±0,7	66,9±0,6

n= 6

Efeito do NaF nos indicadores de fertilidade masculina

A figura 17 mostra o efeito da exposição ao NaF sobre os indicadores de fertilidade masculina, nomeadamente peso relativo dos epidídimos, das vesículas seminais e dos testículos, teor de frutose nas vesículas seminais e avaliação do número dos espermatozoides do epidídimo. Conclui-se que a exposição ao NaF não provocou alterações no número de espermatozoides dos epidídimos. Por seu lado, as vesículas seminais e os epidídimos dos ratos tratados com NaF apresentam um peso relativo inferior ao do grupo controlo. O peso relativo dos testículos e o teor de frutose nas vesículas seminais são inferiores somente no grupo exposto à dose mais alta de NaF em relação aos valores obtidos no grupo controlo.

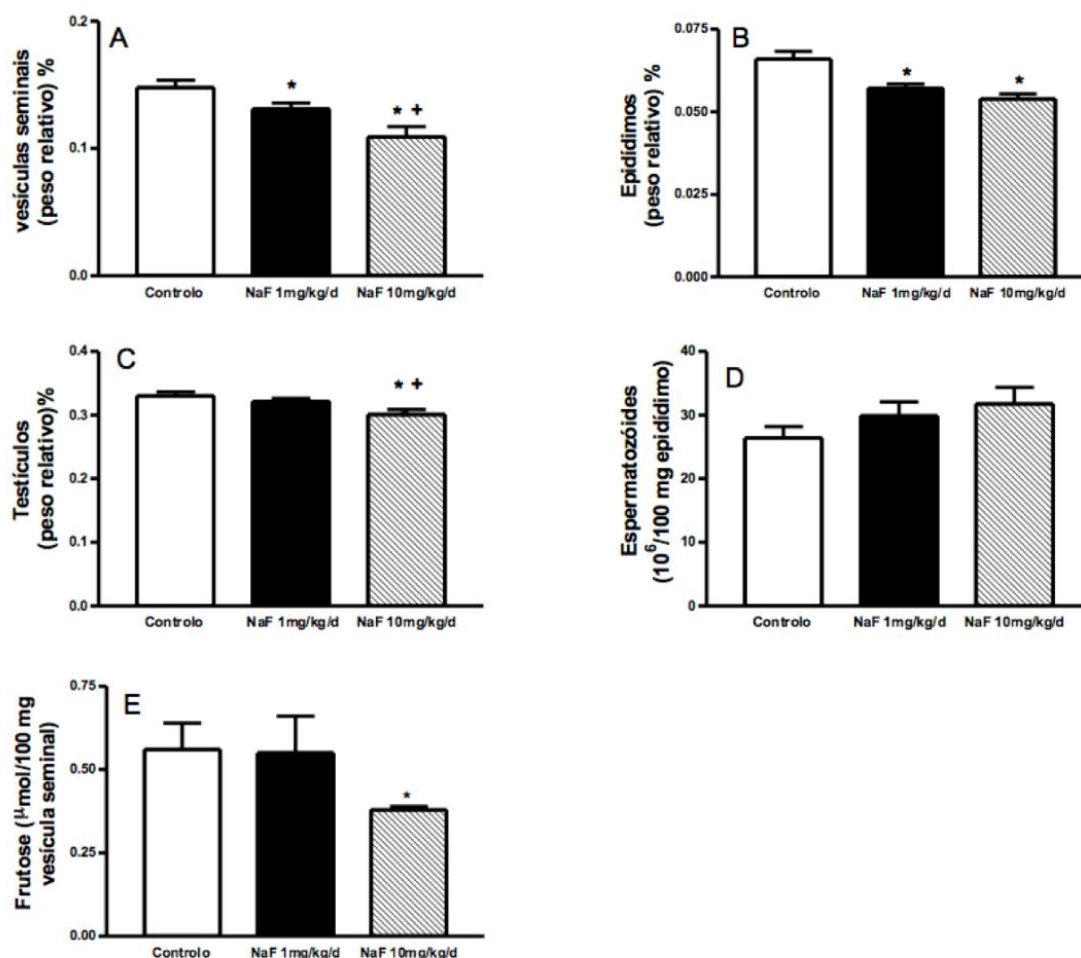


Figura 17 - Avaliação de alguns indicadores de fertilidade masculina no grupo controlo e nos grupos tratados com NaF (1 e 10mg/kg/dia). A – peso relativo das vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo. +P<0,05 vs NaF 1mg/kg/d; B – peso relativo dos epidídimos. *P<0,05 vs controlo; C – peso relativo dos testículos. *P<0,05 vs controlo. +P<0,03 vs NaF 1mg/kg/d ; D - número de espermatozoides do epidídimo; E - teor de frutose nas vesículas seminais. *P<0,05 vs controlo;(n=6).

Teor de ião fluoreto nos epidídimos e nos testículos

Na figura 18 encontram-se os teores de ião fluoreto, obtidos por potenciometria, presentes nos epidídimos e nos testículos dos ratos controlo e dos ratos expostos ao NaF. Verifica-se que nos ratos expostos ao NaF, a razão entre os teores de ião fluoreto presentes no testículo e no epidídimo é inferior à obtida para o grupo controlo. De facto, quando se comparam os valores obtidos no mesmo órgão verifica-se uma forte tendência para o aumento do teor daquele ião nos epidídimos obtidos dos ratos expostos ao NaF.

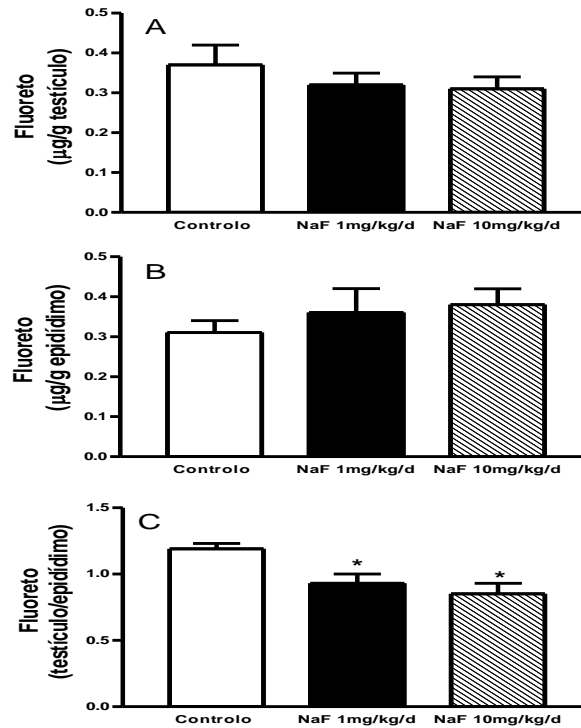


Figura 18 - Teores de ião fluoreto no grupo controlo e nos grupos expostos ao NaF: A – testículos; B – epidídimos; C – razão testículo/epidídimo. * $P < 0,05$ vs controlo; (n=6).

IV. Discussão

Os resultados obtidos neste capítulo mostram que não houve diferença no consumo médio diário de água e de ração entre o grupo controlo e os grupos expostos ao NaF. Collins et al. (2001) demonstraram que os ratos expostos até à dose de 15,6 mg/kg/dia de NaF, durante 20 dias, não modificaram os níveis de consumo de água e de ração em relação ao grupo de animais não tratados. Só para doses de NaF superiores a 24,7 mg/kg/dia e a 25,1 mg/kg/dia é que se observaram diferenças no consumo de água e de ração, respetivamente, em relação ao grupo controlo. Deste modo, a diferença observada no ganho de peso corporal entre os diferentes grupos de animais, durante o protocolo experimental, foi independente da quantidade de água e de ração consumidas, podendo ser atribuída à exposição ao NaF.

O grupo de animais expostos à dose de 10mg/kg/dia de NaF mostraram um aumento de peso corporal inferior ao ocorrido nos outros dois grupos de animais o que pode ser sugestivo de uma toxicidade associada à ingestão daquele composto. Esta observação é

consensual com a realizada por Chinoy et al. (1992) que demonstraram num estudo realizado com ratos, durante 30 dias e expostos a 5 e a 10 mg/kg/dia de NaF, uma redução no peso corporal dos ratos expostos à dose mais alta de NaF. Este conjunto de resultados é sobreponível ao obtido com o protocolo experimental realizado sobre ratinhos. Deste modo e pelo menos na dose de 10mg/kg/dia de NaF não existe diferença de resposta em termos de peso corporal e de consumo de água entre as duas espécies em estudo.

Em relação ao peso relativo dos órgãos estudados verificou-se que os grupos expostos ao NaF apresentam valores inferiores, de um modo dependente da dose, relativamente ao grupo controlo. Gosh et al., (2002) verificaram uma redução no peso relativo das vesículas seminais de ratos expostos a 20 mg/kg/dia de NaF, durante 29 dias. Chinoy et al. (1995) observaram em ratos expostos a 10mg/kg/dia de NaF, durante 30 ou 50 dias, uma modificação no metabolismo proteico ao nível das vesículas seminais, dos testículos e das suspensões de espermatozoides do epidídimo. Esta alteração associada ao decréscimo do teor de proteínas pode justificar a diminuição do peso relativo observado nos órgãos estudados no protocolo experimental descrito neste capítulo. As diferenças em relação aos resultados obtidos nos ratinhos, nos quais não se observaram diferenças no peso relativo dos epidídimos, podem ser indicadoras de uma tolerância ao NaF, pelo menos na dose de 10 mg/kg/dia, dependente da espécie em estudo (Collins et al., 2001).

Em relação à capacidade secretora destas glândulas observou-se uma diminuição dos teores de frutose no grupo tratado com a dose mais alta de NaF. Este efeito foi também observado por outros autores (Chinoy et al., 1995), num protocolo experimental semelhante ao descrito neste capítulo, ou seja, após exposição de um grupo de ratos ao NaF na dose de 10 mg/kg/dia, durante 30 ou 50 dias. Contudo, este efeito e como já foi referido no capítulo anterior não foi observado no ratinho, já que a exposição ao NaF induziu, neste caso, um aumento no teor da frutose das vesículas seminais. Estas diferenças refletem, mais uma vez, a variabilidade que por vezes se observa entre as respostas obtidas a partir de diferentes espécies animais expostas ao mesmo composto.

