



ALTERAÇÕES GENÉTICAS OCASIONADAS PELA EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

Solange Soares¹

Juliana da Silva²

Melissa Rosa de Souza³

Daiana Dalberto³

Maria Perpétua Freitas de Azevedo⁴

Ana Leticia Hilario Garcia⁵

Resumo: O objetivo deste estudo foi buscar uma melhor compreensão da ação do flúor no organismo, verificando a ocorrência de danos ao DNA em indivíduos com e sem a fluorose dentária. Para avaliar o dano ao DNA foi utilizando o teste de micronúcleos em linfócitos humanos. No grupo com fluorose dentária, confirmado pelo aumento da concentração de flúor na urina, observou-se aumento da frequência de micronúcleos. Os resultados encontrados demonstram que a fluorose está relacionada com instabilidade genômica e, portanto, pode afetar a saúde destes indivíduos.

Palavras-chave: Exposição ao flúor, Danos ao DNA, Fluorose dentária, Micronúcleos.

Abstract: The aim of this study was to seek a better understanding of the action of fluoride in the body, verifying the occurrence of DNA damage in individuals with and without dental fluorosis. To assess DNA damage, the micronucleus test in human lymphocytes was used. In the group with dental fluorosis, confirmed by an increase in the concentration of fluoride in the urine, an increase in the frequency of micronuclei was observed. The results found demonstrate that fluorosis is related to genomic instability and, therefore, can affect the health of these individuals.

Keywords: Fluoride exposure; DNA damage; Dental fluorosis; Micronucleus.

Introdução

O flúor é o elemento químico de número atômico 9, representado na tabela periódica pela letra F, é o 13º elemento mais abundante na terra constituindo aproximadamente 0,3 g/kg da crosta terrestre (RAKSHIT, 2004; GHOSH et al., 2013). O flúor pertence ao grupo dos halogênios com 7 elétrons em sua camada de valência, elevada reatividade e uma forte tendência a formar compostos (NCBIa; NCBIb; MEIJA et al., 2016). Além disso, possui uma facilidade de combinar-se com metais

¹ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista CNPq/ULBRA.

² Orientadora e professora do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde – PPGBiosaúde/ULBRA

³ Doutoranda do PPGBiosaúde/ULBRA

⁴ Professora do curso de Ortodontia e do Programa de Pós-graduação em Odontologia/ULBRA

⁵ Doutoranda do PPGBiosaúde/ULBRA. E-mail: analeticiagarcia82@gmail.com.

(ligação iônica) ou não-metais (ligação covalente) formando os íons de flúor, os fluoretos (MCGRADY; ELLWOOD; PRETTY, 2010). Os fluoretos têm ampla distribuição no ambiente (WHITFORD et al., 2008) sendo encontrado em rochas, solo, água, ar, plantas e animais. São liberados no ambiente por fontes naturais como atividades vulcânicas, rochas graníticas, fluidos geotermiais e no solo. Atividades antropogênicas como queima de carvão, produção de fertilizantes de fosfato e processos industriais como a produção de óleos, alumínio e aço também contribuem para a distribuição de fluoretos no ambiente, principalmente por se depositarem nas águas subterrâneas (EDMUNDS; SMEDLEY, 1996; WHO, 2011). Fluoretos estão presentes em elevadas concentrações nos aquíferos brasileiros, sendo considerado de origem natural, pois sua presença resulta de dissoluções e alterações minerais (TERRA et al. 2016).

A exposição humana aos fluoretos dá-se principalmente através da água de beber, além de ser encontrado em todos os tipos de alimentos, em concentrações mais elevadas em ossos de peixes enlatados, além de diversos tipos de chás. O fluoreto de sódio (NaF) e o ácido fluorsilícico (H_2SiF_6) são os derivados inorgânicos mais comuns utilizados na prevenção da cárie e na fluoretação da água (MCGRADY et al., 2010). O Brasil faz uso de padrões internacionais para dispor sobre procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano estabelecendo um valor máximo permitido de 1,5 mg/L de fluoretos nas águas de abastecimento, descrito na Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011), entretanto, sem considerar os limites de variações entre as regiões. No RS, a Secretaria Estadual da Saúde, por meio da Portaria Nº 10/1999 (BRASIL, 2018), definiu em 0,8 mg/L a concentração ideal de flúor na água destinada ao consumo humano, devido a sua ação na inibição da cárie dental, e teores de 0,6 e 0,9 mg/L como limite mínimo e máximo, respectivamente. Sendo assim, a presença de fluoretos na água de beber deve ser monitorada por órgãos reguladores, uma vez que, sua ingestão excessiva pode acarretar um grave problema de saúde pública, a fluorose. Entretanto medidas corretivas que devem ser tomadas para restaurar a qualidade da água raramente acontece.

