UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO

*Suscetibilidade genética para fluorose dentária:
um estudo metabólico e proteômico com diferentes
linhagens de camundongos*

BAURU
2009

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO

**Suscetibilidade genética para fluorose dentária:
um estudo metabólico e proteômico com diferentes
linhagens de camundongos**

**BAURU
2009**

JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO

**Suscetibilidade genética para fluorose dentária:
um estudo metabólico e proteômico com diferentes
linhagens de camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de doutor
em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral
Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

BAURU

2009

Carvalho, Juliane Guimarães de

C253s Suscetibilidade genética para fluorose dentária: um estudo metabólico e proteômico com diferentes linhagens de camundongos / Juliane Guimarães de Carvalho. – Bauru, 2009.

178 p. : il. ; 30 cm.

Tese. (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo N°26/2007

Data: 12/3/2008

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Geraldo e Doroty,
pelo amor incondicional*

*Aos meus irmãos, Pedro, Olívia, Marcelo,
Luciano, Fernanda e Fabiano*

*pelo carinho e pelas palavras de incentivo nos
momentos difíceis*

*Agradeço a Deus por ter me concedido a
oportunidade de conviver com vocês!*

“De todos os institutos sociais existentes na Terra, a família é o mais importante, do ponto de vista dos alicerces morais que regem a vida”.

Emmanuel

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a Dra Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Pela confiança em compartilhar um sonho, pelo empenho em tornar esse sonho realidade, pela amizade que faz com que o caminho seja mais fácil apesar das dificuldades, pelo otimismo que contagia e nos motiva a acreditar e continuar.

Ao Prof. Dr Gary Milton Whitford

Pelo carinho, paciência e humildade ao ensinar. E pelos valiosos ensinamentos compartilhados.

À Aline de Lima Leite

Pela amizade, ajuda e companhia por dias e noites que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FOB-USP.

À Fapesp pela ajuda financeira.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, por nos receber muito bem em seu laboratório e por sua disponibilidade em ajudar.

A todos os alunos e funcionários do laboratório Max Feffer, principalmente aos alunos, Alexander, Matheus e Fernanda por ajudar e esclarecer muitas dúvidas sobre análise proteômica.

À Aarti Arun, técnica do laboratório de Biologia Oral do Medical College of Georgia (Augusta GA) pelas análises de fluoreto e pela amizade.

À Analia Loria, que me recebeu em sua casa com muito carinho, pela amizade que construímos e pelo companheirismo durante todo o período em que estive em Augusta (GA).

À amiga Jaqueline Polo e toda sua família, pela amizade verdadeira em todas as horas.

À amiga Aline Carvalho Batista pelo incentivo e pela amizade sincera que mesmo distante contribuiu sobremaneira para a realização deste trabalho.

À amiga Flávia Levy, pelo companheirismo e amizade.

À amiga Valéria Motio por nossas horas de “terapia” que me ajudou muito a esquecer os problemas do laboratório. Pela amizade e companhia.

Ao amigo Juliano Pessan pela amizade, carinho, ajuda nunca negada e pelos valiosos momentos de diversão que você nos proporciona durante os intervalos de trabalho no laboratório.

Ao Prof Dr Rodrigo Cardoso de Oliveira pela disponibilidade em ajudar, pela contribuição no exame de qualificação e pela amizade.

À Claudia Kobayashi por ter iniciado as análises proteômicas no laboratório e com isso facilitado o caminho para nós que começamos depois. Pela amizade e ajuda.

Ao amigo Maurício Figueiredo pela ajuda com a utilização do *software*, pelo incentivo e pelos bons momentos.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica que compartilharam os bons e difíceis momentos durante esses anos de trabalho: Juliano, Flávia, Aline, Camila, Flavinha, Mileni, Claudinha, Thiemi, Angélica, Flávia Iano, Helô, Cláudia, Thaísa, Bruno, Marcela e Mel. Obrigada a todos!

Aos colegas de doutorado Tatiana, Fabiano, Thaís e Sílvia.

Aos funcionários do laboratório, Thelma, Ovídio e Larissa pelo apoio e amizade.

À Vera Lúcia Rufino por sua disponibilidade em sempre ajudar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*"Tudo é loucura ou sonho no começo.
Nada do que o homem fez no mundo
teve início de outra maneira, mas já
tantos sonhos se realizaram que não
temos o direito de duvidar de
nenhum."*

(Monteiro Lobato)

RESUMO

A fluorose dentária é uma patologia que ocorre durante a formação dos dentes na presença de doses excessivas de fluoreto (F^-). Os mecanismos pelos quais o F^- provoca a fluorose ainda são poucos conhecidos. A influência de fatores genéticos tem sido considerada na suscetibilidade/resistência do indivíduo em desenvolver a fluorose. Duas linhagens de camundongos (A/J e 129P3/J) com diferença na resistência ou suscetibilidade à fluorose dentária foram utilizadas para determinar se a suscetibilidade à fluorose pode ser explicada pela diferença no metabolismo e se há diferença no perfil protéico dos rins e urina destes animais. Para isso, um estudo metabólico foi conduzido com 18 camundongos A/J (susceptível) e 18 129P3 / J (resistente) após o desmame. Cada amostra foi dividida em 3 grupos, com diferentes concentrações de F^- na água de beber (0, 10 e 50 ppm F). Uma vez que um estudo piloto revelou que os camundongos A/J ingeriam um maior volume de água quando comparado com o 129P3/J, a concentração de F^- na água dada aos camundongos A/J foi ajustada semanalmente a fim de fornecer doses semelhantes de F^- para ambas linhagens. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas (n = 2/gaiola) por 7 semanas, com livre acesso à água e dieta de baixa ingestão de F^- (0,95 ppm). A ingestão e excreção de F^- foram calculadas, bem como os níveis de F^- no plasma, no fêmur e no rim. O grau de fluorose dentária foi avaliado usando análise de fluorescência quantitativa (QLF) e exame clínico. Os perfis proteômicos renal e urinário foram examinados utilizando 2D-PAGE e coloração com azul de Coomassie.. Os dados do estudo metabólico foram testados para diferenças significativas pela ANOVA a 2 critérios (p <0,05). As imagens dos géis e as diferenças estatísticas (ANOVA, p<0,05) foram analisadas pelo programa *Image Master Platinum 7.0*. Os camundongos da linhagem A/J submetidos à alta concentração de fluoreto apresentaram um grau de fluorose significativamente maior quando comparado com a linhagem 129P3/J. A ingestão total de F^- não diferiu significativamente entre as linhagens. A excreção total de F^- foi significativamente maior para os camundongos A/J, devido à maior excreção urinária de F^- . As duas linhagens não diferiram em relação à absorção F^- , mas os animais 129P3/J retiveram significativamente maiores quantidades de F^- , que foi consistente com níveis mais elevados de F^- no fêmur, no entanto, os níveis de F^- no plasma não

diferiram significativamente entre as linhagens. Para os rins, a análise quantitativa de intensidade detectou, entre as linhagens A/J e 129P3/J, 122, 126 e 134 *spots* diferencialmente expressos nos grupos controle, e que receberam baixa e alta concentração de F⁻, respectivamente. Para a urina, 84 *spots* diferencialmente expressos foram observados para o grupo controle, 68 para o grupo que recebeu baixa concentração de F⁻ e 66 para o grupo que recebeu alta concentração de F⁻. Os dados mostraram que há diferenças metabólicas e no perfil de expressão protéica renal e urinária intrínsecas a estas linhagens e que a exposição ao F⁻ é capaz de alterar estes padrões.

Palavra-chave: Fluorose dentária. Metabolismo. Fluoreto. Suscetibilidade genética. Proteoma.

ABSTRACT

Genetic susceptibility for dental fluorosis: a metabolic and proteomic study with different strains of mice

Dental fluorosis occurs during tooth formation when excessive doses of fluoride (F) are ingested. The mechanisms that underlie the pathogenesis of dental fluorosis are not known so far. The influence of genetic factors has been considered in individual susceptibility/resistance to develop fluorosis. Two inbred mice strains (A/J and 129P3/J) have been reported to have different susceptibilities to dental fluorosis. They were used in the present study to determine if the susceptibility to dental fluorosis can be explained by alterations in F metabolism and to evaluate if there is difference in the profile of protein expression in kidney and urine of these animals. For this, a metabolic study was conducted with 18 A/J (susceptible) and 18 129P3/J (resistant) weanling mice. Each strain was divided into 3 groups, with differed according to the F concentration given in the drinking water (0, 10 and 50 ppm F). Since a pilot study showed that the A/J mice drank a higher volume of water when compared with the 129P3/J, the F concentration in the water given to the A/J mice was weekly adjusted in order to provide similar F intakes for both strains. The mice were housed in metabolic cages (n=2/cage) for 7 weeks, with free access to water and low-F diet (0.95 ppm). F intake and excretion were calculated, as well as plasma, femur and kidney F levels. The degree of dental fluorosis was assessed using QLF and clinical examination. Renal and urinary proteome profiles were examined using 2D-PAGE and coomassie brilliant blue staining. Data were tested for significant differences by 2-way repeated-measures ANOVA ($p < 0.05$). The gels images and statistical differences (ANOVA, $p < 0.05$) were analyzed by the Image Master Platinum 7.0 software. Significantly higher QLF scores were observed for the A/J mice submitted to 50 ppm F. The total F intake did not significantly differ between the strains. The total F excretion was significantly higher for the A/J mice, due to the higher urinary F excretion. The two strains did not differ in respect to F absorption, but the 129P3/J mice retained significantly higher amounts of F, which was consistent with their higher femur F levels. Plasma F levels, however, did not significantly differ between the strains. For kidney, quantitative intensity analysis

detected, between strains A/J and 129P3/J, 122, 126 e 134 spots differentially expressed in the control group, in the group receiving low and high F concentrations, respectively. For urine, 84 spots differentially expressed were detected for control group, 68 for the group receiving low F concentration and 66 for the group receiving high F concentration. Data showed that intrinsic differences occur in the metabolism of F and profile of protein expression between these strains and that these profiles can be altered in the presence of F.