O teor de frutose no líquido seminal tem sido largamente utilizado como um marcador da função das vesículas seminais (Gonzales, 2001). A OMS (WHO, 2010) inclui a determinação deste açúcar no protocolo de avaliação do esperma humano. A frutose nas vesículas seminais é sintetizada a partir da glucose por duas vias distintas: uma fosforilada e outra não fosforilada (Prendergast & Veneziale, 1975). Esta última via, proposta por

enzimático de muitas enzimas uma vez que a sua ação se pode localizar sobre os cofatores, sobretudo quando estes são iões divalentes, devido à sua alta afinidade para estes elementos ou bloquear alguns grupos funcionais envolvidos nas reações enzimáticas como os grupos tiol e amida (Zakrewska & Udala., 2006).

Deste modo, a redução observada nos teores de frutose das vesículas seminiais dos ratos expostos ao NaF, pode ocorrer por redução da atividade das enzimas envolvidas na síntese daquele açúcar.

Por seu lado o aumento dos níveis de frutose observados no protocolo experimental realizado com ratinhos expostos ao NaF pode ter origem noutra mecanismo suscetível à presença daquele ião. De facto, Chinoy & Sequeira (1989) observaram um aumento do teor de glicogénio no aparelho reprodutor masculino de ratinhos expostos a 10 e 20 mg/kg/dia de NaF, durante 30 dias. O aumento deste composto pode incrementar os níveis de frutose nos ratinhos expostos ao NaF, já que pode contribuir para a síntese da frutose através da via fosforilada, atrás referida. Este aumento, por seu lado, deve sobrepor-se à redução da atividade das enzimas envolvidas nesta via em presença do ião fluoreto. A síntese da frutose, pela via da fosforilação (Prendergast & Venezia, 1975) pode ocorrer de acordo com o esquema a seguir representado (Figura 20):

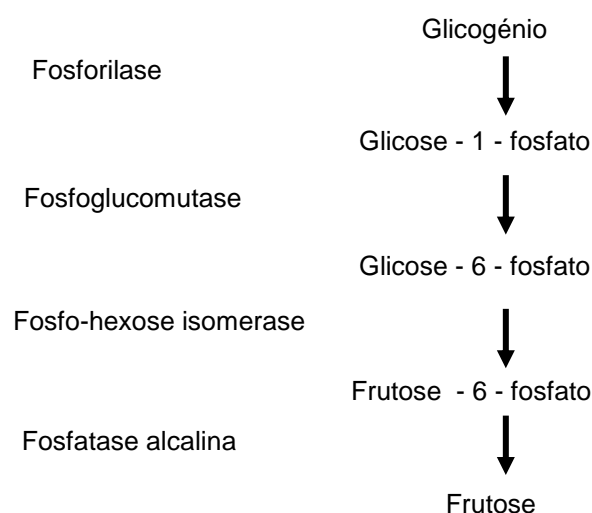


Figura 20 - Via fosforilada de síntese da frutose nas vesículas seminiais.

Em relação ao número de espermatozoides nos epidídimos não se observaram diferenças entre o grupo controlo e os grupos expostos ao NaF. Sprando et al., (1996), demonstraram que a exposição direta dos testículos de rato a concentrações até 250 mg/L de NaF não afetaram a espermatogénese, três semanas após a administração. Estas observações não são consensuais com outros estudos (Gosh et al., 2002; Narayana e Chinoy, 1994). Por exemplo, Gosh et al., (2002), demonstraram que a administração de 20 mg/kg/dia de NaF a ratos durante 29 dias produziu uma redução no número de espermatozoides em relação ao grupo controlo. Como já foi referido anteriormente, a espermatogénese é um processo que conduz à formação dos espermatozoides a partir de células germinais, as espermatogónias, e ocorre no interior dos túbulos seminíferos (Clermont, 1972). O processo da espermatogénese no rato Wistar dura cerca de 53 dias (Clermont, 1972), pelo que qualquer alteração, pelo menos a partir das células germinais, só será quantificável a nível do epidídimo após decorrido um período de tempo superior ao próprio processo de formação dos espermatozoides. Como o nosso estudo envolveu a exposição dos ratos ao NaF durante 28 dias, isto é, por um período de tempo inferior ao da própria espermatogénese, seria expectável que pelo menos a nível quantitativo não se observassem alterações.

Os estudos realizados em ratinho também demonstraram que a exposição ao NaF não modificou a contagem dos espermatozoides. Contudo a mobilidade ficou, neste caso, comprometida. Como já foi mencionado anteriormente, o epidídimo é o órgão responsável pelo armazenamento e maturação dos espermatozoides, incluindo a aquisição de capacidade para se tornarem móveis (Kirchhoff, 1998; Elzanaty et al., 2002). Como o doseamento do teor de fluoretos nos testículos e nos epidídimos revelou que a relação da concentração deste ião entre os testículos e os epidídimos se inverteu após exposição ao NaF é expectável que as alterações a ocorrer possam surgir no decurso do processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo. Assumindo que a distribuição do ião fluoreto no rato é extrapolável para o ratinho, uma vez que os resultados publicados por alguns autores (Gosh et al., 2002; Narayana & Chinoy, 1994; Chinoy & Sharma, 2000; Chinoy et al., 1992), demonstram, tanto em rato como em ratinho, que doses idênticas e períodos de exposição semelhantes ao NaF, produzem alterações significativas na mobilidade dos espermatozoides, pode concluir-se que as características de progressão não linear encontradas nos espermatozoides de ratinho, expostos ao NaF se devem ao níveis de ião fluoreto presentes no epidídimo. Este ião pode comprometer a mobilidade

dos espermatozoides já que é um inibidor de muitos enzimas, alguns dos quais desempenham um papel fundamental na produção de ATP (Zakrzewska & Udala, 2006). Deste modo, pode ficar comprometida a mobilidade dos espermatozoides devido à deficiente produção de energia.

A diminuição ocorrida no peso relativo dos testículos dos ratos expostos ao NaF, sem evidência da acumulação deste composto, pode ficar a dever-se a uma diminuição no metabolismo deste órgão. De facto, alguns autores (Araibi et al., 1989) já demonstraram que exposições ao NaF podem reduzir a atividade secretória da hipófise diminuindo os teores em circulação das gonadotrofinas responsáveis pela regulação do metabolismo testicular.

FASE 3 - ESTUDO DO EFEITO DO IÃO FLUORETO NA CONTRATILIDADE DO CANAL DEFERENTE

I. Introdução

O efeito do ião fluoreto sobre a função e estrutura dos órgãos de reprodução permanece por esclarecer Schulz & Lamb publicaram em 1925 um dos primeiros estudos sobre a existência de uma correlação positiva entre a infertilidade masculina e a toxicidade do ião fluoreto. Muitos outros autores têm desenvolvido estudos de investigação relativos a esta temática. Contudo, as conclusões associadas a estes estudos nem sempre foram consensuais, existindo dados que mostram que o ião fluoreto não exerce qualquer efeito sobre a fertilidade masculina (Tao & Suttie 1976, Li et al., 1987, Heindel et al., 1996) e outros que revelam que parte dos efeitos indesejáveis da exposição a este ião resultam das alterações que ocorrem a nível do aparelho reprodutor masculino (Kumar & Susheela 1994, Gosh et al., 2002). Por outro lado, os estudos realizados sobre o efeito deste ião na contratilidade de alguns tecidos têm mostrado que é possível observar um aumento ou uma diminuição daquela resposta em função da concentração de ião fluoreto utilizada nos protocolos experimentais (Zhao & Guénard 1997). Continua assim por clarificar o efeito do ião fluoreto sobre as diferentes estruturas do aparelho reprodutor masculino, nomeadamente o papel que este ião pode desempenhar na modulação da contração do canal deferente.

Deste modo, o objetivo deste ensaio experimental foi estudar o efeito do ião fluoreto sobre a contratilidade do canal deferente no rato Wistar. Especificamente, será avaliado o 1) efeito do fluoreto de sódio na contratilidade do canal deferente de rato, induzida por noradrenalina; 2) o efeito da ingestão de fluoreto de sódio, durante 28 dias, na contratilidade do canal deferente de rato Wistar, induzida por noradrenalina, e 3) caracterização dos possíveis mecanismos envolvidos através da medição da noradrenalina endógena nas preparações de canal deferente estimuladas com fenilefrina, na presença de fluoreto de sódio.

II. Metodologia

Declaração da ética

Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela comissão de Ética Egas Moniz (processo: 835), Almada, Portugal, assim como da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. O ensaio experimental foi realizado segundo as regras e recomendações no cuidado e processamento de animais de laboratório (Diretiva 2010/63 / UE) e segundo o *ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research*.

Animais e exposição

Vinte e um ratos machos adultos saudáveis Wistar, com pesos entre os 220 e os 250g foram alojados em gaiolas de polipropileno com livre acesso a água e dieta padronizada (formulação A04: PANLAB, Espanha). Foram mantidos a uma temperatura de 18–25°C e 40% –60% de humidade em um ciclo claro / escuro de 12 horas, no Biotério da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal). Os ratos foram aleatoriamente alocados em três grupos aleatoriamente. O grupo controlo foi alimentado com dieta e água *ad libitum*, e os ratos dos dois grupos de estudo foram tratados com 1 mg/L e 10 mg/L de NaF *ad libitum* dissolvido em água (1mg/kg/dia de NaF e 10mg/kg/dia, respetivamente) e dieta.

Efeito do NaF na contratilidade do canal deferente de rato, induzida por noradrenalina

Cada preparado de canal deferente, proveniente de ratos não tratados (Controlo) e de ratos sujeitos à administração reiterada de NaF durante 28 dias, foi utilizado para elaboração de uma única curva concentração resposta (c.c.r) de noradrenalina. Foram realizadas c.c.r. de noradrenalina na ausência e subsequentemente em presença de fluoreto de sódio, nas concentrações de 100 nM e 100 µM, de acordo com o ensaio experimental de Pinto (2006). Cada c.c.r. foi caracterizada a partir dos parâmetros E_{max} e $CE_{50\%}$, calculados a partir de uma análise de regressão não linear utilizando para o efeito um software específico (Enzfitter v.3.1).