Em humanos, a absorção de fluoretos após a ingestão, ocorre por meio do trato digestivo (75–90%) e do intestino delgado. A acidez do estômago pode aumentar essa absorção, convertendo até 40% do flúor ingerido em ácido fluorídrico e posteriormente distribuído pela corrente sanguínea (EFSA, 2005; WHO, 2006). A porcentagem de fluoreto excretada na urina e nas fezes pode estar de acordo com o metabolismo, faixa etária, estilo de vida e fatores genéticos de cada indivíduo (EFSA, 2005; GHOSH et al., 2013; BUZALAF; LEITE; BUZALAF, 2015). Embora os níveis plasmáticos de flúor sejam modulados por vários fatores fisiológicos, independentemente da ingestão de flúor, eles constituem um biomarcador significativo de exposições passadas e presentes (OHMI et al., 2005).

A fluorose normalmente ocorre em tecidos duros (fluorose óssea e fluorose dentária) (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010; HARRISON, 2005). Nos ossos a fluorose pode causar deformidades e fraturas, podendo acometer recém nascidos, pois os fluoretos são capazes de atravessar a barreira hematoplacentária (NHS, 2000). Nos dentes a fluorose se caracteriza por causar

manchas desde brancas e opacas nos casos mais brandos, até acastanhadas nos casos mais severos (WHO, 2006). Fatores como baixo peso corporal, taxa de crescimento esquelético e períodos de remodelamento ósseo, além de fatores ambientais e socioeconômicos podem interferir na gravidade da doença.

Embora a fluorose dentária seja bem descrita pela literatura (PIRES, 2001), e afete milhares de pessoas pelo mundo, pouco se sabe sobre os mecanismos e as alterações sistêmicas que causam esta patologia (PERUMAL et al., 2013). O objetivo deste estudo foi buscar uma melhor compreensão acerca da ação do flúor no organismo, verificando a ocorrência de danos ao DNA em indivíduos com e sem a fluorose dentária, oriundos de cidades no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil que possuem valores de fluoreto acima do padrão permitido para consumo humano.

Materiais e Método

Estudo da população e Aspectos Éticos

Para este estudo a amostra foi composta por indivíduos de 12 a 60 anos de idade de ambos os sexos, não fumantes, sem histórico de doenças crônicas (câncer, diabetes, doença do coração, renal e cirrose) sem uso de medicamentos e não expostos a agentes genotóxicos no ambiente de trabalho. Todos os participantes da pesquisa foram orientados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e os participante com idade entre 12 a 18 anos assinaram o termo de assentimento livre e esclarecido (TALE), e seu responsável legal o TCLE. Após assinarem os termos, todos os participantes responderam ao questionário sobre variáveis de idade, sexo, dieta, uso de medicamentos, histórico médico e informações sobre tabagismo. E ainda, foi aplicado um questionário da Comissão para Proteção Contra Mutagênicos e Carcinogênicos ambientais (CARRANO; NATARAJAN, 1988). O estudo é do tipo caso-controle e foi conduzido de acordo com as recomendações propostas por Olson et al. (2002). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em seres Humanos da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA em 30 de novembro de 2018 sob o número 85230118.9.00005349.

Crítérios de diagnóstico da fluorose dentária

Para o diagnóstico da fluorose dentária, os participantes foram avaliados pelo índice de Thylstrup-Fejerskov (TF), desenvolvido considerando as alterações histológicas produzidas pelos diferentes graus de fluorose dentária, quanto maior o grau, maior a gravidade da doença. Este índice é composto por 10 categorias, com escala de 0 a 9. TF0 indicou ausência de fluorose, denominado como grupo não fluorose, TF1-TF4 manchas na superfície do esmalte, que aumentaram conforme o nível, TF5 com as superfícies do esmalte lisas e oclusais e com piora no grau TF6, e TF7, TF8 e TF9 com 25%, 50% e 100% de destruição do esmalte, respectivamente (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1978). Previamente ao início da pesquisa, dois