Keywords: Dental fluorosis. Fluoride. Metabolism. Genetic susceptibility. Proteome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI (primeira dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida onde são separadas de acordo com o PM (segunda dimensão).....	46
Figura 2 -	Gaiolas metabólicas utilizadas para a coleta de fezes e urina, bem como controle do consumo de ração e água.....	55
Figura 3 -	Placa de Petri vaselinada. Adição das amostras de fezes.....	64
Figura 4 -	Adição de 2 mL de água deionizada e 50 µL de NaOH 0,05 M na tampa da placa de Petri.....	64
Figura 5 -	Fechamento das placas e adição de 2 mL de HMDS.....	64
Figura 6 -	Eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo calomelano de referência para leitura de F ⁻	64
Figura 7 -	Homogeneização do tecido renal em N ₂ para posterior extração das proteínas.....	67
Figura 8 -	Focalização isoeletrica no Ettan IPGphor 3 e o <i>Ettan IPGphor Cup Loading Manifold</i> (GE Healthcare).....	70
Figura 9 -	Segunda dimensão no sistema <i>Ettan DALTsix</i> (GE-Healthcare).....	71
Figura 10 -	Excisão e recorte dos <i>spots</i> selecionados para espectrometria de massa.....	73
Figura 11 -	Peso dos rins (g) dos animais das linhagens A/J e 129P3/J em função da [F ⁻] na água de beber. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre as linhagens. (ANOVA a dois critérios, p<0,05).....	77
Figura 12 -	Peso corporal (g) dos animais das linhagens A/J e 129P3/J em função da [F ⁻] na água de beber. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre as linhagens. (ANOVA a dois critérios, p<0,05).....	78
Figura 13 -	Média do peso corporal durante 7 semanas da linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, p<0,05). As barras indicam o erro padrão.....	79

Figura 14 -	Média do peso corporal durante 7 semanas da linhagem 129P3/J. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	79
Figura 15 -	Média da quantidade de água ingerida (g) em 48 h durante as 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas para cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam erro padrão.....	82
Figura 16 -	Média da quantidade de água ingerida (g) em 48 h durante as 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas para cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam erro padrão.....	82
Figura 17 -	Média de ingestão de F^- pela água durante 7 semanas pela linhagem A/J. Não houve diferenças significativas entre as semanas (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	85
Figura 18 -	Média de ingestão de F^- pela água durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	85
Figura 19 -	Média de ingestão de F^- pela dieta durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	87
Figura 20 -	Média de ingestão de F^- pela dieta durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	87
Figura 21 -	Média de ingestão total de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	89
Figura 22 -	Média de ingestão total de F^- durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	89
Figura 23 -	Média da excreção de F^- pelas fezes durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	93

Figura 24 -	Média da excreção de F^- pelas fezes durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	93
Figura 25 -	Média da excreção de F^- pela urina durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	95
Figura 26 -	Média da excreção de F^- pela urina durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	95
Figura 27 -	Média da excreção total de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	97
Figura 28 -	Média da excreção Total de F^- pela durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	97
Figura 29 -	Média de absorção de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	101
Figura 30 -	Média de absorção de F^- durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	101
Figura 31 -	Média de retenção de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	103
Figura 32 -	Média de retenção de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.....	103
Figura 33 -	Correlação entre a $[F^-]$ presente no plasma e no fêmur dos animais.....	106

Figura 34 -	Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J do grupo controle....	109
Figura 35 -	Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J que ingeriram água com baixa concentração de fluoreto.....	109
Figura 36 -	Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J que ingeriram água com alta concentração de flúor.....	109
Figura 37 -	Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de camundongos da linhagem A/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F ⁻] (B) e alta [F ⁻] (C). As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250...	110
Figura 38 -	Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de camundongos da linhagem 129P3/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F ⁻] (B) e alta [F ⁻] (C). As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.....	110
Figura 39 -	Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 122 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo controle.....	112
Figura 40 -	Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 126 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de baixa [F ⁻].....	113
Figura 41 -	Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 134 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de alta [F ⁻].....	114
Figura 42 -	Representação das comparações dos géis de proteínas renais diferencialmente expressas entre as linhagens de camundongos nos diferentes tratamentos.....	126
Figura 43 -	Géis bidimensionais representativos de proteínas urinárias de camundongos da linhagem A/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F ⁻] (B) e alta [F ⁻] (C). As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 4-7 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250..	127

Figura 44 -	Géis bidimensionais representativos de proteínas urinárias de camundongos da linhagem 129P3/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F ⁻] (B) e alta [F ⁻] (C). As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 4-7 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.....	127
Figura 45 -	Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 84 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo controle.....	130
Figura 46 -	Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 68 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de baixa [F ⁻].....	131
Figura 47 -	Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o <i>software Image Master 2D Platinum</i> revelaram 66 <i>spots</i> de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de alta [F ⁻].....	132
Figura 48 -	Representação das comparações dos géis de proteínas urinárias diferencialmente expressas entre as linhagens de camundongos nos diferentes tratamentos.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidade de água ingerida (g) em 48 h nas duas primeiras semanas anteriores ao estudo metabólico.....	56
Tabela 2 -	Média da quantidade de água ingerida pela linhagem A/J para os grupos de tratamento de baixa e alta $[F^-]$ e $[F^-]$ na água de beber ajustada, durante as sete semanas de estudo metabólico.....	57
Tabela 3 -	Quantidade de água ingerida pelos animais da gaiola 9 da linhagem A/J (n=2), grupo de tratamento com baixa $[F^-]$, e $[F^-]$ na água de beber ajustada, durante cinco semanas de estudo metabólico.....	57
Tabela 4 -	Média da quantidade de água ingerida pela linhagem 129P3/J para os grupos de tratamento de baixa e alta $[F^-]$ e $[F^-]$ na água de beber durante as sete semanas de estudo metabólico.....	58
Tabela 5 -	Classificação das características da aparência clínica do esmalte dos incisivos fluoróticos em camundongos como modificado por Thylstrup and Fejerskov.....	59
Tabela 6 -	Dosagem de proteínas do homogenato renal e volume de amostra utilizado para obtenção do <i>pool</i> das linhagens A/J e 129P3/J.....	69
Tabela 7 -	Dosagem de proteínas da urina e volume de amostra utilizado para obtenção do <i>pool</i> das linhagens A/J e 129P3/J.....	69
Tabela 8 -	Quantidade de água ingerida (g) em 48 h nas duas semanas anteriores ao estudo metabólico e durante as sete semanas de estudo.....	80
Tabela 9 -	Quantidade de F^- ingerida durante as 7 semanas de estudo metabólico.....	84
Tabela 10 -	Quantidade de F^- excretada durante as 7 semanas de estudo metabólico.....	91
Tabela 11 -	Quantidade de F^- (μg) absorvido e retido e porcentagem (%) de absorção e retenção de F^- durante as 7 semanas de estudo metabólico.....	99
Tabela 12 -	Concentração de F^- presente no plasma ($\mu g/L$), no fêmur (mg/Kg) e no rim ($\mu g/g$).....	105
Tabela 13 -	Fluorescência quantitativa (QF) e exame clínico dos incisivos dos animais (n=5).....	108

Tabela 14 -	Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo controle. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	115
Tabela 15 -	Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de baixa [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	119
Tabela 16 -	Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de alta [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	123
Tabela 17 -	Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo controle. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	133
Tabela 18 -	Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de baixa [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	136
Tabela 19 -	Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de alta [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	138
Tabela 20 -	Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa de camundongos da linhagem A/J do grupo controle comparado com o de baixa [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	140
Tabela 21 -	Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa de camundongos da linhagem A/J do grupo controle comparado com o de alta [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i> e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).....	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