Efeito do NaF sobre a concentração de noradrenalina endógena em soluções de perfusão provenientes de preparações de canal deferente de rato, estimuladas com fenilefrina.

Cada preparação de canal deferente foi colocada num banho de órgãos contendo 5 mL de solução de Krebs Henseleit (solução de perfusão) adicionada de NaF na concentração de 100 μM , mantida a 37 °C e arejada com uma mistura constituída por 95% em O₂ e 5% em CO₂ (carbogénio, Air Liquid®). Antes da realização do protocolo experimental, os preparados foram sujeitos a um período de estabilização de 30 minutos, com uma lavagem intermédia aos 15 minutos. As amostras para determinação do teor em noradrenalina foram obtidas após incubação de 5 minutos na ausência (amostra controlo) ou na presença de fenilefrina numa gama de concentrações idêntica à usada nos protocolos para obtenção das curvas concentração resposta de noradrenalina (2 - 32 μM). Antes da adição de cada concentração, crescente e isolada, do agonista adrenérgico os preparados foram sujeitos a um período de estabilização de 5 minutos, procedendo-se à sua lavagem com a solução de perfusão após o período de incubação. As soluções de incubação foram conservadas a -70°C até serem utilizadas para determinação do teor de noradrenalina por HPLC.

Análise estatística

Os valores obtidos com cada um dos preparados de canal deferente foram comparados pelo método *t* de student, para amostras desemparelhadas. Os dados obtidos com as soluções de perfusão foram comparados por análise de variância (ANOVA – one-way) associada a um teste de tendência linear, por forma a identificar uma possível correlação entre as concentrações de fenilefrina utilizadas e as quantidades de noradrenalina libertadas.

III. Resultados

Efeito do NaF na contratilidade do canal deferente de rato, induzida por noradrenalina

Na figura 21 encontram-se apresentadas as c.c.r. obtidas com a noradrenalina na ausência (curva controlo) e na presença de NaF (100nM e 100µM). A curva do grupo controlo representada a média das curvas controlo obtidas nos protocolos experimentais em que foram testadas as duas concentrações de NaF. Os ratos expostos a NaF (100nM e 100µM) tiveram uma diminuição na contratilidade do canal deferente. As c.c.r. obtidas na presença do fluoreto de sódio observou-se uma redução do E_{max} em relação à curva controlo, como mostram os valores referidos na tabela 9.

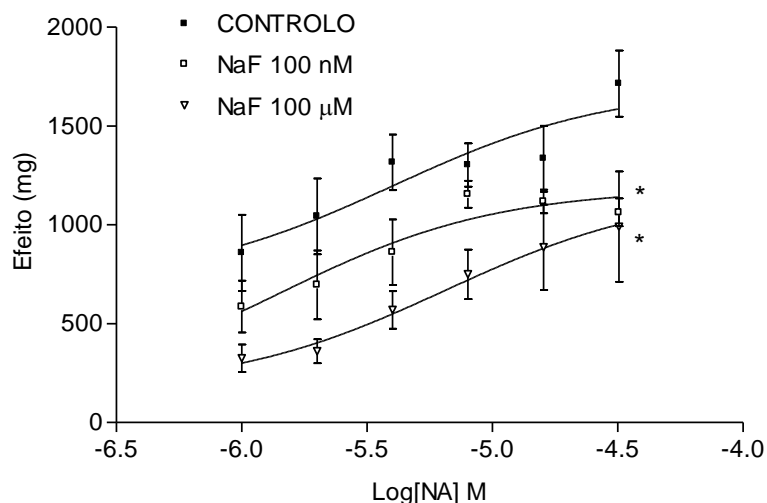


Figura 21 - Efeito do NaF (100nM e 100µM) nas c.c.r. de NA (n=4, *P versus controlo <0,05).

Tabela 9 - Efeito do NaF nos parâmetros das curvas concentração-resposta obtidas com noradrenalina (média ± erro padrão).

	Controlo	NaF 100 nM	NaF 100 µM
E_{max} (%)	100 (1493±177mg)	77,5±6,8*	63,6±10,6*
CE_{50} (µM)	2,6±0,3	5,1±2,8	4,2±0,6

*P versus controlo <0,05; n=4

Efeito da ingestão de NaF na contratilidade do canal deferente de rato, induzida por noradrenalina

Para avaliar o efeito *in vivo* do NaF na contratilidade do canal deferente foi elaborada uma única c.c.r. por cada preparado, proveniente de ratos não expostos (curvas controlo) e de ratos expostos a NaF (1mg/kg/dia e 10mg/kg/dia), durante 28 dias. A figura 22 mostra as c.c.r. obtidas com a noradrenalina nestes preparados. Estes resultados mostram que o efeito do ião fluoreto sobre a contratilidade do canal deferente é função da dose de ião fluoreto utilizada nos ensaios experimentais. De facto, as c.c.r. obtidas a partir de preparados de canal deferente de rato tratados com a dose mais baixa de NaF (1mg/kg/dia) apresentam um aumento do E_{max} em relação à curva controlo, enquanto que as c.c.r. correspondentes à dose mais alta de NaF (10mg/kg/dia) mostram uma redução do E_{max} (tabela 10).

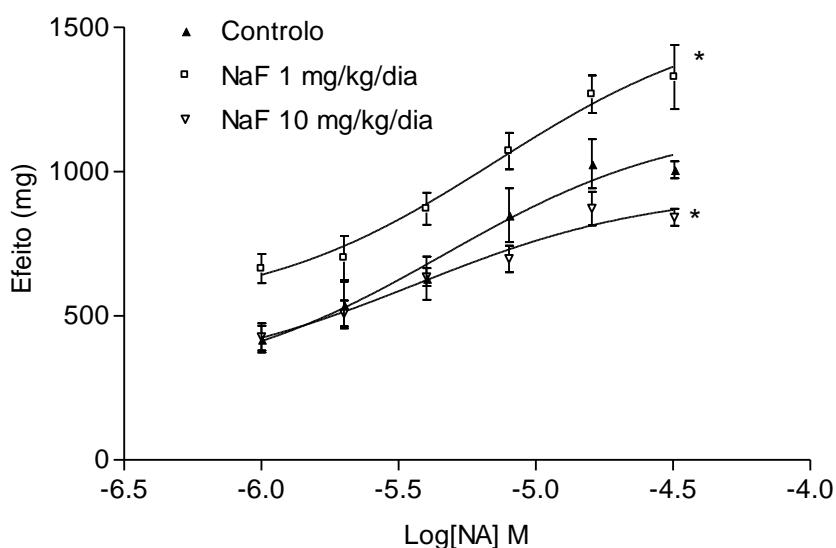


Figura 22 - Efeito da ingestão do NaF (1mg/kg/dia e 10mg/kg/dia), durante 28 dias, nas c.c.r. de NA (n=9, *P versus controlo <0,05).

Tabela 10 - Efeito da administração reiterada de NaF, durante 28 dias, nos parâmetros das curvas concentração-resposta obtidas com noradrenalina (média \pm erro padrão).

	Controlo	NaF 1mg/kg/dia	NaF 10mg/kg/dia
E_{max} (mg)	1081 \pm 56	1329 \pm 64*	932 \pm 35*
$CE_{50\%}$ (μ M)	4,6 \pm 1,2	2,5 \pm 0,3	3,1 \pm 0,8

*P *versus* controlo <0,05; n=9

Efeito do NaF sobre a concentração de noradrenalina endógena em soluções de perfusão provenientes de preparações de canal deferente de rato, estimuladas com fenilefrina

Os resultados obtidos por Pinto et al., 2006 mostram que a fenilefrina, ao nível do canal deferente de rato, induz um aumento da libertação de noradrenalina de um modo dependente da concentração por um mecanismo que envolve a óxido nítrico sintetase (NOS). Com este protocolo experimental procurou-se investigar se também o NaF poderia interferir com esta libertação, por forma a compreender os possíveis mecanismos envolvidos na elaboração das c.c.r. obtidas na presença daquele composto. A figura 23 mostra que o NaF na concentração igual à mais alta das utilizadas nos protocolos para elaboração das c.c.r. (100 μ M), não modificou a libertação de noradrenalina após estimulação com fenilefrina.

Estes resultados sugerem que o NaF não modifica a libertação da noradrenalina pelos preparados de canal deferente, após estimulação com fenilefrina. Deste modo, o mecanismo envolvido na modulação da contratilidade destes preparados, na presença de NaF, não está relacionado com a libertação daquele neuromodulador adrenérgico, pelo menos quando a resposta contrátil na presença daquele composto se encontra reduzida.

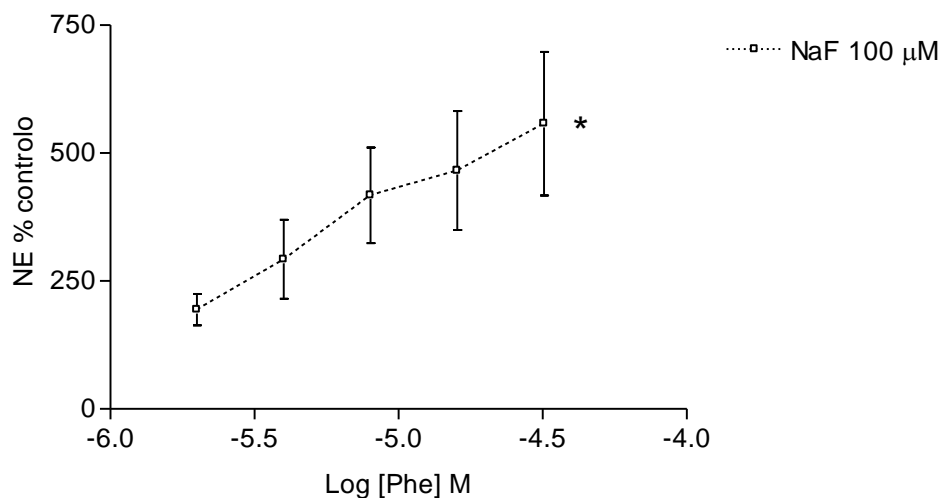


Figura 23 - Efeito do NaF sobre a liberação de noradrenalina, após estimulação com fenilefrina. Controle - 100% ([Phe]=0) = $292,8 \pm 29,1$ pg NE/100 mg; (*P < 0,05, para tendência linear da curva controle, n=8).