dentistas foram treinados por meio de exercícios de calibração e padronização com o auxílio de fotografias para minimizar a variação subjetiva dos diferentes índices utilizados neste estudo, com calibração inter e intraexaminador ($> 0,89$ Kappa). Para a iluminação foi utilizada luz natural indireta e, quando necessário, utilizado algodão seco para remoção de debris, com as devidas medidas de higiene e segurança e utilizando material previamente esterilizado. Todos os dentes permanentes presentes na boca dos indivíduos foram examinados para fluorose dentária e o índice de fluorose final foi baseado no dente mais afetado. Indivíduos com diagnóstico de grau TF0 ou TF1 foram classificados como grupo sem fluorose dentária, grupo controle, enquanto aqueles com diagnóstico de grau TF2-TF9 foram classificados como grupo com fluorose dentária. A análise dos participantes do estudo foi feita por avaliador preparado e treinado na Clínica-Escola do Curso de Odontologia da ULBRA Canoas/RS. Foram coletados 30 indivíduos sem fluorose dentária e 13 indivíduos com fluorose dentária.

Medição das concentrações de flúor na urina

Amostras de urina foram medidas no máximo 24 horas após a coleta, em triplicata. O teor de íons fluoreto nas amostras foi determinado diretamente usando um eletrodo íon seletivo (modelo DMI-FL, Digimed). Para verificar a quantidade de flúor estimada na urina, foi utilizado a razão da média de flúor, pela dosagem por cromatografia líquida de alta performance (*HPLC*) da creatinina. O resultado foi expresso em mg F/g creatinina (ZOHOURI et al. 2006).

Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN-Cyt)

Para cada participante foi coletado um total de 5 mL de sangue venoso com anticoagulante (heparina), por punção intravenosa realizada por profissional habilitado, utilizando material estéril e descartável. Aproximadamente 5 mL de amostras de urina foram obtidas de cada indivíduo. Todas as amostras foram codificadas e armazenadas a 4 °C até o processamento no laboratório de Genética Toxicológica da Ulbra/Canoas.

A partir das amostras de sangue foi realizado o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese proposto por Fenech (2007). Culturas de linfócitos foram estabelecidas com 0,5 mL de sangue total de cada indivíduo coletado. Em cada uma das culturas foram adicionados 4,5 mL de meio RPMI 1640 com 2 mM L-glutamina suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 µL/mL de antibióticos (penicilina e estreptomicina, Gibco) e 2% de fitohemaglutinina para estimular o crescimento dos linfócitos, e mantidos em uma incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Citocalasina B (Sigma, 6 µg/mL) foi adicionada às 44 h de incubação, e posteriormente os linfócitos foram colhidos por centrifugação. Foram preparadas duas lâminas por indivíduo e coradas com panótico (Instant-Prov). Para a análise, 1.000 células binucleadas foram pontuadas quanto à presença de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPB) e brotos nucleares (NBUD) em microscópio de luz

(aumento de 1000 ×). Para a frequência de células necróticas (NECR) e apoptóticas (APOP), 500 células foram pontuadas aleatoriamente (FENECH, 2007).

Análise estatística

Primeiro, um teste de normalidade foi realizado usando o teste de Kolmogorov - Smirnov. A análise das diferenças nos biomarcadores foi realizada com o teste U de Mann-Whitney e teste t, para comparar diferenças entre cada grupo. As análises foram realizadas usando o pacote estatístico *GraphPad Prism* Programa 5.0, e valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. Os dados foram transformados em log antes de realizar as análises.

Resultados e Discussão

A fluorose é uma anomalia do desenvolvimento, no entanto, seus efeitos adversos são conhecidos quando a ingestão prolongada de flúor atinge níveis de toxicidade crônica ou aguda, quando a fluorose dentária e óssea se desenvolvem. A fluorose dentária pode ocorrer durante o período de formação do dente e maturação do esmalte, caracterizado pelo aumento da porosidade do esmalte, tornando-o opaco (WEI; PANG; SUN, 2019), afetando principalmente crianças durante o período de desenvolvimento dentário (WHO, 2006). Estudos revelam que o consumo de flúor tem potencial para interferir por meio de mecanismos moleculares e genéticos em diferentes órgãos e tecidos do corpo, modulando vias de sinalização e apoptose (SALGADO-BUSTAMANTE et al., 2010, PERUMAL et al., 2013, WEI; PANG; SUN, 2019).