AMBIC - Bicarbonato de amônio

BSA – *bovine serum albumin* – albumina de soro bovina

CO₂ – dióxido de carbono

dpi – *dots per inch* – pontos por polegada

DTT – dithiothreitol

EDTA – etilenodiaminatetracetato

g – grama

h – hora

HF – ácido fluorídrico

HMDS – hexametil-disiloxano

IAA - iodoacetamida

IEF – *isoelectric focalization* - focalização isoeletrica

kDa – quilo Dalton

L – litro

mA – miliampere

min – minuto

mg – miligrama

mg/L – miligrama por litro

mg/Kg – miligrama por quilograma

mL – mililitro

mm³ - milímetro cúbico

mM – milimolar

mV – milivoltagem

Na⁺ – sódio

nm – nanômetro

M – molar

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoeletrico

PM – peso molecular

PMSF – fluoreto de fenilmetisulfonil

ppm – parte por milhão

p/v – peso por volume

rpm – rotação por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

v/v – volume por volume

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

µmol – micromol

°C – graus celsius

% - porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	METABOLISMO DO FLUORETO	31
2.1.1	O Flúor	31
2.1.2	Absorção do fluoreto	31
2.1.3	Fluoreto no plasma	33
2.1.4	Fluoreto nos tecidos calcificados	33
2.1.5	Excreção renal do fluoreto	34
2.2	TOXICIDADE CRÔNICA DO FLUORETO	35
2.3	PROTEOMA	41
2.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	43
2.4.1	Eletroforese bidimensional	43
2.5	O PROTEOMA APLICADO EM ESTUDOS DE TOXICOLOGIA DO FLUORETO	46
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	ANÁLISE METABÓLICA	55
4.1.1	Obtenção dos animais	55
4.1.2	Tratamento dos animais	56
4.1.3	Eutanásia dos animais e coleta das amostras	58
4.1.4	Avaliação clínica de fluorose dentária	59

4.1.5	Avaliação de fluorose dentária por fluorescência quantitativa	60
4.1.6	Dosagens de fluoreto	61
4.1.6.1	<i>Dosagem de fluoreto no plasma</i>	61
4.1.6.2	<i>Dosagem de fluoreto nas fezes</i>	63
4.1.6.3	<i>Dosagem de fluoreto no fêmur</i>	65
4.1.6.4	<i>Dosagem de fluoreto no rim</i>	65
4.1.6.5	<i>Dosagem de fluoreto na urina e na água</i>	65
4.1.7	Análise estatística do estudo metabólico	66
4.2	ANÁLISE PROTEÔMICA	66
4.2.1	Preparo das amostras	66
4.2.1.1	<i>Extração de proteínas do rim</i>	66
4.2.1.2	<i>Extração de proteínas da urina</i>	68
4.2.2	Quantificação de proteínas	68
4.2.3	Eletroforese bidimensional	70
4.2.3.1	<i>Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)</i>	70
4.2.3.2	<i>Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)</i>	71
4.2.4	Visualização e análise de imagens da eletroforese bidimensional	71
4.2.5	Preparo das amostras para espectrometria de massa	72
5	RESULTADOS	77
5.1	ESTUDO METABÓLICO	77
5.1.1	Peso do rim	77
5.1.2	Peso corporal dos animais	77

5.1.3	Ingestão de água	80
5.1.4	Ingestão de fluoreto	83
5.1.5	Excreção de fluoreto	90
5.1.6	Absorção e retenção de fluoreto	98
5.1.7	Concentração de fluoreto no plasma, fêmur e rim	104
5.1.8	Fluorescência quantitativa e análise clínica	107
5.2	ESTUDO PROTEÔMICO	110
5.2.1	Análise proteômica do rim	110
5.2.2	Análise proteômica da urina	127
6	DISCUSSÃO	147
7	CONCLUSÃO	157
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXOS	173

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O uso disseminado do fluoreto (F^-) tem contribuído para uma redução na prevalência e incidência da cárie dentária. No entanto, juntamente com o declínio da cárie dentária, tem sido observado um aumento na fluorose dentária, um efeito colateral resultante da exposição prolongada ao F^- acima dos níveis recomendados durante o período de formação dos dentes (CLARK, 1994). Esta prevalência aumentada da fluorose dentária tem sido observada em todo o mundo (ANGMAR-MANSSON e WHITFORD, 1990), estando entre 7,7% e 80,9% nas áreas com fluoretação da água, e entre 2,9% e 42% em áreas sem fluoretação da água (CLARK, 1994; MASCARENHAS, 2000; PENDRYS, 2000; VIEIRA, HANCOCK, LIMEBACK *et al.*, 2004).

É sabido que o F^- interage com os tecidos mineralizados, e em concentrações elevadas pode prejudicar o processo de mineralização (AOBA e FEJERSKOV, 2002). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da fluorose ainda são desconhecidos.

Em adição, estudos epidemiológicos têm demonstrado que certos grupos étnicos são mais suscetíveis a esta patologia (VIEIRA, HANCOCK, LIMEBACK *et al.*, 2004). A suscetibilidade genética à fluorose foi testada usando um modelo de estudo com camundongos (que possuem erupção contínua dos incisivos) onde o genótipo, a idade, o gênero, a alimentação, a moradia e os níveis de F^- na água foram rigorosamente controlados (EVERETT, MCHENRY, REYNOLDS *et al.*, 2002). A observação de 12 linhagens de camundongos mostrou diferença na suscetibilidade/resistência à fluorose dentária. A linhagem de camundongos A/J mostrou ser altamente suscetível, com um rápido e severo desenvolvimento da fluorose dentária quando comparada com outras linhagens testadas, enquanto a linhagem de camundongos 129P3/J mostrou-se pouco afetada, com uma fluorose dentária leve. Neste estudo, o acúmulo de F^- nos fêmures e nos incisivos foi avaliado como indicador da exposição ao F^- . Houve uma correlação significativa entre a concentração de F^- na água e a concentração de F^- nos fêmures, bem como entre a concentração de F^- na água e a concentração de F^- nos incisivos. Além disso, todos os camundongos acumularam quantidades similares de F^- nos fêmures e nos incisivos, independente do grau de fluorose que apresentaram. Isto sugere que a eliminação do F^- pelo corpo não é uma explicação suficiente para a resistência à

fluorose dentária. Porém, um suporte final para esta hipótese poderá ser dado somente com a condução de um estudo metabólico com essas diferentes linhagens de camundongos.

A eletroforese bidimensional tem emergido como uma ferramenta poderosa para a identificação de proteínas diferencialmente expressas em tecidos ou fluidos. Esta técnica permite a detecção de alterações na expressão de múltiplas proteínas simultaneamente (ARTHUR, THONGBOONKERD, SCHERZER *et al.*, 2002). Quando se considera o metabolismo do F^- , o compartimento e tecido de escolha para o estudo da expressão protéica diferencial são o sangue, que distribui o F^- ao organismo e os rins, que são a sua principal rota de remoção do organismo (WHITFORD, 1996), respectivamente. Neste sentido, esta técnica poderia trazer valiosas informações com relação à análise da expressão protéica diferencial nos rins e urina de camundongos suscetíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos a diferentes níveis de F^- sistêmico. Isto poderia fornecer importantes “*insights*” para o entendimento dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade/resistência à fluorose dentária.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO DO FLUORETO

O entendimento dos efeitos biológicos do fluoreto ingerido de forma sistêmica requer o conhecimento de suas propriedades químicas e de sua distribuição no organismo humano (EKSTRAND, 1996).

2.1.1 O Flúor

O flúor é um componente natural da biosfera, sendo o 13º elemento mais encontrado na crosta terrestre (WHITFORD, 1996). É um halogênio, possui como símbolo a letra F, número atômico 9 e peso atômico 19. Por possuir um pequeno raio atômico, sua carga de superfície efetiva é maior que a dos outros elementos, tornando-o deste modo o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica. Essas características fazem com que este íon se ligue facilmente a qualquer outro elemento, e estas ligações são mais estáveis que a de uma molécula de F_2 . Ele reage prontamente com o seu ambiente, comportando-se como íon flúor ou fluoreto. Os minerais mais importantes no qual está presente são a fluorita (CaF_2), a criolita (Na_3AlF_6) e a fluorapatita [$Ca_5F(PO_4)_3$] (SMITH e EKSTRAND, 1996).

Quanto à palavra flúor, ela identifica o elemento químico ou a molécula covalente F_2 , que raramente ocorre. O que encontramos é o íon flúor, ou simplesmente, fluoreto (F^-) (BUZALAF e CARDOSO, 2008).