IV. Discussão

Neste capítulo foi avaliado o efeito do ião fluoreto sobre a contratilidade do canal deferente. Verificou-se que nos protocolos experimentais realizados com adição de NaF à solução de perfusão a resposta contrátil apresentou um E_{max} inferior ao obtido com os preparados controlos. Por outro lado, quando se avaliou a contratilidade de preparados de canal deferente provenientes de ratos tratados com NaF, observou-se que doses baixas promovem um aumento da contratilidade enquanto que doses altas conduzem a uma diminuição desta resposta relativamente a preparados provenientes de ratos não tratados (controle). Relativamente aos possíveis mecanismos associados a este tipo de resposta contrátil concluiu-se que o NaF, contrariamente ao que sucede com o NO (Óxido nítrico), não interfere com a liberação da noradrenalina endógena, após estimulação com fenilefrina. Deste modo, exclui-se um mecanismo idêntico ao do NO para explicar o efeito do NaF sobre a modulação da contratilidade do canal deferente de rato, pelo menos quando a resposta contrátil na presença daquele composto se encontra reduzida. De facto, Ito et al. (1991), também demonstraram que o NaF pode promover a liberação de catecolaminas a partir das células cromafins da medula suprarrenal bovina através da estimulação do metabolismo dos fosfatos de inositol. Este mecanismo juntamente com outros já descritos para o NaF como sejam, a ativação de proteínas G (Hattori et al., 2000), e a ativação de canais de cálcio e da proteína cinase C (Ratz & Blackmore, 1990), podem

explicar os efeitos do ião fluoreto sobre os preparados de canal deferente obtidos de ratos tratados com a dose mais baixa de NaF (1mg/kg/dia). Neste caso, o NaF promoveu um aumento da resposta contrátil relativamente aos preparados não tratados (controlo). Nos restantes protocolos experimentais o ião fluoreto reduziu aquela resposta, o que mostra que os efeitos associados a este elemento são dependentes das doses/concentrações que se utilizaram nos diferentes protocolos experimentais (Zhao & Guénard 1997). De facto, o ião fluoreto é um inibidor de muitas enzimas, algumas das quais desempenham um papel fundamental na produção de ATP (Zakrzewska et al., 2002). Inclui-se, neste caso, a enolase que é uma enzima que participa na glicólise e que catalisa a desidratação do ácido-2-fosfoglicérico em ácido fosfoenolpirúvico (Mayes, 1987). Esta inibição envolve a formação de um complexo em que participam o magnésio, o ião fluoreto e o anião fosfato (Wan et al., 2006). Deste modo, a inibição desta enzima pode resultar numa diminuição da produção de ATP, por via da glicólise, provocando uma diminuição da resposta contrátil do tecido muscular na presença de NaF (Zhao & Guénard, 1997). Foi, também, demonstrada uma diminuição da resposta do tecido muscular ao cálcio, na presença de NaF. Estes últimos efeitos atribuídos ao NaF podem justificar a diminuição do efeito máximo observada nalgumas preparações de canal deferente tratadas com aquele composto. Em conclusão, os resultados obtidos neste capítulo demonstram, tal como já foi referido por outros autores (Zhao e Guénard, 1997; Himpens et al, 1991; Leurs et al, 1991), que o NaF em concentrações baixas promove o aumento da resposta contrátil enquanto que em concentrações elevadas origina uma diminuição daquela resposta. Uma vez que o NaF pode modular a contratilidade do canal deferente de rato, parece útil estender o estudo do efeito deste composto ao aparelho reprodutor masculino.

IV. CONCLUSÕES FINAIS

Os efeitos da administração reiterada de NaF sobre as estruturas anatómicas e funcionais relacionadas com a fertilidade masculina do ratinho Charles River e no rato Wistar foi avaliado ao longo deste projeto de investigação. No grupo os ratinhos Charles River machos submetido à ingestão de 10 mg/kg/dia de NaF durante 28 dias, verificou-se alteração nos padrões de mobilidade dos espermatozoides que, possivelmente é a causa da diferença do número de partos que ocorreram por dia entre o grupo de fêmeas não-tratadas que acasalaram com os machos não-tratados e o grupo de fêmeas não tratadas que acasalaram com os machos tratados encontrada. Por seu lado, o estudo do efeito da administração reiterada de NaF (1 e 10 mg/kg/dia), durante 28 dias, na fertilidade de ratos macho Wistar mostrou que o peso relativo dos testículos, dos epidídimos e das vesículas seminais nos grupos expostos ao NaF apresentaram valores inferiores de um modo dependente da concentração, relativamente ao grupo controlo.

A capacidade secretora das vesículas seminais também foi afetada já que se observou uma diminuição dos teores de frutose no grupo tratado com a dose mais alta de NaF. Estes resultados contrastam com os obtidos no protocolo experimental que utilizou ratinhos, já que neste caso a exposição ao NaF induziu um aumento no teor da frutose das vesículas seminais. Estas diferenças refletem a variabilidade que por vezes se observa entre as respostas obtidas a partir de diferentes espécies animais expostas ao mesmo composto.

Este estudo revelou também que a exposição ao ião fluoreto provocou a inversão da razão entre a concentração de fluoretos no testículo e no epidídimo. Assumindo que a distribuição do ião fluoreto no rato é extrapolável para o ratinho, como alguns autores já demonstraram, esta acumulação de fluoreto no epidídimo pode ser a causa para as modificações encontradas ao nível da mobilidade dos espermatozoides. De facto, é conhecido o efeito inibidor deste ião sobre algumas enzimas que desempenham um papel fundamental na produção de ATP. Uma vez que os protocolos realizados sobre ratos e ratinhos revelaram que a exposição ao ião fluoreto pode prejudicar a fertilidade masculina.

Os resultados mostraram que nos protocolos experimentais realizados com adição de NaF à solução de perfusão a resposta contrátil apresentou um E_{max} inferior ao obtido com os preparados no grupo controlo. Por outro lado, quando se avaliou a contratilidade de preparados de canal deferente provenientes de ratos tratados com NaF, observou-se que

doses baixas promovem um aumento da contratilidade enquanto que doses altas conduzem a uma diminuição desta resposta relativamente a preparados provenientes de ratos não-tratados.

Relativamente aos possíveis mecanismos associados a este tipo de resposta contrátil concluiu-se que o NaF, contrariamente ao que sucede com o NO (Pinto et al. 2006), não interfere com a libertação da noradrenalina endógena, após estimulação com fenilefrina. Deste modo, exclui-se um mecanismo idêntico ao do NO para explicar o efeito do NaF sobre a modulação da contratilidade do canal deferente de rato, pelo menos quando a resposta contrátil na presença daquele composto se encontra reduzida.

Estes resultados confirmam que os efeitos associados ao ião fluoreto são dependentes das doses/concentrações que se utilizaram nos diferentes protocolos experimentais e que as doses baixas promovem o aumento da resposta contrátil enquanto que as concentrações/doses elevadas originam uma diminuição daquela resposta. Uma vez que o NaF tal como o NO, pode modular a contratilidade do canal deferente de rato, alargou-se o estudo do efeito deste composto sobre o aparelho reprodutor masculino.

O flúor, principalmente devido à sua ação anticariogénica tem vindo a ser adicionado à água de abastecimento público em alguns países (de forma a adicionar quantidades capazes de gerar efeitos na prevenção da cárie dentária), a produtos dentífricos (pastas dentífricas e colutórios), alimentos, suplementos (comprimidos, gotas). Apesar de muitos considerarem estas medidas de fluoretação da água de consumo, assim como a adição de flúor a outros produtos, um avanço na melhoria da Saúde Oral dos indivíduos, esta temática tem-se revelado controversa ao longo dos anos.

Para além das fontes artificiais, o flúor também se encontra já presente na água, solo e ar de forma natural. Por isso é de enorme importância ter em conta que a soma das quantidades de flúor, ingeridas das diversas fontes, pode ultrapassar os valores médios recomendados e, desta forma, serem atingidos níveis tóxicos relativos ao flúor. A partir destes níveis, o flúor perde a sua ação benéfica no organismo humano e passa a originar efeitos tóxicos que, dependendo do tempo de exposição e das quantidades ingeridas, podem ser agudos ou crónicos.

A fluorose dentária e esquelética são as duas patologias mais estudadas ligadas, existem outras doenças e alterações que foram associadas ao consumo excessivo de flúor, tais

como alterações na tiróide (hipotireoidismo), sistema reprodutor, efeitos no sistema nervoso central (SNC) e deslipidémias, rins e fígado. Podem ainda ocorrer alterações no funcionamento de enzimas e modificações eletrolíticas.

Consideramos que este tema é de grande importância, uma vez que se trata da adição de uma substância à água, um bem essencial à vida, e cujos efeitos a longo prazo devem ser estudados. Se por um lado pode ter efeitos benéficos na saúde oral como forma de prevenir as cáries, os estudos que têm vindo a demonstrar os seus vários efeitos tóxicos devem ser tidos em consideração para melhorar suportar as políticas de fluoretação que afetam a população mundial. Julgamos ser de enorme importância um bom esclarecimento da população, a fim de diminuir o índice de casos de doença e alterações que o ião fluoreto pode induzir, assim como se torna de enorme relevância novos estudos científicos com este halogénio.

Limitações

Em determinadas áreas é muito frequente o uso de alguns modelos animais com o objetivo de possibilitar a transposição dos resultados para benefício da saúde humana.

Em Portugal a utilização de animais depende da obtenção de autorização ou creditação por parte da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), que é a entidade governamental competente para a proteção dos animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos, assim como a necessidade de acreditação de todas as pessoas e entidades envolvidas na utilização de animais para fins experimentais ou de ensino.

Desta forma foi importante estar integrada num grupo de trabalho acreditado, mas sempre muito dependente de pessoas e instalações.

A utilização do rato e ratinho como modelos para o estudo de infertilidade masculina está muito descrita e estudada e com uma grande utilidade a nível humano.

V. PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho levantam uma série de questões que seria interessante esclarecer no futuro, nomeadamente:

Consideramos que um aspeto de enorme importância é que a questão da soma das quantidades de flúor das diversas fontes, ingeridas pode ultrapassar os valores médios recomendados. Seria por essa razão de extrema importância levar a cabo um estudo rigoroso para determinar a quantidade média total ingerida por um indivíduo/dia.