As principais características da população deste estudo são mostradas na Tabela 1. Os indivíduos selecionados para o estudo são oriundos da cidade de Santa Cruz (RS). Foram avaliados 43 indivíduos, onde o grupo sem fluorose dentária consistiu em 30 indivíduos com a média de idade de $22,9 \pm 7,6$ anos (variação, 15-50 anos) e o grupo com fluorose dentária, em 13 indivíduos com a média de idade de $28,5 \pm 4,7$ anos (19-38 anos). Em relação ao gênero, ambos os sexos foram avaliados, tanto sem como com fluorose dentária. Rigo et al. (2010) não verificou associação de fluorose com as variáveis sexo e etnia. Além disso, 100% do grupo sem fluorose e 46% do grupo com fluorose consomem álcool regularmente, e ambos os grupos de estudo praticam exercícios físicos regularmente (54,54% e 38,46%, respectivamente).

Tabela 1. Principais características da população amostrada, sem fluorose e com fluorose dentária.

Características da população	Sem fluorose	Fluorose
Número de indivíduos	30	13
Idade (média \pm DP ^a)	22,9 \pm 7,6	28,5 \pm 4,7
Gênero		
- Masculino	30%	15%
- Feminino	70%	85%
Consumo de álcool		
- Sim	100%	46%
- Não	-	54%
Exercício físico		
- Sim	55%	38%
- Não	45%	62%

Legenda: ^aDP, desvio padrão

As concentrações de flúor medidas na urina dos indivíduos deste estudo podem ser observadas na Figura 1. Os níveis médios de flúor urinário foram $0,53 \pm 0,34$ mg/g creatinina e $0,94 \pm 0,74$ mg/g creatinina, no grupo sem fluorose e no grupo com fluorose, respectivamente. Nesta análise, podemos verificar que os indivíduos que possuem o diagnóstico de fluorose também possuem uma quantidade significativamente aumentada em relação ao grupo sem o diagnóstico da doença (Teste t não pareado $P < 0,05$).

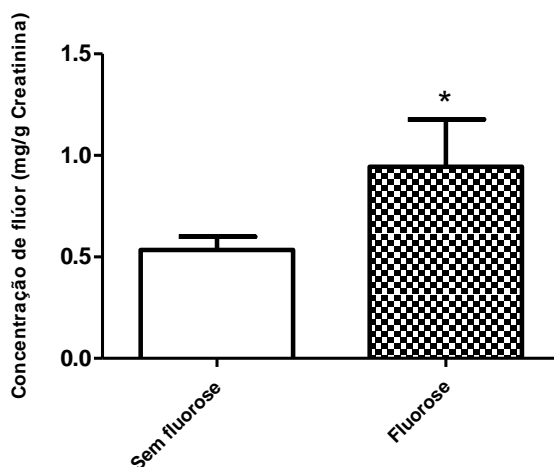


Figura 1. Concentração de flúor na urina, grupo sem fluorose e grupo com fluorose. *Aumento significativo em relação ao grupo sem fluorose $P < 0,05$; teste t não pareado. Dados foram transformados em $Y = \text{Log}(Y)$.

Na Figura 2 pode-se observar uma representação de dentes com alteração no esmalte dentário representando as diferentes formas da fluorose dentária. Os casos leves de fluorose representam aparência esbranquiçada e opaca do esmalte. Nos moderados observa-se coloração amarela a marrom-clara nas áreas danificadas do esmalte, e nos casos graves o esmalte é poroso, pouco mineralizado e manchado de marrom (DEBESTEN; LI, 2011).



Figura 2. Representação de dentes com variações no aspecto do esmalte. a-leve com ligeira acentuação dos perikymata. b- moderado, apresentando uma aparência opaca branca. c-moderado, esmalte branco opaco com alguma descoloração e corrosão. d-grave.

Fonte: DeBesten; Li (2011).

Este aumento encontrado no grupo com fluorose, demonstra que os indivíduos com esta característica estão diariamente expostos a maiores concentrações de flúor do que os indivíduos do grupo sem fluorose. Estas exposições podem ser oriundas do uso excessivo de produtos de dentífricos com flúor, consumo de alimentos, bebidas e chás que contêm flúor e principalmente as fontes de água de consumo desta população (LOBO; COSTA, 1998; LOBO; COSTA; KIRST, 2000).