2.1.2 Absorção do fluoreto

O F^- se combina reversivelmente com íons hidrogênio para formar o HF ($H^+ + F^- \rightleftharpoons HF$), um ácido fraco com pK_a de 3,45. Muito do comportamento biológico do F^- pode ser explicado com base na difusibilidade do HF, já que o íon flúor é polar e sua permeabilidade à membrana plasmática é bastante limitada. Entretanto, com a queda do pH, uma parte do íon flúor pode se combinar com os íons hidrogênio, formando o HF. A apolaridade da molécula de HF facilita sua absorção pelas células (maior difusibilidade). Uma vez dentro da célula, o HF se dissocia, liberando o íon

flúor. Quanto menor o pH, maior o deslocamento da reação para a formação de HF, maior a migração de F^- , e maior o seu potencial de toxicidade (WHITFORD, 1996). Há muitas evidências de que vários aspectos da distribuição do F^- são dependentes do pH, e que a migração transmembrana do íon ocorre na forma de HF, em resposta a diferenças na acidez entre compartimentos adjacentes de fluidos corporais (NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989; MESSER e OPHAUG, 1991; MESSER e OPHAUG, 1993; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996; ADAIR, HANES, RUSSELL *et al.*, 1999) Após ser ingerido, o F^- é rapidamente absorvido no trato gastrintestinal, sendo essa absorção passiva e independente de mecanismos especiais de transporte (WHITFORD, 1990; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). O tempo médio para absorção é de cerca de 30 minutos (WHITFORD, 1996). Após a absorção, os níveis plasmáticos de F^- aumentam rapidamente, atingindo um pico entre 20 e 60 minutos (WHITFORD, 1990; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Isso indica que o íon é rapidamente absorvido pelo estômago, um fato que o distingue dos demais halógenos e muitas outras substâncias (WHITFORD, 1996). Após esse pico, as concentrações de F^- no plasma declinam rapidamente, paralelamente à diminuição da proporção de absorção, devido à contínua incorporação do F^- ao osso e à excreção urinária (WHITFORD, 1990; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

Embora o F^- seja rapidamente absorvido no estômago, sua absorção total no estômago é determinada pela acidez gástrica, pelo conteúdo gástrico e pela rapidez do esvaziamento gástrico para o intestino delgado (NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989; MESSER e OPHAUG, 1991; MESSER e OPHAUG, 1993). A maior parte do F^- que não é absorvida no estômago o será no intestino delgado (NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989).

No intestino, a absorção do F^- é independente do pH (WHITFORD, 1990) e ocorre essencialmente na forma de íons de flúor, que atravessam o epitélio intestinal via canais paracelulares das junções intercelulares (MESSER, NOPAKUN e RUDNEY, 1989; NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989). Aproximadamente 25% da absorção do F^- é realizada no estômago, enquanto que 75% acontece no intestino delgado (NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989). Esta grande absorção de F^- no intestino delgado pode compensar uma baixa absorção gástrica em alto pH (MESSER e OPHAUG, 1993).

O F^- se distribui rapidamente pelo organismo. Do ponto de vista farmacocinético, o plasma é considerado o compartimento central de distribuição do F^- , pois ele é o fluido no qual e pelo qual o F^- deve passar para sua subsequente redistribuição e eliminação (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Nos tecidos moles, o F^- estabelece uma distribuição de estado estacionário entre fluidos intra e extracelulares, e, como consequência, quando há aumento ou diminuição dos níveis plasmáticos de F^- , existe uma mudança proporcional na concentração dos fluidos intracelulares (EKSTRAND, 1996). Para uma dose de F^- ingerida por um adulto, parte é excretada na urina, e parte é incorporada aos tecidos mineralizados, principalmente ossos. Nestes, o F^- se liga reversivelmente, sendo liberado durante o remodelamento ósseo (BUZALAF, 2008).

2.1.3 Fluoreto no plasma

No plasma, o F^- é encontrado na forma iônica (também chamado fluoreto livre ou inorgânico) e não iônica (fluoreto orgânico ou ligado). O F^- iônico, que pode ser detectado pelo eletrodo íon específico, é o que apresenta interesse para a Odontologia, Medicina e Saúde Pública. Para o F^- não iônico, embora sua concentração seja maior que a do iônico, seu significado biológico ainda não foi determinado (WHITFORD, 1996).

Em humanos, a fração iônica de F^- no plasma é normalmente muito baixa, e ainda que a ingestão de F^- exceda o padrão diário normal de ingestão de alimentos, líquidos e dentifrícios, espera-se que os níveis plasmáticos mostrem picos discretos, geralmente tendendo a subir durante as horas em que o indivíduo se mantém acordado e a baixar durante o sono (WHITFORD, 1996). Os níveis plasmáticos de F^- refletem, fundamentalmente, o balanço entre a quantidade e a frequência de sua ingestão, sua absorção, sua distribuição nos tecidos moles e fluidos corporais especializados, sua incorporação nos tecidos mineralizados, e, finalmente, sua filtração e excreção pelos rins (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

2.1.4 Fluoreto nos tecidos calcificados

Aproximadamente 99% do F^- retido no organismo está associado aos tecidos mineralizados, principalmente ao osso, mas também ao esmalte e à dentina

(WHITFORD, 1996). A dentina e o osso parecem ter concentrações similares de F^- . A concentração de F^- no esmalte é bem menor, mais alta na superfície e declinam progressivamente em direção à junção amelo-dentinária (JAKUBOWSKA, CHLUBEK, LAGOCKA *et al.*, 2004). A concentração de F^- de todo esmalte reflete o nível de exposição durante a formação dos dentes, enquanto que as concentrações presentes na dentina e no osso são geralmente proporcionais à ingestão ao longo do tempo (WHITFORD, 1994).

O F^- nos tecidos calcificados não está ligado irreversivelmente, principalmente aquele recentemente adquirido, que está localizado nos cristaltos na superfície óssea, os quais podem fazer trocas isoiônicas ou heteroiônicas (com outros ânions do fluido extracelular). Ao longo do tempo, o F^- em regiões profundas do osso pode ser liberado durante o processo normal de remodelação óssea (WHITFORD, 1996; ADAIR, HANES, RUSSELL *et al.*, 1999; BUZALAF, CAROSELLI, CARDOSO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em recém-nascidos e crianças pequenas, a quantidade de F^- retida nos tecidos calcificados é maior que 50% da ingestão diária (LUDLOW, LUXTON e MATHEW, 2007).

As razões para a aparente seletividade do F^- aos tecidos ósseo e dentário, e esmalte em particular, foram relacionados às interações entre os íons flúor e o mineral ósseo, a hidroxiapatita.

2.1.5 Excreção renal do fluoreto

Os rins representam a maior rota de remoção do F^- no organismo. A taxa de excreção do F^- é uma variável importante por diversos fatores, incluindo o fato de ser frequentemente usada como indicador de ingestão deste íon (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Em condições normais, aproximadamente metade do F^- ingerido diariamente pelos adultos é excretada pela urina (EKSTRAND, SPAK e VOGEL, 1990). Consequentemente, o plasma e a excreção urinária refletem um balanço fisiológico que é determinado pela ingestão prévia de F^- , o grau de acúmulo do íon no osso e a eficiência dos rins em excretá-lo (EKSTRAND, ALVAN, BOREUS *et al.*, 1977).

Pelo flúor iônico não se ligar às proteínas plasmáticas (EKSTRAND, ERICSSON e ROSELL, 1977; NOPAKUN, MESSER e VOLLER, 1989), sua concentração no filtrado glomerular é inquestionavelmente a mesma do plasma.

Após entrar nos túbulos renais, uma quantidade variável do íon é reabsorvida (de 10 a 90%) e retorna à circulação sistêmica, sendo o remanescente excretado pela urina (EKSTRAND, 1996). Isso indica que a filtração glomerular é o primeiro determinante na quantidade de F^- excretada pela urina e que sua redução, como ocorre na disfunção renal crônica, bem como nas últimas décadas de vida, quando o número de néfrons normalmente funcionais está em declínio, refletirá em um aumento da concentração de F^- no plasma (SCHIFFEL HH, 1980; EKSTRAND, 1996).

Assim como acontece para absorção gástrica e para migração transmembrana do F^- , o mecanismo de reabsorção tubular parece se dar por difusão do HF. Quando a urina está relativamente alcalina, quase todo o F^- está presente na forma iônica e, devido ao tamanho e carga, permanece no interior do túbulo renal para ser excretado. Dessa forma, os fatores que alteram o pH urinário, como a composição da dieta, certas doenças respiratórias ou metabólicas, algumas drogas e a altitude de residência, poderiam afetar o metabolismo do F^- , sendo que nos casos de pH urinário mais ácido poderia haver um aumento dos níveis circulantes de F^- (WHITFORD, 1990).

2.2 TOXICIDADE CRÔNICA DO FLUORETO

Os efeitos colaterais da ingestão crônica do F^- ocorrem pela administração de doses excessivas e constantes. O F^- interage com os tecidos mineralizados e em elevadas concentrações prejudica o processo de mineralização podendo provocar fluorose dentária e esquelética (AOBA, 1997). A ingestão crônica de F^- durante o período de formação do esmalte dentário pode resultar em fluorose dentária, que é caracterizada por alterações clínicas do esmalte que variam de linhas brancas finas a opacidade severa, podendo ocorrer o rompimento da estrutura logo após a erupção e o aparecimento de manchas amarronzadas (FEJERSKOV, RICHARDS e DENBESTEN, 1996).