Seria também da maior importância e interessante avaliar o efeito do ião fluoreto sobre a mobilidade dos espermatozoides humanos, de forma a verificar se os efeitos induzidos pelo NaF em ratinho e rato, seriam também observados em humanos, para assim se poder concluir sobre o potencial efeito nefasto de excesso de fluor na fertilidade masculina.

Com inúmeras petições a exigir o fim do uso de animais em contexto científico, procuram-se alternativas. Vários cientistas, sugerem culturas de células e modelos de órgãos como alternativas viáveis para o uso de animais, no entanto, as respostas devem ainda assim ser testadas em outros organismos multicelulares antes de serem aplicadas em humanos. Daí também termos utilizado dois modelos de animais diferentes.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aasenden R., Peebles T.C. (1978). Effects of fluoride supplementation from birth on dental caries and fluorosis in teenaged children. *Arch Oral Biol*, 23 (2), 111-5. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90194-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90194-0).
- Amann, RP (2008). The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *Journal of Andrology*, 29, 469- 487 <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655>.
- Araibi A., Yousif H., Al-Dewachi Os. (1989). Effect of high fluoride on the reproductive performance of the male rat. *J Eiol Sci Res* 20: 19-30.
- Auger J., Serres C., Wolf J.P., (1992). Jouannet P. [Sperm motility and fertilization] *Contraception, Fertilite, Sexualite*, 22 (5), 314-318.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.* 5, 188 (2), 319-33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>.
- Bass K., Mitchell P.J., Wilcox G.D, Smith J, (1991). Methods for the reduction of shape change and dendritic growth in zinc-based secondary cells, *Journal of Power Sources*, Volume 35, Issue 3, Pages 333-351, ISSN 0378-7753, [https://doi.org/10.1016/0378-7753\(91\)80117-G](https://doi.org/10.1016/0378-7753(91)80117-G).
- Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2010). Introduction to General, Organic, and Biochemistry (9th). In *Elements*.
- Biersteker, K., Zielhuis, R. L., Dirks, O. B., van Leeuwen, P., & van Raay, A. (1977). Fluoride excretion in urines of schoolchildren living close to an aluminum refinery in the Netherlands. *Environmental Research*, 13(1), 1977. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(77\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0013-9351(77)90011-1).
- Boyers, S. P., Davis, R. O. & Katz, D. F. (1989) Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*, 12, 165-200.

- Burnstock, G. e Verkhatsky, A. (2010). Vas deferens - um modelo usado para estabelecer a cotransmissão simpática. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 131–139. doi: 10.1016 / j.tips.2009.12.002.
- Burt, B. A. (1992). The Changing Patterns of Systemic Fluoride Intake. *Journal of Dental Research*, 71(5), 1228–1237. <https://doi.org/10.1177/00220345920710051601>.
- Cangussu, M. C. T., Narvai, P. C., Castellanos Fernandez, R., & Djehizian, V. (2002). A fluorose dentária no Brasil: uma revisão crítica. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(1), 7–15. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2002000100002>.
- Chaithra, B., Sarjan, HN & Shivabasavaiah (2020). Sodium Fluoride and Fluoride Contaminated Ground Water Induced Altered Reproductive Performances in Male Rats, *Biological Trace Element Research*. 195, 544–550. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01882-5>.
- Chinoy N. J. & Narayana M. V. (1994) In vitro fluoride toxicity in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology* 8(2), 155-159. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90022-1).
- Chinoy N. J. & Sequeira E. (1989) Fluoride induced biochemical changes in reproductive organs of male mouse. *Fluoride* 22, 78-85.
- Chinoy N. J., Rao M. V., Narayana M. V., Neelakanta E., (1991) Microdose nasal injection of sodium fluoride in the rat. *Reproductive Toxicology*, 5(6): 505-12. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(91\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0890-6238(91)90022-8).
- Chinoy N.J. & Sharma A. K. (2000). Reversal of Fluoride-Induced Alteration in Cauda Epididymal Spermatozoa and Fertility Impairment in Male Mice. *Environ Sci* 7: 29-38.
- Chinoy N.J., Pradeep P.K., Sequeira E. (1992). Effects of fluoride ingestion with protein deficient or protein enriched diets on sperm function of mice. *J Environ Biol*. 13 (1) 55-61.
- Chinoy NJ, Narayana MV, Dalal V, Rawat M, Patel D. (1995). Amelioration of fluoride toxicity in some accessory glands and spermatozoa of rat. *Fluoride*. 28,75–86.

- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. In *Physiological reviews*. 52(1), 198-236, <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>.
- Collins, TFX, Sprando, RL, Black, TN, Shackelford, ME, Bryant, MA, Olejnik, N., Ames, MJ, Rorie, JI, Ruggles, DI, (2001). Avaliação multigeracional de fluoreto de sódio em ratos. *Food and Chemical Toxicology* 39, 601–613.
- Coutton, C., Vargas, A. S., Amiri-Yekta, A., Kherraf, Z. E., Ben Mustapha, S. F., Le Tanno, P., Wambergue-Legrand, C., Karaouzène, T., Martinez, G., Crouzy, S., Daneshpour, A., Hosseini, S. H., Mitchell, V., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Deleuze, J. F., Ray, P. F. (2018). Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in Trypanosoma and human. *Nature Communications*, 9(1), 686. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02792-7>.
- Cunha V. (2014). Inquérito à Fecundidade 2013 – Instituto Nacional de Estatística, I.P. Lisboa. Disponível em: http://ficheiros.parlamento.pt/DILP/NT/XII_Leg/PJL/PJL_867/IF2013.pdf
- Darszon A., López-Martínez P., Acevedo J. J., Hernández-Cruz A., Treviño C. L. (2006) T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 40, 241–252 <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.028>.
- Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., & Treviño, C. L. (2001). Ion transport in sperm signaling. In *Developmental Biology*, 240 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0387>.
- Davison AW. (1987) Pathways of fluoride transfer in terrestrial ecosystems. In: Coughtry PJ, Martin MH, Unsworth MH, eds. *Pollutant transport and fate in ecosystems*. Special Publication Numbers 6 of the British Ecological Society: Oxford: Blacwell Scientific Publications, 193-210.
- Diário da República n.º 235/2017, Série I de 2017-12-07, n.º 152/2017, 6555 – 6576. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/152/2017/12/07/p/dre/pt/html>

- Dey S., & Giri, B. (2016). Fluoride Fact on Human Health and Health Problems: A Review. *iMedPub Journals*. <https://doi.org/10.21767/2471-299X.1000011>.
- Direção Geral de Saúde (2005). Texto de Apoio ao Programa Nacional de Promoção da Saúde Oral, Fluoretos. Programa Nacional de Promoção da Saúde Oral.
- Dixon, J. S., Jen, P. Y. P., & Gosling, J. A. (1998). Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: A review. *Microscopy Research and Technique*, 42(6), 423–432. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<423::AID-JEMT5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<423::AID-JEMT5>3.0.CO;2-N).
- Domingos, P., Ricci-Donato, H., e Russil, A. (2018). Riscos do uso do fluor sistémico. Revisão de Literatura. *Journal of Research in Dentistry*, 6(4), 86-90.
- Dowel T.B., (1981). The use of toothpaste in infancy. *Br Dent J.*, 150, 247-249.
- Dreisbach R., (1980). *Handbook of poisoning: prevention, diagnosis and treatment*. Los Altos, CA: Lange Medical Publishers.
- Duckworth, S., Duckworth, R. (1978). The ingestion of fluoride in tea. *Br Dent J* 145, 368-370. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4804181>.
- Eddy, E. M. (2006). The spermatozoon. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3th ed.), Elsevier, St. Louis, USA, 3–54. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50006-3>.
- Ekstrand J (1996). Fluoride Metabolism. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt B, Eds. *Fluoride in Dentistry*, 2nd Edition. Munksgaard, Denmark, 4, 55-65.
- Ekstrand J. A. (1977) Micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. *Calcified Tissue Research*, 23, 225-228. <https://doi.org/10.1007/BF02012789>.
- Ekstrand J., Koch G., Lindgren LE, Petersson L.G. (1981) Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults. *Caries Res*, 15 (3), 213-220; <https://doi.org/10.1159/000260517>.

- Ekstrand, J. (1978). Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. *Caries Research*, 12(3), 123–127. <https://doi.org/10.1159/000260321>.
- Ekstrand, J., & Ehrnebo, M. (1979). Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 16, 211–215. <https://doi.org/10.1007/BF00562063>.
- Ekstrand, J., & Ehrnebo, M. (1980). Absorption of fluoride from fluoride dentifrices. *Caries Research*, 14(2), 96–102. <https://doi.org/10.1159/000260442>.
- Ekstrand, J., Alván, G., Boréus, L. O., & Norlin, A. (1977). Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 12(4), 311–317. <https://doi.org/10.1007/BF00607432>.
- Ekstrand, J., Ehrnebo, M., & Boréus, L. O. (1978). Fluoride bioavailability after intravenous and oral administration: Importance of renal clearance and urine flow. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 23(3), 329–337. <https://doi.org/10.1002/cpt1978233329>.
- Ekstrand, J., Ehrnebo, M., Whitford, G. M., & Järnberg, P. O. (1980). Fluoride pharmacokinetics during acid-base balance changes in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 18(2), 189–194. <https://doi.org/10.1007/BF00561589>.
- Ekstrand, J., Ericsson, Y., & Rosell, S. (1977). Absence of protein-bound fluoride from human blood plasma. *Archives of Oral Biology*, 22(4), 229–232. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(77\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(77)90106-6).
- Ekstrand, J., Fomon, S. J., Ziegler, E. E., & Nelson, S. E. (1994a). Fluoride pharmacokinetics in infancy. *Pediatric Research*, 35(2), 157–1. <https://doi.org/10.1203/00006450-199402000-00006>.
- Ekstrand, J., Hardell, L. I., & Spak, C. J. (1984). Fluoride balance studies on infants in a 1-ppm-water-fluoride area. *Caries Research*, 18(1), 87–92. <https://doi.org/10.1159/000260753>.