A ocorrência de fluorose dentária, associada ao consumo de água subterrânea com concentração excessiva de flúor, já foi comprovada em diferentes países, e no Brasil essa realidade não é diferente (LOBO; COSTA, 1998; LOBO; COSTA; KIRST, 2000). Os principais aquíferos brasileiros têm apresentado elevadas concentrações de flúor nas águas subterrâneas, detectados através de poços de abastecimento público e de uso privado (NANNI et al., 2008; HYPOLITO; EZAK; PÉREZ-AGUILAR, 2010; MARIMON et al., 2013; GOFFERMANN; VIERO; SILVA, 2015; EZAKI et al., 2016). Por exemplo, nos Vales do Rio Pardo e Rio Taquari (RS), estudos desenvolvidos em 500 poços tubulares profundos identificaram dezenas de sistemas de abastecimento utilizando água com concentração excessiva de flúor (LOBO; COSTA, 1998; LOBO; COSTA; KIRST, 2000), fato que contribui para elevada incidência da fluorose dentária em crianças devido ao consumo prolongado de água com excesso de flúor (WHO, 2006). Segundo Terra et al. (2016), ao analisarem a qualidade da água subterrânea em uma região do RS, observaram quantidades de flúor que ultrapassaram o limite estabelecido pela legislação com valores de até 4,7 mg/L nas amostras coletadas em água de poços artesianos para consumo humano.

Além das águas subterrâneas contaminadas pelo excesso de flúor, a água utilizada para consumo humano, distribuída pelas empresas de abastecimento também precisam ser controladas rotineiramente. De acordo com Krützmann et al. (2020), os valores de flúor foram superiores a 1,4 mg/L em amostras de água coletadas em um

hospital e uma escola do RS. Sempre que valor de fluoretos na água destinada ao consumo humano excede o máximo de limite estabelecido, medidas corretivas devem ser aplicadas para restaurar a qualidade da água. Mas isso geralmente não é realizado.

Na Tabela 2 é possível visualizar os valores dos biomarcadores do ensaio CBMN-Cyt para os dois grupos. Neste estudo, pode-se comprovar que o grupo com o diagnóstico de fluorose possui um aumento significativo na frequência de micronúcleos em linfócitos isolados ($4,61 \pm 3,97$) comparado ao grupo sem fluorose ($2,20 \pm 2,63$). No entanto, não foi possível observar aumento significativo nas demais anormalidades nucleares (teste U de Mann-Whitney, $P < 0,001$).

Tabela 2. Biomarcadores do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN-Cyt) em indivíduos sem fluorose e com fluorose.

BIOMARCADORES	Sem fluorose (n = 30)	Fluorose (n = 13)	P
Danos ao DNA			
MN	$2,20 \pm 2,63$	$4,61 \pm 3,97$	0,0003*
NPB	$1,03 \pm 0,85$	$0,77 \pm 1,01$	0,6436
NBUD	$5,33 \pm 4,19$	$6,38 \pm 4,46$	0,1805
Morte celular			
APOP	$1,10 \pm 1,06$	$0,46 \pm 0,78$	0,6913
NECR	$0,50 \pm 0,82$	$0,08 \pm 0,28$	0,9334
Proliferação celular			
NDI	$1,73 \pm 0,16$	$1,77 \pm 0,18$	0,5170

Legenda: MN, micronúcleos; NPB, pontes nucleoplasmáticas; NBUD, broto nuclear; APOP, células apoptóticas; NECR, células necróticas; NDI, índice de divisão nuclear. Os dados são expressos como média \pm e desvio padrão. * Diferença significativa em relação ao grupo sem fluorose; Teste U de Mann-Whitney $P < 0,001$. Dados foram transformados em $Y = \text{Log}(Y)$.

O ensaio CBMN-Cyt é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar danos genéticos não reparáveis em humanos, e a formação de micronúcleos, demonstrando instabilidade cromossômica (FENECH; e BONASSI, 2011). MNs são o resultado da ruptura cromossômica causada por danos ao DNA, perda de cromossomos segregação devido a erros mitóticos, estresse oxidativo e mudanças no ciclo celular, podendo levar a mutações cromossômicas e aberrações (FENECH, 2007). Estudos têm mostrado que o flúor pode modular a atividade da maioria dos estágios de reparo por excisão de bases (BER) (SHIVARAJASHANKARA; SHIVASHANKARA; GOPALAKRISHNA, 2001, NGOC et al., 2012, SUZUKI; BANDOSKI; BARTLETT, 2015, ZHOU et al., 2015).