O excesso de F^- no organismo ao longo do tempo pode ocasionar a fluorose esquelética, uma condição mais séria que a fluorose dentária. Porém, os níveis de ingestão de F^- para que esta ocorra estão acima dos 5,0 ppm (mg/L) de F^- na água de abastecimento, o que torna essa situação bem menos prevalente do que a fluorose dentária (SAMPAIO, 2008). A fluorose esquelética pode ser classificada em 6 estágios de severidade crescente: fase assintomática, fase sintomática inicial, fase

esquelética estabelecida, fase de complicações, fase de enfraquecimento e fase de incapacitação. As características clínicas da fluorose esquelética incluem imobilização das articulações e uma combinação de outras discrepâncias, como exostose, osteoesclerose, osteomalácia e osteoporose. Joelho vago ("*genu varum*") e exostose dos joelhos ("*knock knee*") também são características comuns da fluorose esquelética (KRISHNAMACHARI, 1986).

Nos dentes, a ingestão crônica de F^- causa mudanças macroscópicas cuja severidade é maior quanto maior for o grau de porosidade subsuperficial. Em dentes menos afetados, pode se apresentar como linhas brancas, descontínuas, ao longo das periquimácias do esmalte, que com o aumento da severidade, vão se unindo em blocos de cor branca opaca, chegando a cobrir toda a superfície do esmalte coronal. A partir de 10 a 15% de aumento no volume de poros, a superfície externa pode se romper, formando cavidades inicialmente menores, mas que podem confluir impulsionadas por forças físicas intrabuciais, como mastigação ou atrito. Não há alteração da forma morfológica do dente recém-erupcionado, sendo que a ruptura da camada superficial é uma mudança pós-eruptiva (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1978; CUTRESS e SUCKLING, 1990; GIAMBRO, PROSTAK e DEN BESTEN, 1995; ADAIR, HANES, RUSSELL *et al.*, 1999). Ainda como mudanças pós-eruptivas podem ocorrer manchamento e desgaste das superfícies oclusal e incisal, alterando a morfologia dentária (CUTRESS e SUCKLING, 1990; FEJERSKOV, MANJI e BAEUM, 1990; FEJERSKOV, LARSEN, RICHARDS *et al.*, 1994).

Essas mudanças clínicas induzidas pelo F^- são bem classificadas pelo índice de TF (Thylstrup Fejerskov). O índice TF reflete, sobre uma escala ordinal de 0 a 9, as características histopatológicas que correspondem com as características clínicas observadas em dentes com fluorose (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1978).

Vários fatores podem afetar a distribuição e a severidade das lesões fluoróticas. O fator de risco mais importante é a quantidade total de F^- ingerida a partir de todas as fontes, durante o período crítico de formação dos dentes (DENBESTEN, 1999). A dose diária máxima de ingestão de F^- , acima da qual se acredita que o risco de fluorose dentária seja maior, ainda não está precisamente definida. Apesar de ser baseada em evidências empíricas, uma ingestão diária de fluoreto entre 0,05 e 0,07 mg/kg de peso corporal é usualmente considerada como ótima para o controle da cárie dentária e para evitar fluorose dentária (BURT, 1992).

Alguns fatores podem interferir na maior ou menor tolerância do indivíduo ao F^- , ou seja, indivíduos que ingerem a mesma dose de F^- podem ser mais ou menos afetados pela fluorose dentária. Dentre estes fatores, encontram-se distúrbios ácido-básicos, os quais podem ser causados pela composição da dieta e altitude de residência, distúrbios renais, estado nutricional e fatores genéticos (ANGMAR-MANSSON e WHITFORD, 1990; YODER, MABELYA, ROBISON *et al.*, 1998)

O consumo frequente de uma dieta rica em proteínas leva a um menor pH urinário, aumentando a retenção de F^- . Um estudo conduzido na Índia demonstrou que indivíduos vegetarianos desenvolvem menos fluorose que indivíduos que consomem carne. Neste estudo, a prevalência de fluorose dentária entre os vegetarianos foi de 67% enquanto que nos indivíduos não vegetarianos, foi de 95% (AWADIA, HAUGEJORDEN, BJORVATN *et al.*, 1999).

O aumento da concentração de cálcio na dieta também tem mostrado uma redução na fluorose dentária já que o cálcio diminui a absorção do F^- . Em um estudo realizado na China houve menor prevalência de fluorose dentária entre crianças que ingeriram leite (7,2%) quando comparadas com crianças que não ingeriram leite (37,5%) (CHEN, LIN, XIAO *et al.*, 1997). Na Índia, estudos mostraram uma inversa relação entre a prevalência de fluorose e níveis de cálcio presentes na água de beber (GUPTA, MEHTA e SINGH, 1991; BHARGAVI, KHANDARE, VENKAIAH *et al.*, 2004; KHANDARE, HARIKUMAR e SIVAKUMAR, 2005).

A altitude da residência também pode estar envolvida na severidade da fluorose já que a hipóxia apresentada em altas altitudes, leva em última instância à diminuição do pH urinário e como consequência diminui a excreção de F^- , aumentando sua concentração no organismo (WHITFORD, 1996). Estudos epidemiológicos observaram um aumento na prevalência e severidade de fluorose dentária em populações que residem em regiões de alta altitude quando comparadas com aquelas que residem em áreas de baixa e têm exposição semelhante ao F^- (YODER, MABELYA, ROBISON *et al.*, 1998; RWENYONYI, BJORVATN, BIRKELAND *et al.*, 1999; MARTINEZ-MIER, SOTO-ROJAS, URENA-CIRETT *et al.*, 2004; AKOSU e ZOAKAH, 2008).

Distúrbios renais em crianças têm sido associados a defeitos no esmalte dentário. Os efeitos da uremia na formação dentária foram avaliados em ratos nefrectomizados expostos a 0 e 50 ppm F na água de beber (LYARUU, BRONCKERS, SANTOS *et al.*, 2008). A ingestão de F^- pelos animais

nefrectomizados aumentou os níveis de F^- no plasma em duas vezes. A uremia afetou a formação da dentina e do esmalte e mostrou ter maior efeito negativo do que o F^- sozinho. Em humanos, muitos estudos têm mostrado uma relação direta entre distúrbios renais e defeitos no esmalte, os quais incluem a hipoplasia (KOCH, BUHRER, PIOCH *et al.*, 1999; AL-NOWAISER, ROBERTS, TROMPETER *et al.*, 2003; FARGE, RANCHIN e COCHAT, 2006). Em um estudo que comparou a frequência de lesões no esmalte em crianças com doença renal, embora não houve diferença significativa na frequência de fluorose dentária entre os dois grupos, pacientes com doença renal apresentaram fluorose dentária mais severa do que crianças sem doença renal (IBARRA-SANTANA, RUIZ-RODRIGUEZ MDEL, FONSECA-LEAL MDEL *et al.*, 2007).

Embora uma associação entre desnutrição e prevalência e severidade da fluorose dentária tenha sido sugerida ao longo das décadas, as evidências entre esta relação são controversas e de difícil interpretação. Se uma criança em jejum pode absorver o F^- da água de beber ou de outras fontes mais rapidamente que uma criança bem alimentada (devido a inexistência de complexos de F^- em um estômago vazio), por outro lado, uma criança desnutrida pode ter uma deposição de F^- menor por um longo período de tempo (devido a um lento crescimento ósseo) (SAMPAIO, 2000).

Em um estudo com crianças da Tanzânia, Yoder *et al.* (1998) sugeriram uma relação direta entre a desnutrição e fluorose dentária. Essa suposição, no entanto, deve ser interpretada com cautela para evitar erros. Os autores correlacionaram suas descobertas (alta prevalência de fluorose) com informações de um estudo anterior sobre nutrição em 2 das 3 áreas avaliadas, mas nenhuma comparação direta entre as crianças com ou sem desnutrição, quanto à prevalência de fluorose foi feita.

Correia Sampaio *et al.* (1999) demonstraram que a fluorose dentária varia independentemente do estado nutricional. O estado nutricional foi avaliado pelos índices de altura para idade (desnutrição crônica) e peso para idade (desnutrição geral) recomendados pela OMS. Uma relação significativa foi encontrada entre a fluorose dentária e a concentração de F^- na água, mas não entre estado nutricional e gênero. A fluorose dentária pode estar relacionada a outros fatores como hábitos alimentares infantis ou aumento do consumo de água com F^- . Estudos futuros sobre este assunto devem considerar um desenho longitudinal, onde estado nutricional,

hábitos alimentares e ingestão de F^- sejam avaliados durante o período de formação dos dentes. Isto é particularmente importante para os países em desenvolvimento, onde a desnutrição e a fluorose dentária são prevalentes e produtos que contêm F^- são introduzidos a fim de controlar a cárie dentária.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que alguns grupos étnicos são mais suscetíveis à fluorose que outros. Crianças afroamericanas tiveram maior prevalência de fluorose que crianças brancas, hispânicas ou não, em um estudo realizado em 1980 no Texas, EUA (BUTLER, SEGRETO e COLLINS, 1985). Essa tendência foi também encontrada em outro estudo conduzido na Georgia, EUA, o qual mostrou maior prevalência de fluorose dentária em indivíduos afroamericanos (WILLIAMS e ZWEMER, 1990). Yoder et al (1998) conduziram um estudo epidemiológico que avaliou a fluorose dentária em algumas regiões da Tanzânia. Os autores observaram que em uma região onde a maioria das crianças apresentava fluorose severa, algumas crianças não apresentavam evidências de distúrbios na mineralização do esmalte, sugerindo a possibilidade de haver uma variabilidade genética na tolerância ao F^- .