- Ekstrand, J., Spak, C. J., & Vogel, G. (1990). Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. *Journal of Dental Research*, 69, 550–555. <https://doi.org/10.1177/00220345900690s109>.
- Ekstrand, J., Ziegler, E. E., Nelson, S. E., & Fomon, S. J. (1994b). Absorption and retention of dietary and supplemental fluoride by infants. *Advances in Dental Research*, 8(2), 175–180. <https://doi.org/10.1177/08959374940080020701>.
- Elbadawi A., Goodman D.C. (1980) Autonomic innervation of accessory male genital glands. In: Spring-Mills E, Hafez ESE (eds) Male accessory sex glands. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 101–128.
- Elbetieha A, Darmani H, Al-Hiyasat A (2000). Fertility effects of sodium fluoride in male mice. *Fluoride*. 33, 128–134.
- Elzanaty S. (2007), Association between Age and Epididymal and Accessory Sex Gland Function and their Relation to Sperm Motility. In *Archives of Andrology*, 53 (3), 149-156.
- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J., & Giwercman, A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction*, 17(11), 2904–2911. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2904>.
- Fawell, J., Ohanian E., Giddings M., Toft P., Magara Y., Jackson P. (2006). Fluoride in Drinking-water. World Health Organization (WHO), IWA Publishing, London, UK. disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/fluoride.pdf
- Featherstone, J. D. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association*, 131 (7), 887-899. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>.
- Featherstone, J. D. B. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level flouride. *Community Dent Oral Epidemiol*, 27(1), 31-40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>

- Fejerskov, O. (2006). *Cariologia Hoje*. Paper presented at: VI Curso de Atualização em Medicina Dentária Preventiva e Comunitária, Lisboa.
- Frant, M. S., & Ross, J. W. (1966). Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*, 154(3756), 1553. <https://doi.org/10.1126/science.154.3756.1553>
- Fuge, R. (1988). Sources of halogens in the environment, influences on human and animal health. *Environmental Geochemistry and Health*, 10(2), 51–61. <https://doi.org/10.1007/BF01758592>
- Fuge, R., & Andrews, M. J. (1988). Fluorine in the UK environment. *Environmental Geochemistry and Health*, 10, 96–104. <https://doi.org/10.1007/BF01758677>
- Ghosh, D., Das, S., Maiti, R., Jana, D., & Das, U. B. (2002). Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: Association with oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, 16(4), 385–390. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00038-2)
- Glemser Q. Inorganic fluorine chemistry, (1986). In *Fluorine Chemistry*. 1986; 33: 45-69.
- Gonzales, G. F. (2001). Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 3(4), 251–258.
- Gupta R, Khan T, Agrawal D, Kachhawa J. The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats. (2007). *Toxicology and Industrial Health*, 23 (9), 507-513. <https://doi.org/10.1177%2F0748233708089041>.
- Guy W.S. (1976). Inorganic and organic fluorine in human blood. In: Johansen E, Taves D, Olsen TO, eds. *Continuing evaluation of the use of fluorides*. AAAS selected Symp 11. Boulder, CO: Westview Press, 125-147.
- Haidouti, C., Chronopoulou, A., & Chronopoulos, J. (1993). Effects of fluoride emissions from industry on the fluoride concentration of soils and vegetation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(2), 1993. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90037-R](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90037-R).

- Haikel, Y., Voegel, J. C., & Frank, R. M. (1986). Fluoride content of water, dust, soils and cereals in the endemic dental fluorosis area of Khouribga (Morocco). *Archives of Oral Biology*, 31(5), 279–286. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90041-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90041-5).
- Harji, F., Gonzales, J., Galindo, R., & Dail, W. G. (1998). Preganglionic fibers in the rat hypogastric nerve project bilaterally to pelvic ganglia. *Anatomical Record*, 252(2), 229–234. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199810\)252:2<229::AID-AR8>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199810)252:2<229::AID-AR8>3.0.CO;2-Y).
- Hattori, Y., Matsuda, N., Sato, A., Watanuki, S., Tomioka, H., Kawasaki, H., & Kanno, M. (2000). Predominant contribution of the G protein-mediated mechanism to NaF-induced vascular contractions in diabetic rats: Association with an increased level of G(q α) expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(2), 761–776.
- Heindel, J. J., Bates, H. K., Price, C. J., Marr, M. C., Myers, C. B., & Schwetz, B. A. (1996). Developmental toxicity evaluation of sodium fluoride administered to rats and rabbits in drinking water. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30, 162–177. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0053>.
- Hers H., Glycogen Storage Disease, Editor(s): Rachmiel Levine, Rolf Luft, *Advances in Metabolic Disorders*, Elsevier, Volume 1, Pages 1-44, ISSN 0065-2903, ISBN 9781483167480, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-6748-0.50006-9>.
- Himpens, B., Missiaen, L., Droogmans, G., & Casteels, R. (1991). AIF4⁻ induces Ca²⁺ oscillations in guinea-pig ileal smooth muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 417, 645–650. <https://doi.org/10.1007/BF00372964>.
- Hodge, H. C., & Smith, F. A. (1965). Biological Properties of Inorganic Fluorides. In *Fluorine Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395577-7.50007-1>.
- Ito, S., Negishi, M., Mochizuki-Oda, N., Yokohama, H., & Hayaishi, O. (1991). Sodium Fluoride Mimics the Effect of Prostaglandin E2 on Catecholamine Release from Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 56(1), 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02560.x>.

- Järnberg, P. O., Ekstrand, J., & Ehrnebo, M. (1983). Renal excretion of fluoride during water diuresis and induced urinary pH-changes in man. *Toxicology Letters*, 18(1–2), 141–146. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(83\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(83)90084-X).
- Jégou, B., 1995. Are semen quality and male fertility at risk? Proceedings of the 15th World Congress on Fertility and Sterility. Montpellier. France. *Fertility and Sterility*. 46, 331-335.
- Jenkins, G. N. (1999). Review of fluoride research since 1959. *Arch Oral Biol*, 44 (12), 985-992. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(99\)00110-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(99)00110-7).
- Jing, J., Zhuang, H., Luo, Y., Chen, H., & Rao, Y. (2019). Vas deferens sonographic appearances of tuberculosis lesions of 19 cases of male genital systemic tuberculosis. *Medicine*, 98(11), 14843. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014843>.
- Kaleczyc, J. (1998). Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. In *Microscopy Research and Technique*. 42, 409-422. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<409::AID-JEMT4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<409::AID-JEMT4>3.0.CO;2-H).
- Kassebaum, NJ, Smith, A., Bernabé, E., Fleming, TD, Reynolds, AE, Vos, T., Murray, C., Marcenes, W., & GBD 2015 Oral Health Collaborators (2017). Prevalência, incidência e anos de vida ajustados por deficiência global, regional e nacional para condições bucais em 195 países, 1990-2015: Uma análise sistemática para a carga global de doenças, lesões e fatores de risco. *Journal of Dental Research*, 96 (4), 380-387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>.
- Kaufmann, R. B., Spitz, A. M., Strauss, L. T., Morris, L., Santelli, J. S., Koonin, L. M., & Marks, J. S. (1998). The decline in US teen pregnancy rates, 1990-1995. *Pediatrics*, 102(5), 1141–11147. <https://doi.org/10.1542/peds.102.5.1141>.
- Kawase, T., & Van Breemen, C. (1992). Aluminium fluoride induces a reversible Ca²⁺ sensitisation in alpha-toxin-permeabilized vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*. 214 (1) 39-44. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90093-J](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90093-J).

- Kihara, K., Kakizaki, H., & De Groat, W. C. (1996). Reorganization of the innervation of the vas deferens after sympathetic decentralization. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 271(6Pt2), 1481–14. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.6.r1481>.
- Kihara, K., Sato, K., & Oshima, H. (1998). Sympathetic efferent pathways projecting to the vas deferens. In *Microscopy Research and Technique*. 42, 398-408. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980915\)42:6<398::AID-JEMT3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980915)42:6<398::AID-JEMT3>3.0.CO;2-J).
- Kirchhoff, C., Osterhoff, C., Pera, I., & Schröter, S. (1998). Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia*. 30, 225-232. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb01164.x>.
- Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Roberts, N. R., Slott, V., & Suarez, J. D. (1990). Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 105, 2, 271-287, [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90189-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90189-2).
- Koslov, D. S., & Andersson, K. E. (2013). Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens-an update. *Frontiers in Pharmacology*, 22(4), 101. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00101>.
- Kumar, A., & Susheela, A. K. (1994). Ultrastructural studies of spermiogenesis in rabbit exposed to chronic fluoride toxicity. *International Journal of Fertility*, 39(3), 164–171.
- Kumar, A., & Susheela, A. K. (1995). Effects of chronic fluoride toxicity on the morphology of ductus epididymis and the maturation of spermatozoa of rabbit. *International Journal of Experimental Pathology*, 76(1), 1–11.
- Lanius, M., & Souza, E. L. A. de. (2010). Reprodução assistida: os impasses do desejo. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, 13(1), 53–70. <https://doi.org/10.1590/s1415-47142010000100004>.

- Leal, S., Carvalho, F. e Carvalho, C. (2015). Conhecimento de alunos do Curso de Odontologia sobre o uso racional do flúor. Brasil, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié.
- Lee, R. E., Caldwell, J., Akland, G. G., & Fankhauser, R. (1974). The distribution and transport of airborne particulate matter and inorganic components in Great Britain. *Atmospheric Environment* (1967), 8(11), 1095–1109. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(74\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0004-6981(74)90044-4).
- Leurs, R., Bast, A., & Timmerman, H. (1991). Fluoride is a contractile agent of guinea pig airway smooth muscle. *General Pharmacology*, 22, 631–663. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(91\)90068-H](https://doi.org/10.1016/0306-3623(91)90068-H).
- Li Y., Dunipace A., J. & Stookey G. K. (1987). Effects of fluoride on the mouse sperm morphology test. *Journal of Dental Research* 66, 1509-1511. <https://doi.org/10.1177/00220345870660091901>.
- Liang, C., He, Y., Liu, Y., Gao, Y., Han, Y., Li, X., Zhao, Y., Wang, J., & Zhang, J. (2020). Fluoride exposure alters the ultra-structure of sperm flagellum via reducing key protein expressions in testis. *Chemosphere*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125772>.
- Lidbeck W.L., Hill I.B., Beeman J.A., (1943). Acute Sodium Fluoride Poisoning. *JAMA*. 121 (11), 826–827. <https://doi.org/10.1001/jama.1943.02840110028011>.
- Likins, R. C., McClure, F. J., Steere, A. C. (1956). Urinary excretion of fluoride following defluoridation of a water supply. *Public Health Reports*, 71(3), 217–220. <https://doi.org/10.2307/4589402>.
- Litovitz T.L., Holm K.C., Clancy C., Schmitz B.F., Clark L.R., Oderda GM. (1993) 1992 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med.*, 11(5), 494-555. [https://doi:10.1016/0735-6757\(93\)90093-q](https://doi:10.1016/0735-6757(93)90093-q). PMID: 8103331.