O uso desses biomarcadores está associado com instabilidade genômica e o risco preditivo de várias doenças crônicas causadas pela exposição a contaminantes ambientais (COLLINS; DUTHIE; DOBSON, 1993; SHARMA; BHONDE, 2015). Os mesmos resultados encontrados neste estudo, também foram observados por Wu e Wu (1995), em habitantes da Mongólia que bebem água com teor elevado de fluoreto, indicando que a presença de flúor na água de beber pode estar causando um efeito mutagênico em linfócitos do sangue periférico. Além disto, Garcia et al. (2020) utilizando células-tronco mesenquimais, em concentrações similares a encontradas no plasma humano, verificaram que a exposição ao ácido fluorsilícico (fluoreto usado na água potável nas cidades do RS), tem o potencial de causar efeito genotóxico (aumento de MNs), relação do flúor com o dano oxidativo do DNA em purinas e estresse oxidativo em lipídeos. Além de promover o aumento do teor de cálcio em concentrações consideradas seguras para consumo, o que pode estar relacionado à fluorose e ao câncer ósseo relatados na literatura (KHARB; SANDHU; KUNDU, 2012; RAMESH et al., 2001).

Conclusão

Neste estudo, foi observado nos indivíduos diagnosticados com fluorose dentária um aumento na concentração de flúor na urina e aumento da frequência de micronúcleos pelo teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese em linfócitos. Os dados obtidos sugerem que há efeitos mutagênicos em indivíduos acometidos por fluorose dentária, em comparação com o grupo controle (sem fluorose).

Os resultados demonstram a necessidade de continuar o monitoramento das populações que possuem incidência da fluorose dentária para melhor compreender o potencial de dano mutagênico e seus mecanismos. E além disso, de que forma a instabilidade genômica poderia estar afetando a saúde destes indivíduos.

Referências

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L., DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chem Biol Interact.** v.188, n.2, p.319-33, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual para remoção do excesso de flúor em águas naturais/Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; Universidade de Santa Cruz do Sul – Santa Cruz do Sul: UNISC, 2018.

BUZALAF, C.P.; LEITE, A.L.; BUZALAF, M. A. R. Fluoride metabolism, *In*: V.R. Preedy (Ed.), **Fluorine: Chemistry, Analysis, Function and Effects**. The Royal

Society of Chemistry. London. p. 54–72, 2015.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat Res.** v.204, p.379-406, 1988.

COLLINS, A.; DUTHIE, S.; DOBSON, V. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. **Carcinogenesis.** v.14, n.9, p.1733–1735,1993.

DEBESTEN, P.; LI, W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. Department of Orofacial Sciences, School of Dentistry. **Monogr Oral Sci.**v.22, p.81–96,2011.

EDMUNDS, W. M.; SMEDLEY, P. L. Groundwater geochemistry and health: an overview. **Geological Society London.** Special Publications. v.113, n.1, p.91-105,1996.

EFSA, Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of fluoride (Request No EFSAQ-2003-018), **EFSA J.** v.192, p.1–65, 2005.

EZAKI, S.; PÉREZ-AGUILAR, A.; HYPÓLITO, R.; SHINZATO, M.C. Anomalias de flúor nas águas subterrâneas do estado de São Paulo. **Rev Instit Geo.** v.37, p.65-98, 2016.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc.**v.2, p.1084-104, 2007.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis.**v.26, n.1, p.43–49, 2011.

GARCIA, A. L. H.; PICININI, J.; SILVEIRA, M. D.; CAMASSOLA, M.; VISENTIM, A. P. V.; SALVADOR, M. M.; SILVA, J. Fluorosilicic acid induces DNA damage and oxidative stress in bone marrow mesenchymal stem cells. **Mutat Res - Gen Toxicol Environ Mutagenesis.**v.503, n.297, p.861–862, 2020.

GHOSH, A.; MUKHERJEE, K.; GHOSH, S. K.; SAHA, B. Sources and toxicity of fluoride in the environment. **Res Chem Intermed.** v.39, p.2881-2915, 2013.