A possibilidade da influência genética na suscetibilidade/resistência à fluorose foi testada em um estudo com 12 linhagens camundongos (que possuem erupção contínua dos incisivos) onde o genótipo, a idade, o gênero, a alimentação, as condições de alojamento e os níveis de fluoreto na água foram rigorosamente controlados. Os autores dividiram as linhagens, de acordo com a suscetibilidade à fluorose, em resistentes, suscetíveis e intermediárias. A linhagem de camundongos A/J mostrou ser altamente suscetível, com um rápido e severo desenvolvimento da fluorose dentária quando comparada com outras linhagens testadas, enquanto a linhagem de camundongos 129P3/J mostrou-se pouco afetada, com uma fluorose dentária leve (EVERETT, MCHENRY, REYNOLDS *et al.*, 2002). Entretanto, o estudo de Everett et al (2002) não teve características metabólicas e diferenças no metabolismo do F^- por estas linhagens de animais deveriam ser investigadas.

Num estudo subsequente, o mesmo grupo procurou identificar a região do genoma que carrega a suscetibilidade à fluorose dentária. Para isso, foram cruzados animais da linhagem 129P3/J com animais da linhagem A/J. A geração F1 foi então cruzada entre si, obtendo-se a geração F2. A estes animais foi fornecida água de beber contendo 50 ppm F desde o desmame por 60 dias, para que houvesse

desenvolvimento do fenótipo da fluorose dentária. A genotipagem para fluorose dentária foi feita através da presença de 354 *SNPs* no genoma de cada um dos 102 animais de F2 que apresentaram extremos fenotípicos (TF 1 ou TF 4), a fim de se avaliar quais partes do genoma se correlacionavam com os respectivos fenótipos. Foram encontrados loci de características quantitativas (QTL) nos cromossomos 2 e 11. No cromossomo 2, foi encontrado um intervalo de QTL de ~77,62. No cromossomo 11, identificou-se um intervalo de QTL de ~74.29 Mb. Também foi feita análise histológica do esmalte dos animais, tendo sido observado que os animais da linhagem A/J retêm muito mais proteínas no esmalte em fase de maturação quando comparados àqueles da linhagem 129P3/J, mesmo na ausência de exposição ao F⁻, indicando que há uma diferença inerente na formação do esmalte entre estas duas linhagens (EVERETT, YAN, WEAVER *et al.*, 2009).

Vieira et al (2005) utilizaram as linhagens 129P3/J (resistente), SWR/J (intermediária) e A/J (suscetível) para um estudo onde avaliaram a correlação entre a concentração de F⁻ no dente, a severidade da fluorose dentária e a qualidade dos dentes dos animais submetidos a 4 diferentes tratamentos com F⁻. Este estudo mostrou que os fatores ambientais (concentração de F⁻ nos dentes) e os fatores genéticos (suscetibilidade à fluorose/linhagem) têm influência semelhante sobre as propriedades biomecânicas dos dentes. Houve diferença na qualidade do esmalte entre as linhagens A/J e 129P3/J. Utilizando um teste de microdureza, os autores observaram que o esmalte dos incisivos dos animais 129P3/J é 22% mais duro que o dos A/J.

O *background* genético, além de influenciar na resposta dos ameloblastos aos efeitos do F⁻, também parece influenciar na resposta dos osteoblastos. Um estudo realizado com as linhagens A/J, SWR/J e 129P3/J, submetidas a 4 tratamentos com fluoreto mostrou que há diferença nas propriedades mecânicas dos ossos entre as linhagens (MOUSNY, BANSE, WISE *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos recentes em humanos também têm investigado a suscetibilidade genética à fluorose dentária. Uma associação entre o genótipo osteopontina (*OPN*) e a fluorose dentária nos estágios iniciais de erupção da dentição permanente foi sugerida, utilizando uma repetição de dinucleotídeos intragênicos para identificar os alelos de *OPN* (DAWSON, LEVY, WARREN *et al.*, 2006). Observou-se que uma variante particular do gene *OPN* (*OPN12*) parece ter um efeito protetor, sendo que a fluorose dentária foi observada em 39,5% dos 319

indivíduos, sem qualquer cópia do alelo *OPN12*, contra 26,4% das 53 crianças portadoras de uma cópia desta variante. Estes resultados são particularmente interessantes, especialmente porque uma associação entre o genótipo *OPN* e hipoplasia de esmalte foi encontrada, outrossim, em dentes decíduos. Em um estudo posterior do mesmo grupo de pesquisa, também foi demonstrada uma associação entre o fenótipo da fluorose e o polimorfismo de um único nucleotídeo (*SNP*) no íntron 1 do gene da tuftelina (*TUFT1*) (DAWSON, XIAO, LEVY *et al.*, 2008).

A possibilidade de interação gene/ambiente foi avaliada através da determinação da suscetibilidade diferencial de fluorose em um determinado nível de exposição ao F^- baseado em um *background* genético. Huang *et al.* (2008) realizaram um estudo caso-controle com crianças entre 8 e 12 anos de idade, com ($n = 75$) e sem ($n = 165$) fluorose dentária em dois municípios na província de Henan, na China. Os polimorfismos *PvuII* e *RsaI* e polimorfismos no gene *COL1A2* foram genotipados. Os níveis de calcitonina e osteocalcina no soro foram medidos. Em uma aldeia com fluorose endêmica, crianças portadoras do genótipo homozigoto *PP* de *COL1A2* *PvuII* tiveram um aumento significativo no risco à fluorose dentária em comparação com crianças portadoras do genótipo homozigoto *pp*. No entanto, o risco não foi elevado quando a população controle foi recrutada a partir de uma aldeia sem fluorose endêmica. Além disso, os níveis de F^- na urina e os níveis de osteocalcina no soro foram significativamente mais baixos nos controles provenientes de aldeias não endêmicas, em comparação com os casos. Entretanto, as diferenças nos níveis de flúor e osteocalcina não foram observadas quando os casos foram comparados com a população controle das aldeias com fluorose endêmica. Este estudo forneceu a primeira evidência de uma associação entre polimorfismos no gene *COL1A2* com fluorose dentária em populações expostas a elevado nível de fluoreto.

2.3 PROTEOMA

As proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos, sendo as responsáveis pelo fenótipo definitivo da célula. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição dos sistemas biológicos. Deste modo, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um

determinado organismo apenas pelo estudo dos genes. Em virtude disto, surgiu uma nova abordagem experimental na Biologia conhecida como *análise proteômica*, que consiste em um conjunto de ferramentas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um conjunto de proteínas expressas por um dado genoma, e este conjunto de proteínas foi chamado de proteoma (WILKINS, SANCHEZ, GOOLEY *et al.*, 1996). O elemento comum dos estudos proteômicos é a multiplicidade, ou seja, o estudo simultâneo de múltiplas proteínas ao invés de uma proteína de cada vez, como na bioquímica tradicional (KNEPPER, 2002).

Contrariamente ao genoma, que funciona como um depósito estático de informação gênica e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Assim, um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas (WILKINS, SANCHEZ, GOOLEY *et al.*, 1996; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004).

O estudo de proteínas não é novidade. Análises de *Western Blot* têm sido utilizadas com sucesso no exame de proteínas (KHARASCH, HANKINS e THUMMEL, 1995). Entretanto, esses métodos imunológicos têm a limitação de identificar um pequeno número de proteínas em um único experimento, estarem disponíveis apenas para as proteínas para as quais existem anticorpos, e as proteínas de interesse são baseadas em uma suposição prévia (ARTHUR, THONGBOONKERD, SCHERZER *et al.*, 2002). Análises proteômicas podem ser utilizadas para estudar um grande número de proteínas simultaneamente, utilizando espectrometria de massas, e não requerem qualquer anticorpo (JUNGBLUT e WITTMANN-LIEBOLD, 1995). Embora a análise proteômica tenha uma série de vantagens quando comparada com métodos convencionais, não é um método perfeito, possuindo algumas limitações. A proteômica examina o perfil de expressão geral de uma célula, tecido ou órgão, não sendo possível identificar proteínas pouco abundantes ou proteínas de membrana utilizando géis de eletroforese bidimensional. Pode-se utilizar a análise proteômica como uma ferramenta de projeção para gerar um “conjunto de candidatas” para estudos futuros e análise das funções que utilizem métodos convencionais (THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004). A importância de estudos proteômicos na pesquisa biomédica pode ser entendida quando se observam os diferentes estágios do ciclo de vida em insetos. Com os mesmos genes, o inseto tem diferentes morfologias em estágios distintos de seu ciclo vital. As distinções morfológicas que acompanham as diferentes funções celulares e das

organelas são diretamente determinadas por uma variação no proteoma, e não pelo genoma, pois o proteoma pode ser alterado por várias modificações pós-traducionais (KLEIN e THONGBOONKERD, 2004).