- Liu, W., Sha, Y., Li, Y., Mei, L., Lin, S., Huang, X., Lu, J., Ding, L., Kong, S., & Lu, Z. (2019a). Loss-of-function mutations in SPEF2 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). *Journal of Medical Genetics*, 56(10), 678–684. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105952>.
- Liu, Y., Liang, C., Gao, Y., Jiang, S., He, Y., Han, Y., Olfati, A., Manthari, R. K., Wang, J., & Zhang, J. (2019b). Fluoride Interferes with the Sperm Fertilizing Ability via Downregulated SPAM1, ACR, and PRSS21 Expression in Rat Epididymis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), 5240–5249. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01114>.
- Livi-Bacci, M. (2001). Too few children and too much family. *Daedalus*, 130(3), 139–155.
- Lopes, M. (2012). *Comparação da cinética de libertação de flúor em pastas fluoretadas*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária.
- Lotti, F., Maggi, M., (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 287–307 <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.20>.
- Mandinic Z., Curcic M., Antonijevic B., Carevic M., Mandic J., Djukic-Cosic D., Lekic C.P. (2010). Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Sci Total Environ*, 408(17), 3507-3512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.029>.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>.
- Matamala-Santander, Andrea, Rivera-Mendoza, Fernando, & Zaror, Carlos. (2019). Impacto de la Caries en la Calidad de Vida Relacionada con la Salud Oral de Adolescentes: Revisión Sistemática y Metaanálisis. *International journal of odontostomatology*, 13 (2), 219-229. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2019000200219>.

- Matsui, H., Morimoto, M., Horimoto, K., & Nishimura, Y. (2007). Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: Cytotoxicity of sodium fluoride. *Toxicology in Vitro*, 21(6), 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.04.006>.
- Mayes, P. (1987). Glycolysis and oxidation of pyruvate. Em: Granner, DK, Mayes, PA, Murray, PK, Rodwell, WW (Eds.), *Harper's Biochemistry*, 21^a ed. Seção 2: Bioenergética e metabolismo de açúcares e lípidos. Lange Medical, San Mateo, pp. 177-184.
- McKnight C., Leverett DH, Adair SM, Shields CP (1985). Fluoride content of milk-based and soy-based infant formulas. *Journal Dental Research*64, 1075.
- Melo, P. (2001). Influência de diferentes métodos de administração de fluoretos nas variações de incidência de cárie. Porto, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Miller, C., Ten Cate, J. M. and Lasfargues, J. (2004). La reminéralisation des lésions carieuses. Le rôle essentiel des fluorures. *Realites Cliniques*, 15(3), 249-60.
- Narayana M.V., Chinoy N.J., (1994). Reversible effects of sodium fluoride ingestion on spermatozoa of the rat. *International Journal of Fertility and Menopausal Studies*, 39(6):337-346.
- Narvai, P. (2000). Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciência & Saúde Coletiva*, 5(2), 381-392. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232000000200011>.
- Neelam K., Suhasini R. V. and Sudhakar R. Y. (1987) Incidence of prevalence of infertility among married male members of endemic fluorosis district of Andhra Pradesh (Abstract). *Proceedings of a Conference of the International Society of Fluoride Research*.
- Niu, R., Sun, Z., Cheng, Z., Li, Z., & Wang, J. (2009). Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2), 254–25. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.04.012>.

- Ogaard, B. (2001). CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Research*, 35(1), 40-44. <https://doi.org/10.1159/000049109>.
- Ortega, C., Verheyen, G., Raick, D., Camus, M., Devroey, P., & Tournaye, H. (2011). Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options?. *Human reproduction update*, 17(5), 684–692. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr018>.
- Ostrom C.A. Fluoretos em odontologia (1984). In *Caries Dentárias - Bases Biológicas*, Menaker L et al ed, Guanabara-Koogan, 390-402.
- Ozsvath, D. L. (2009). Fluoride and environmental health: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8, 59–79. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9136-9>.
- Pearce, D., Cantisani, G., & Laihonen, A. (1999). Changes in fertility and family sizes in Europe. *Population Trends*, 95(95), 33–40.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2017). Principais mecanismos reguladores envolvidos na motilidade do esperma. *Jornal asiático de andrologia*, 19 (1), 5-14. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>.
- Pinto, R. (1998). Ião Fluoreto: Determinação do seu teor nas águas de abastecimento da rede pública em Portugal Continental e estudos preliminares da sua toxicidade sobre fertilidade. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Pinto, R. (2006). Papel do monóxido de azoto no aparelho reprodutor masculino: estudos em canal deferente de rato e em espermatozoides humanos. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Portela, A., Brito M. Pacheco A., Moura L., Lima M., Moura M. (2016). Conhecimento da população sobre a importância da fluoretação de águas. Centro Universitário Uninovafapi, Revista Interdisciplinar.
- Prendergast, F. G., & Veneziale, C. M. (1975). Control of fructose and citrate synthesis in guinea pig seminal vesicle epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 250(4), 1282–1289.

- Raheem A., Ralph D., (2011). Infertilidade masculina: Causas e Investigações. *Tendências em Saúde do Homem*, 2 (5): 8-11. <http://doi.org/10.1002/tre.216>.
- Ratz, P. H., & Blackmore, P. F. (1990). Differential activation of rabbit femoral arteries by aluminum fluoride and sodium fluoride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 254(2), 514–520.
- Robaire, B., Hinton, B., Orgebin-Crist, MC., (2006). O Epididimo - Fisiologia da reprodução de Knobil e Neill (terceira edição) VOLUME 1, Páginas 1071-1148.
- Robinson, W.O., & Fleischer, M. (1963). Some Problems of the Geochemistry of Fluorine. 58-75. <http://doi.org/10.3138/9781487583323-006>.
- Rompante, P. (2006). Qual o papel e o valor dos suplementos sistêmicos de flúor em medicina dentária. *Dossier de Saúde Oral*, 22, p. 349-355.
- Rowland, D. T. (1998). Cross-National Trends in Childlessness Working Papers in Demography. *Population Studies*, 73. Disponível em <https://digitalcollections.anu.edu.au/bitstream/1885/41466/4/73.pdf>.
- Santos, A. A., M. Renaud, R. A. Cabral, (2004). Relatório: Procriação medicamente assistida. Ed. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Presidência do Conselho de Ministros, 1 – 8.
- Santos, R. (2016). Remineralização do Esmalte: Revisão Bibliográfica. Instituto Universitário Egas Moniz.
- Schiffel H.H. & Binswanger U. Human urinary fluoride excretion as influenced by renal functional impairment. *Nephron* 1980; 26, 69-72. <https://doi.org/10.1159/000181954>.
- Schulz, J. A., & Lamb, A. R. (1925). The effect of fluorine as sodium fluoride on the growth and reproduction of albino rats. *Science*, 61(1569), 93–94. <https://doi.org/10.1126/science.61.1569.93>.