GOFFERMANN, M.; VIERO, A. P.; SILVA, E.B. Caracterização hidrogeológica e hidroquímica das águas subterrâneas da região de São Gabriel, RS. **Pes Geo.** v.42, n.3, p.239-61, 2015.

HARRISON, P. T. Fluoride in water: a UK perspective. **J Fluor Chem.**v.126, p.1448-

1456, 2005.

HYPOLITO, R.; EZAKI, S.; PÉREZ-AGUILAR, A. Fluoreto nas águas subterrâneas dos aquíferos Tubarão e Cristalino, região de Salto-Indaiatuba (SP). **Rev Escol Minas**.v.63, n.4, p.715-726, 2010.

KHARB, S.; SANDHU, R.; KUNDU, Z. S. Fluoride levels and osteosarcoma. **South Asian J. Cancer**. v.1, n2, p.76–77, 2012.

KRÜTZMANN, M. W.; MACHADO, A. B.; CONSTANTE, M. S.; RIGO, K. A.; PERASSOLO, M. S.; OSORIO, D. M. M.; BERLESE, D. B. Evaluation of the effects of fluoride and associated with lead in animal model and physical-chemical analysis of public supply water and of the Sinos river in the south of Brazil. **International Journal for Innovation Education and Research**. v.8, n.4, p.295–322, 2020.

LOBO, E. A.; COSTA, A. B.; KIRST, A. **Qualidade das águas subterrâneas, em relação à concentração de íons fluoretos, na região dos Vales do Rio Pardo e Rio Taquari, RS, Brasil.** In: **CONGRESSO MUNDIAL DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS**, nº 1, 2000, Fortaleza. Anais. Fortaleza: ABAS. 2000.

LOBO, E. A.; COSTA, A.B. Análise descritiva da concentração de íons fluoreto em poços artesianos da região do Vale do Rio Pardo e Rio Taquari, RS, Brasil. **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul. v.2, n.2, p. 29-35, 1998.

MARIMON, M. P. C.; ROISENBERG, A.; SUHOGUSOFF, A. V.; VIERO, A. P. Hydrogeochemistry and statistical analysis applied to understand fluoride provenance in the Guarani Aquifer System, Southern Brazil. **Environ Geo and Health**. v.35, p. 391-403, 2013.

MCGRADY, M. G.; ELLWOOD, R. P.; PRETTY, I.A. Why fluoride? **Dent Update**. v.37, n.9, p.595-598, 601-602, 2010.

MEIJA, J.; COPLEN, T. B.; BERGLUND, M.; BRAND, W. A.; DE BIÈVRE, P.; GRÖNING, M.; HOLDEN, N. E.; IRRGEHER, J.; LOSS, R. D.; WALCZYK, T.; PROHASKA, T. Atomic weights of the elements (IUPAC Technical Report) 2013. **Pure Appl Chem**. v.88, n.3., p.265-91, 2016.

NANNI, A. S.; ROISENBERG, A.; FACHEL, J. M. G.; MESQUITA, G.; DANIELI, C. Fluoride characterization by principal component analysis in the hydrochemical facies of Serra Geral Aquifer System in Southern Brazil. **An Acad Bras Ciênc**. v.80, n.4, p. 693-701, 2008.

NCBIa - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=24524, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24524>.

NCBIb - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=28179, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/28179>.

NGOC, T. D. N.; SON, Y. O.; LIM, S. S.; SHI, X.; KIM, J. G.; HEO, J. S.; CHOE, Y.; JEON, Y. M.; LEE, J. C. Sodium fluoride induces apoptosis in mouse embryonic stem cells through ROS-dependent and caspase and JNK-mediated pathways. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.259, n.3, p. 329–337, 2012.

NHS, C. R. D. A Sistematic Review of Public Water Fluoridation. CRD Report n 18, NHS Center for Review and Dissemination, University of York, York, UK. Disponível em: <http://www.york.ac.uk/inst/crd/fluorid.htm>. 2000.

OHMI, K.; NAKAGAKI, H.; TSUBOI, S.; OKUMURA, A.; SUGIYAMA, T.; THUY, T.T.; ROBINSON, C. The effect of fluoridation and its discontinuation on fluoride profiles in the alveolar bone of rat. **Calcif. Tissue Int.** v.77, n.4, p. 226–232, 2005.

OLSON, S. H.; VOIGT, L. F.; BEGG, C. B.; WEISS, N. S. Reporting participation in case-control studies. **Epidemiol.** v.13, n.2, p. 123-126, 2002.

PERUMAL, E.; PAUL, V.; GOVINDARAJAN, V.; PANNEERSELVAM, L. A brief review on experimental fluorosis. **Toxicol Lett.** v.223, n.2, p. 236-251, 2013.

PIRES, M. B. O. Fluorose dentária endêmica: revisão da literatura. **Unimontes Científica.** v.2, n.2, p.1-15, 2001.

RAKSHIT, P. K. **Studies on estimation of fluoride and defluoridation of drinking water: A Project Report.** MEng Thesis, IISc., Bangalore, 2004.

RAMESH, N.; VUAYARAGHAVAN, A. S.; DESAI, B. S.; NATARAJAN, M.; MURTHY, P. B.; PILLAI, K. S. Low levels of p53 mutations in Indian patients with osteosarcoma and the correlation with fluoride levels in bone. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** v.20, n.3, p. 237–243, 2001.

RIGO, L.; JUNIOR, A. F. C.; SOUZA, E. A.; ABEGG, C.; LODI, L. Estudo sobre a fluorose dentária num município do sul do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva.** v.15, Supl. 1, p.1439-1448, 2010.

SALGADO-BUSTAMANTE, M.; ORTIZ-PEREZ, M. D.; CALDERON-ARANDA, E.; CAPETILLO, L. E.; NINO-MORENO, P.; GONZALEZ-AMARO, R. D.; PORTALES-PEREZ, D. Pattern of expression of apoptosis and inflammatory genes in humans exposed to arsenic and/ or fluoride. **Sci Total Environ.** v.408, n.4, p.760–767, 2010.

SHARMA, S.; BHONDE, R. Influence of nuclear blebs and micronuclei status on the

growth kinetics of human mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol.** v.230, n.3, p. 657–666, 2015.

SHIVARAJASHANKARA, Y. M.; SHIVASHANKARA, A. R.; GOPALAKRISHNA, B. P, RAO, S. H. Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. **Fluoride** v.34, n.2, p. 108–113, 2001.

SUZUKI, M.; BANDOSKI, C.; BARTLETT, J. D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. **Free Radic Biol Med.** v.89, p. 369–378, 2015.

TERRA, L. G.; BORBA, W. F.; FERNANDO, G. D.; TROMBETA, H. W.; SILVA, J. L. S. Caracterização hidroquímica e vulnerabilidade natural à contaminação das águas subterrâneas no município de Ametista do Sul-RS. **Rev Monogr Ambient. REMOA.** v.15, n.1, p. 94–104, 2016.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. **Community Dentistry and Oral Epidemiology.** v.6, n.6, p. 315–328, 1978.

WEI, W.; PANG, S.; SUN, D. The pathogenesis of endemic fluorosis: research progress in the last 5 years. **J Cell Mol Med.** v.23, n.4, p. 2333–2342, 2019.

WHITFORD, G. M.; SAMPAIO, F. C.; PINTO, C. S.; MARIA, A. G.; CARDOSO, V. E.; BUZALAF, M. A. Pharmacokinetics of ingested fluoride: lack of effect of chemical compound. **Arch Oral Biol.** v.53, n.11, p. 1037-41, 2008.

WHO – World Health Organization. **Fluoride in drinking-water.** Geneva. Disponível em:
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/fluoride_drinking_water/en/2006.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**, fourth edition. Geneva. Disponível em:
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_chapters/en/2011.

WU, D. Q.; WU, Y. Micronucleus and sister chromatid exchange frequency in endemic fluorosis. **Fluoride.** v.28, p. 125-127, 1995.

ZHOU, B.; ZHAO, J.; LIU, J.; ZHANG, J.; LI, J.; WANG, H. Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. **Chemosphere.** v.139, p. 504-511, 2015.

ZOHOURI, F. V.; SWINBANK, C. M.; MAGUIRE, A.; MOYNIHAN, P. J. Is the fluoride/creatinine ratio of a spot urine sample indicative of 24-h urinary fluoride? **Community Dent Oral Epidemiol.** v.34, n.2, p.130-138, 2006