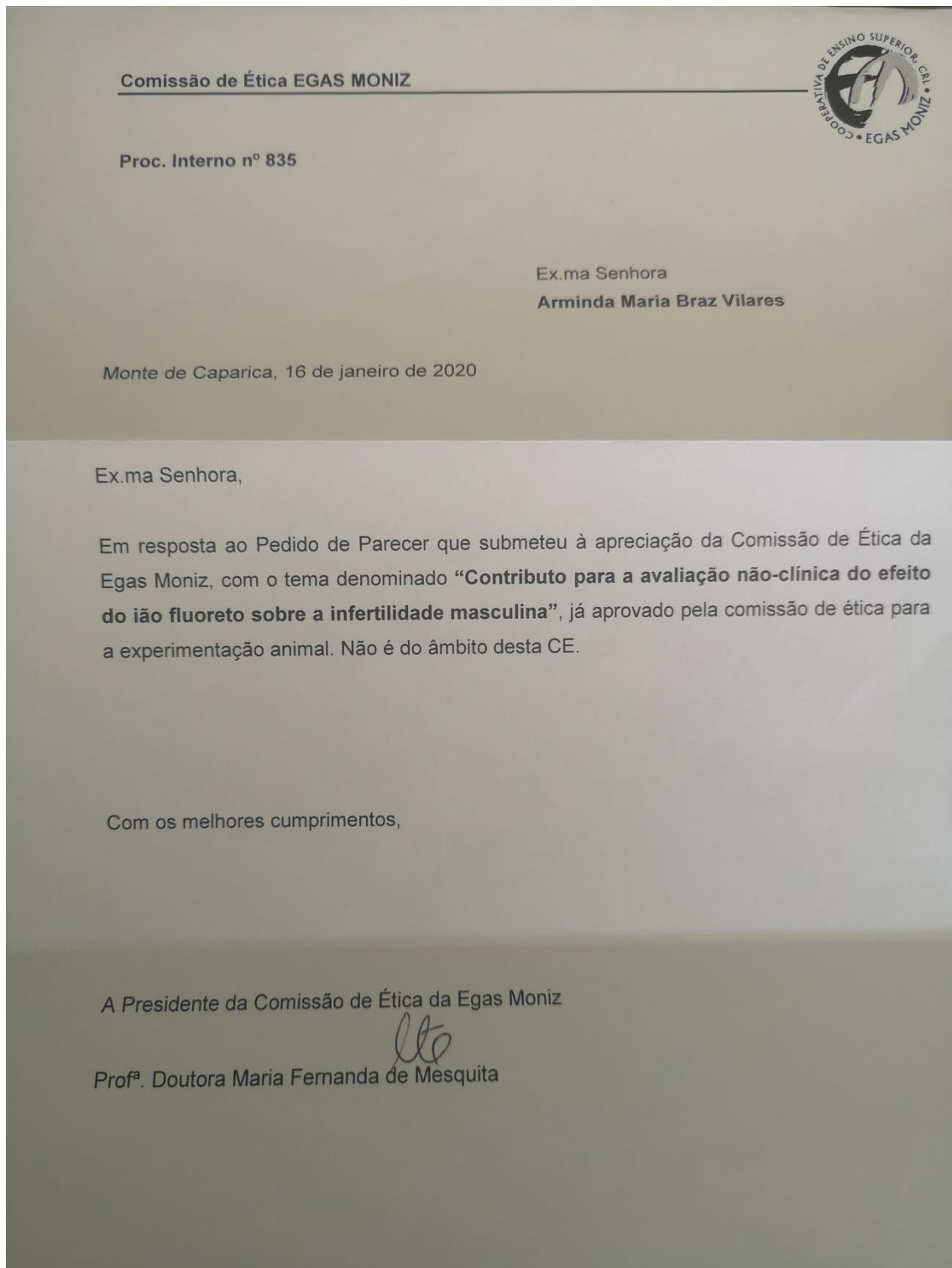
- Shen, Y. W., & Taves, D. R. (1974). Fluoride concentrations in the human placenta and maternal and cord blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 119(2), 205–207. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(74\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0002-9378(74)90035-0).
- Sidhu, S. S. (1979). Fluoride Levels in Air, Vegetation and Soil in the Vicinity of a Phosphorus Plant. *Journal of the Air Pollution Control Association*, 29(10), 1069–1072. <https://doi.org/10.1080/00022470.1979.10470899>.
- Slott, V. L., & Perreault, S. D. (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In *Male Reproductive Toxicology*, 319–333. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461207-5.50024-9>.
- Slott, V. L., Suarez, J. D., Simmons, J. E., & Perreault, S. D. (1990). Acute inhalation exposure to epichlorohydrin transiently decreases rat sperm velocity. *Toxicological Sciences*, 15(3), 597–606. <https://doi.org/10.1093/toxsci/15.3.597>.
- Smith, F.A. & Hodge, H.C. (1979) Airborne fluorides and man. Part I. *Crit. Rev. Environ Control*, 8, 293-371.
- Spak, C. J., Ekstrand, J., & Zylberstein, D. (1982). Bioavailability of fluoride added to baby formula and milk. *Caries Research*, 16(3), 249–256. <https://doi.org/10.1159/000260605>.
- Sprando, R. L., Black, T. N., Ames, M. J., Rorie, J. I., & Collins, T. F. X. (1996). Effect of intratesticular injection of sodium fluoride on spermatogenesis. *Fluoride*, 34(4), 377–338. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(96\)84542-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(96)84542-X).
- Steers, W. D. (1994). Physiology of the vas deferens. *World Journal of Urology*, 12(5), 281–285. <https://doi.org/10.1007/BF00191208>.
- Sutovsky, P., & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: Anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 1–30. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.002>.

- Tao, S., & Suttie, J. W. (1976). Evidence for a lack of an effect of dietary fluoride level on reproduction in mice. *Journal of Nutrition*, 106(8), 1115–1122. <https://doi.org/10.1093/jn/106.8.1115>.
- Ten Cate, J. M. (1999). Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand*, 57(6), 325–329. <https://doi.org/10.1080/000163599428562>.
- Trautner, K., & Einwag, J. (1989). Influence of Milk and Food on Fluoride Bioavailability from NaF and Na₂FPO₃ in Man. *Journal of Dental Research*, 68(1), 72–77. <https://doi.org/10.1177/00220345890680011201>.
- Triller, M. (1998). Fluoride, a preventive agent of caries: mechanisms, sources, risks. *Arch Pediatric*, 5(10), 1149–52. [https://doi.org/10.1016/s0929-693x\(99\)80016-5](https://doi.org/10.1016/s0929-693x(99)80016-5).
- Venkateswarlu, P. (1994). Determination of fluorine in biological materials: a review. In *Advances in dental research*. 8 (1), 80–86. <https://doi.org/10.1177/08959374940080011401>.
- Verkerk, R. (2010). The paradox of overlapping micronutrient risks and benefits obligates risk/benefit analysis. *Toxicology*, 278 (1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.011>.
- Wan, S., Zhang, J., & Wang, J. (2006). Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats. *Fluoride*, 39(1), 17–21.
- Weinstein, L. H., Davison, A. (2004). Fluorides in the environment: effects on plants and animals. In *Fluorides in the environment: effects on plants and animals*. <https://doi.org/10.1079/9780851996837.0000>.
- Westfall, T. D., & Westfall, D. P. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 45(2), 109–122. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00144-7).
- Whitford, G. M. (1981). Fluoride distribution between plasma and blood cells. *Zahn Mund Und Kieferheilkunde*, 69(8), 732.

- Whitford, G. M. (1996). The metabolism and toxicity of fluoride. *Monographs in Oral Science*, 16. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(92\)90111-o](https://doi.org/10.1016/0300-5712(92)90111-o).
- Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Reynolds, K. E. (1979). Fluoride tissue distribution: Short-term kinetics. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, 236(2), 141–148. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1979.236.2.f141>.
- Whitford, G. M., Wasdin, J. L., Schafer, T. E. and Adair, S.M. (2002). Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Research*, 36(4), 256-65. <https://doi.org/10.1159/000063931>.
- WHO. World Health Organization (2010) Semen analysis. In: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, Chap. 2, 5th edition. WHO Press, Geneva, Switzerland, pp. 7-114.
- Wisniak, J. (2002): The Dead Sea – a live pool of chemicals. *Indian J. Chemical Technol.*, 9, 79-87.
- Zakrzewska, H., & Udała, J. (2006). In vitro influence of sodium fluoride on adenosine triphosphate (ATP) content in ram semen. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 52 (3), 109–111.
- Zhao, W., & Guénard, H. (1997). The inhibitory effect of fluoride on carbachol-induced bovine bronchial contraction. *Respiration Physiology*, 108, 171–179. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(97\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(97)00018-2).

VII. ANEXOS

Anexo 1 – Documento de aprovação pela Comissão de Ética da Egas Moniz.



Anexo 2a – Documento de aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.



RECEPÇÃO Por: *mm*
Data: 31.11

Comissão de Ética para Experimentação Animal

PEDIDO de PARECER | ANEXO 1

1. Descrição sucinta da actividade:

- in vitro X ex vivo x in vivo

Contributo para a avaliação não-clínica do efeito do ião fluoreto sobre a fertilidade masculina.

Com o presente projeto pretendemos realizar os seguintes protocolos em modelos animais:

- Estudo do efeito da administração reiterada de fluoreto de sódio (NaF - 10mg/Kg/dia), durante 28 dias, na fertilidade de ratinhos Charles River.
- Estudo do efeito do ião fluoreto sobre a contractilidade do canal deferente de rato Wistar

1.1 Animais utilizados:

- Espécie: Ratinhos Charles River (CD-1 machos e fêmeas) e Rato Wistar macho
- Origem: IHMT e Charles River (Barcelona)
- Número _____ (por extenso _____)

2. Procedimento experimental:

- Stress comportamental Dermatológico Patológico Fisiológico
X Farmacodinâmico Cirúrgico Imunológico X Toxicológico
 Nutricional / Metabólico Indução Tumoral Avaliação Terapêutica
 Outro (especificar): _____

3. Principais técnicas utilizadas:

- x Remoção (tecidos / órgãos) X Administração oral X Cirúrgica
 Administração parentérica Administração pulmonar X Isolamento órgãos
 Implantes
 Outra (especificar): _____



Anexo 2b – Documento de aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

4. Duração da actividade experimental:(indicar dias ou meses)

x Meses 72 (por extenso setenta e dois meses)

Dias _____ (por extenso _____)

5. Utilização de anestesia:

Não x Sim

5.1 Se indicou SIM, especificar qual: Cetamina + Xilazina

6. Técnicas utilizadas para reduzir dor e/ou stress:

Não aplicável

7. Previsão de "end-points" humanitários:

Não x Sim

7.1 Se indicou SIM, especificar quais:

Alguns animais em estudos serão necropsiados para remoção de órgãos

8. Grau de perturbação no animal da actividade experimental:

x Reduzido Moderado Elevado

8.1 Se indicou grau de perturbação elevado, justifique:

9. Participantes envolvidos na actividade

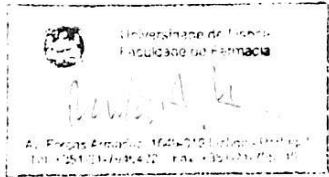
Nome completo: Vanessa Alexandra Pinho Mateus _____

BI ou CC: nº 12161753 _____

Categoria: Investigador _Categoria B da FELASA _____

Acreditação prática de experimentação animal: Não X Sim

Anexo 2c – Documento de aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Informação da CEEA:	
1. O processo encontra-se corretamente instruído?	<input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Sim
1.1. Em caso negativo, indicar as razões:	
DESPACHO	
<i>está a ser aprovado.</i>	
Data: 5/1/2015	<i>[Signature]</i> O Presidente da CEEA

Anexo 3 – Declaração da utilização das instalações da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.



DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos, declara-se que a aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária Arminda Maria Braz Vilares irá realizar a parte experimental da sua tese de conclusão de curso no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, em 3 de Janeiro de 2020

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Rui Manuel Amaro Pinto'.

(Rui Manuel Amaro Pinto – Professor Farmacologia FFUL)

Anexo 4 – Solicitação da utilização de imagens.

Article - Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens – na update



Arminda Vilares



Para: karl-erik.andersson@med.lu.se

sex, 25/09/2020 17:22

Good afternoon doctor Andersson,

This way I come to request the authorization to use the image (vas deferens) of your work from the article "Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens – na update", published in 2013, to be able to use it in my master's thesis in dental medicine with the title: "Contribution to the non-clinical evaluation of the effect of fluoride ion on male fertility".

I thank you for your work, excellent article and thank you for your availability.

The best academic greetings,

Com os melhores cumprimentos,

Maria Vilares