Em adição, a expressão de proteínas pode ser identificada em fluidos corporais, na ausência de material celular. Uma vantagem particular do proteoma é que não apenas tecidos, mas também fluidos corporais como o plasma, a urina e a saliva, podem ser utilizados para investigar a correlação molecular de doenças e a ação da droga. Isto é possível porque muitas proteínas, diferente do RNAm, são secretadas em perfis que variam previsivelmente com o estado fisiológico (KENNEDY, 2002). A evolução do proteoma de fluidos corporais pode ter um valor particular na procura de biomarcadores não invasivos.

Assim, a análise proteômica pode ser útil para detectar mudanças na expressão de proteínas em resposta aos diversos tipos de estímulos fisiológicos e patofisiológicos, detecção de biomarcadores de doença nos fluidos corporais, pesquisas de câncer, estudos farmacêuticos e toxicológicos (ARTHUR, THONGBOONKERD, SCHERZER *et al.*, 2002; KENNEDY, 2002; KNEPPER, 2002; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004).

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

Uma análise proteômica começa com a extração de proteínas (THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004; KHAN e PACKER, 2006; THONGBOONKERD, CHUTIPONGTANATE e KANLAYA, 2006), seguida de sua separação, através de métodos que utilizem gel (2D-PAGE) ou não (cromatografia líquida). As proteínas separadas são então identificadas por espectrometria de massa (MS) combinada com ferramentas de bioinformática (WESTEMEIER e NAVEN, 2002; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004)

2.4.1 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional aplicada à proteômica foi primeiramente descrita por O'Farrell (1975) em análise de proteínas de *Escherichia coli*. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, as proteínas solúveis são

separadas por um procedimento denominado focalização isoelétrica (IEF), que se baseia no fato de cargas líquidas de uma molécula de proteína variarem com o pH do meio ou solução em que estas se encontram. Para qualquer proteína existe um pH característico, denominado ponto isoelétrico, no qual a proteína não apresenta carga líquida e, portanto, não migrará em um campo elétrico. Na segunda dimensão, o gel contendo as proteínas separadas é novamente sujeito a outra eletroforese, onde as proteínas migram de acordo com seu peso molecular (PM). O SDS (dodecil sulfato de sódio), um detergente forte e carregado negativamente, é adicionado e se liga às regiões hidrofóbicas das moléculas de proteínas, que passam a ter uma carga negativa, o que facilita sua migração durante a eletroforese. As proteínas são separadas de acordo com seu *pI*, usando focalização isoelétrica na primeira dimensão e de acordo com seu PM, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) na segunda dimensão, resultando em um único ponto para cada proteína (Figura 1).

A eletroforese bidimensional tem sido utilizada para estabelecer mapas-padrão de células, tecidos, órgãos e modelos de desenvolvimento (WITZMANN, FULTZ, GRANT *et al.*, 1998; ARTHUR, THONGBOONKERD, SCHERZER *et al.*, 2002), como também em análise diferencial, comparando produtos protéicos produzidos por células expostas a diferentes condições biológicas (XU, HU, CHANG *et al.*, 2005; NGAI, SIT, JIANG *et al.*, 2006; THONGBOONKERD, CHUTIPONGTANATE e KANLAYA, 2006)

Sua grande vantagem em relação a outras metodologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra biológica complexa, de uma forma reprodutível, e a possibilidade de se fazer análises de expressão gênica por meio da comparação dos padrões protéicos. Assim, a eletroforese 2D é uma técnica quantitativa e qualitativa (SANTOS, TEIXEIRA e SÁ-CORREIA, 2004).

Entretanto, apesar da grande evolução das técnicas, é muito difícil obter a visualização em um único gel de todas as proteínas expressas em um tecido complexo como de organismos pluricelulares. Ainda hoje, existem limitações na solubilização de proteínas da membrana, de uma forma compatível com uma separação apropriada para eletroforese 2D, o que não acontece no caso das proteínas citosólicas. Estas limitações estão relacionadas com o tipo de detergentes que podem ser utilizados em 2D e que solubilizem eficientemente as espécies

protéicas mais hidrofóbicas (HEBERT e HARRY, 2001; KNEPPER, 2002; KLEIN, KLEIN e THONGBOONKERD, 2004; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004; SANTOS, TEIXEIRA e SÁ-CORREIA, 2004).

Por outro lado, existe uma grande discrepância em termos da abundância das várias proteínas presentes numa célula. Em geral, quanto menor for a concentração de uma proteína, mais difícil é a sua visualização nos géis, quer devido aos limites dos métodos de detecção, quer em decorrência da possível sobreposição de proteínas muito ou mais abundantes, que apresentem pesos moleculares e pIs semelhantes (HEBERT e HARRY, 2001; KNEPPER, 2002; SANTOS, TEIXEIRA e SÁ-CORREIA, 2004). Proteínas com pesos moleculares muito altos ou muito baixos também não são bem separadas na eletroforese 2D (KNEPPER, 2002). A proteômica convencional restringe-se em analisar proteínas com massa molecular maior que 10 kDa (KENNEDY, 2002).

Um grande passo no uso da eletroforese 2D ocorreu com o progresso nas técnicas analíticas de detecção e identificação. Após a separação, as proteínas podem ser visualizadas no próprio gel por métodos de coloração como o azul brilhante de *Coomassie*, nitrato de prata, compostos fluorescentes, autoradiografia ou detecção com imunoquímicos (WESTEMEIER e NAVEN, 2002; KLEIN e THONGBOONKERD, 2004; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004; SANTOS, TEIXEIRA e SÁ-CORREIA, 2004).

O método ideal de coloração deve ser sensível para detectar concentrações extremamente baixas de proteínas, ter uma faixa dinâmica de detecção, linearidade, reprodutibilidade entre experimentos e compatibilidade com métodos de identificação (WESTEMEIER e NAVEN, 2002; KLEIN e THONGBOONKERD, 2004; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004)

Provavelmente, os métodos de coloração mais populares são os que utilizam azul de *Coomassie* ou nitrato de prata (CANDIANO, BRUSCHI, MUSANTE *et al.*, 2004) Embora não se possa negar que a prata seja muito mais sensível que o *Coomassie*, muitos cientistas que trabalham com análise proteômica diferencial e quantitativa preferem os corantes orgânicos da família do *Coomassie*. Isso se deve ao fato de que a menor sensibilidade do *Coomassie* é compensada amplamente pela maior reprodutibilidade, pois, ao contrário da prata, possui protocolos mais simples com menor chance de erros (CANDIANO, BRUSCHI, MUSANTE *et al.*, 2004). Outra vantagem da coloração com *Coomassie* é que o mesmo não interfere

na análise por espectrometria de massa dos *spots* de proteínas visualizados (KLEIN e THONGBOONKERD, 2004; THONGBOONKERD, KLEIN e KLEIN, 2004).

Figura 1 - Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI (primeira dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliácridamida onde são separadas de acordo com o PM (segunda dimensão).

2.5 O PROTEOMA APLICADO EM ESTUDOS DE TOXICOLOGIA DO FLUORETO

A utilização da proteômica para avaliar a toxicidade do fluoreto é algo extremamente recente na literatura.

A fim de investigar o perfil de proteínas renais após tratamento com flúor, Xu et al. (2005), trataram ratos *wistar* machos por 8 semanas com água de beber contendo 100 ppm de flúor. Foram encontrados 141 *spots* protéicos com expressão aumentada e 8 com expressão diminuída nos géis 2D do grupo tratado, quando comparado ao controle. Treze destes *spots* foram identificados por espectrometria de massa, tendo-se encontrado proteínas envolvidas com proliferação celular, metabolismo e estresse oxidativo. Este trabalho mostrou que a proteômica é uma importante ferramenta no campo da toxicologia do fluoreto. Com o intuito de investigar os processos moleculares envolvidos na fluorose esquelética esse mesmo grupo avaliou as possíveis alterações que o fluoreto poderia causar em osteoblastos *in vitro*. Para isso, células da calvária foram expostas a 2 ppm de fluoreto de sódio por 72 h. As proteínas dos osteoblastos foram extraídas, submetidas a eletroforese

bidimensional e identificação por espectrometria de massa. A análise revelou que dos 493 *spots* presentes, 28 mostraram-se diferencialmente expressos. Dos 28 *spots*, 12 foram identificados. As proteínas identificadas foram associadas à proliferação e metabolismo celular, e no dobramento oxidativo de proteínas (XU, HU, CHANG *et al.*, 2005)

Kobayashi et al (2009) avaliaram a expressão diferencial de proteínas renais em ratos submetidos a tratamento crônico com fluoreto. Os animais ingeriram água contendo 5 ou 50 ppm F. A análise proteômica demonstrou alteração em 30 *spots* no grupo de 50 ppm F quando comparado ao controle, e 17 *spots* no grupo de 5 ppm F também quando comparado ao controle. As proteínas identificadas estão relacionadas principalmente ao metabolismo, desintoxicação e *housekeeping*. Esses dados indicam que a análise proteômica de rim de animais tratados com fluoreto é capaz de identificar proteínas diferencialmente expressas, mesmo em casos de baixas doses de fluoreto. Assim, essa ferramenta pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fluorose, apontando proteínas-chave que deveriam ser melhor investigadas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos gerais deste estudo foram:

- Analisar o metabolismo do F^- em duas linhagens de camundongos com diferente suscetibilidade à fluorose dentária, submetidas a diferentes concentrações de F^- na água de beber;
- Detectar a expressão diferencial de proteínas no extrato renal e urina de duas linhagens de camundongos com diferente suscetibilidade à fluorose dentária, submetidas a diferentes concentrações de F^- na água de beber.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE METABÓLICA

4.1.1 Obtenção dos animais

Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética no ensino e Pesquisas em Animais da FOB-USP, processo 026/2007 (Anexo - A)

Foram utilizados camundongos machos representantes das linhagens 129P3/J e A/J, obtidos do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME) após o desmame (três semanas). A razão da seleção destas duas linhagens é baseada no fato de que a linhagem de camundongos A/J é altamente suscetível à fluorose dentária com um rápido e severo desenvolvimento da doença, enquanto a linhagem 129P3/J é menos afetada, com baixo índice de fluorose dentária (EVERETT, MCHENRY, REYNOLDS *et al.*, 2002). Todos os camundongos permaneceram no biotério do *Medical College of Georgia* (Augusta-GA-USA), em gaiolas metabólicas plásticas, em dupla. As gaiolas são equipadas com copos secundários onde foram coletadas a água e a ração derramadas, com um aumento da exatidão dos dados da ingestão (Figura 2). A temperatura e a umidade foram controladas. Foi mantido um ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura de $23\pm1^{\circ}\text{C}$ e umidade de 40-80%. Os animais receberam ração com $1\text{ }\mu\text{g/g}$ de F^{-} (AIN 76A, PMI Nutrition, Richmond, IN, EUA) .

Figura 2 - Gaiolas metabólicas utilizadas para a coleta de fezes e urina, bem como controle do consumo de ração e água.

4.1.2 Tratamento dos animais

Os animais receberam 0 (controle), 10 e 50 ppm F na água de beber, com a utilização de F^- de sódio (NaF). As águas com F^- foram preparadas no laboratório de bioquímica do *Medical College of Georgia* e foram analisadas para a concentração de F^- ($[F^-]$). Cada grupo de tratamento, ou seja, grupo controle, grupo que recebeu baixa $[F^-]$ e grupo que recebeu alta $[F^-]$, consistiu em 12 animais (sendo 6 da linhagem 129P3/J e 6 da linhagem A/J).

Nas primeiras duas semanas, observou-se que a linhagem A/J ingeria uma quantidade significativamente maior de água quando comparada com a linhagem 129P3/J (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de água ingerida (g) em 48 h nas duas primeiras semanas anteriores ao estudo metabólico.

Água ingerida (g) 1 ^{as} duas semanas	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa $[F^-]$	Alta $[F^-]$
A/J ^A	15,77±0,52 ^a	11,34±0,69 ^b	14,91±0,53 ^a
129P3/J ^B	7,22±0,39 ^a	7,77±0,65 ^a	7,58±0,55 ^a

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens. Letras minúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Optou-se então por diminuir a $[F^-]$ na água fornecida à linhagem A/J, a fim de que todos os animais tivessem ingestão de F^- semelhante. Para isto, considerava-se a média de ingestão de água dos animais da linhagem A/J, bem como a média dos animais da linhagem 129P3/J. A partir da média ingerida pelas duas linhagens calculava-se a razão entre elas para definir qual deveria ser a $[F^-]$ presente na água fornecida aos animais da linhagem A/J, a fim de que a quantidade de F^- ingerida por eles fosse similar àquela ingerida pelos animais da linhagem 129P3/J, considerando-se as $[F^-]$ isoladamente (alta e baixa). O peso dos animais, a ração e a quantidade de água ingerida foram determinados semanalmente durante todo o período experimental. A cada semana, de acordo com a quantidade de água ingerida, a $[F^-]$ na água fornecida na semana seguinte à linhagem A/J era modificada ou não (Tabela 2). Foi observado durante a quarta semana que os animais de uma gaiola da linhagem A/J (gaiola 9) do grupo de tratamento de baixa $[F^-]$ ingeriam uma

quantidade de água muito maior que os das outras duas gaiolas do mesmo grupo. Por este motivo, optou-se por modificar a $[F^-]$ a ser adicionada à água desta gaiola durante as cinco semanas posteriores (Tabela 3). A linhagem 129P3/J permaneceu com o mesmo padrão de ingestão de água durante todo o estudo (Tabela 4).

Tabela 2 - Média da quantidade de água ingerida pela linhagem A/J para os grupos de tratamento de baixa e alta $[F^-]$ e $[F^-]$ na água de beber ajustada, durante as sete semanas de estudo metabólico.

	Grupo tratamento	Quantidade de água ingerida (g/48h)	$[F^-]$ na água de beber (ppm)
Semanas			
1^a	Baixa $[F^-]$	12,82	6,7
	Alta $[F^-]$	13,59	25,0
2^a	Baixa $[F^-]$	13,61	6,7
	Alta $[F^-]$	13,47	25,0
3^a	Baixa $[F^-]$	10,01	6,7
	Alta $[F^-]$	11,82	30,0
4^a	Baixa $[F^-]$	9,68	8,0
	Alta $[F^-]$	11,59	30,0
5^a	Baixa $[F^-]$	10,61	8,0
	Alta $[F^-]$	11,31	30,0
6^a	Baixa $[F^-]$	10,90	8,0
	Alta $[F^-]$	11,61	30,0
7^a	Baixa $[F^-]$	11,83	8,0
	Alta $[F^-]$	11,73	30,0

Tabela 3 - Quantidade de água ingerida pelos animais da gaiola 9 da linhagem A/J (n=2), grupo de tratamento com baixa $[F^-]$, e $[F^-]$ na água de beber ajustada, durante cinco semanas de estudo metabólico.

	Grupo tratamento	Quantidade de água ingerida (g/48h)	$[F^-]$ na água de beber (ppm)
Semanas			
3^a	Baixa $[F^-]$	29,61	3,5
4^a	Baixa $[F^-]$	19,43	2,7
5^a	Baixa $[F^-]$	21,15	4,0
6^a	Baixa $[F^-]$	20,39	4,0
7^a	Baixa $[F^-]$	30,23	4,0

Tabela 4 - Média da quantidade de água ingerida pela linhagem 129P3/J para os grupos de tratamento de baixa e alta $[F^-]$ e $[F^-]$ na água de beber durante as sete semanas de estudo metabólico.

	Grupo tratamento	Quantidade de água ingerida (g/48h)	$[F^-]$ na água de beber (ppm)
Semanas			
1^a	Baixa $[F^-]$	7,36	10,0
	Alta $[F^-]$	7,37	50,0
2^a	Baixa $[F^-]$	8,21	10,0
	Alta $[F^-]$	7,94	50,0
3^a	Baixa $[F^-]$	8,01	10,0
	Alta $[F^-]$	7,02	50,0
4^a	Baixa $[F^-]$	7,86	10,0
	Alta $[F^-]$	7,44	50,0
5^a	Baixa $[F^-]$	7,65	10,0
	Alta $[F^-]$	7,54	50,0
6^a	Baixa $[F^-]$	7,70	10,0
	Alta $[F^-]$	7,78	50,0
7^a	Baixa $[F^-]$	8,09	10,0
	Alta $[F^-]$	7,91	50,0

Uma vez por semana, foram coletadas a urina e as fezes de 48 horas para a análise de F^- e para a obtenção dos dados de absorção e retenção de F^- . Para determinar a absorção e retenção de F^- , as seguintes equações foram utilizadas: absorção = quantidade de F^- ingerida – quantidade de F^- excretada pelas fezes; retenção = quantidade de F^- ingerida – quantidade total de F^- excretada (urina e fezes).

4.1.3 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (Dopalen-Vetbrands) e xilazina (Anasedan - Vetbrands) conforme o peso, de acordo com a indicação do fabricante. A cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, o coração foi puncionado com agulha e seringa heparinizada, o sangue coletado em tubo plástico (tipo *Eppendorf*), e imediatamente centrifugado a 3500 rpm por 10 min (*Eppendorf 5415 C*) para obtenção do plasma. Alíquotas de aproximadamente 250 μ L foram estocadas a -80°C .

Os rins de cada camundongo foram dissecados e a cápsula foi removida. Foram lavados com tampão gelado (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4) e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Todos os rins foram armazenados a -80°C para posterior análise proteômica e de F^{-} .

Foi coletado um volume aproximado de 1 mL de urina (12 horas de coleta) 24 horas antes do sacrifício. As amostras de urina foram coletadas em 200 μL de um coquetel contendo inibidores de proteases (Complete, Roche) dentro de caixas de isopor contendo gelo e congeladas a -80°C para posterior análise proteômica, conforme escrito adiante.

4.1.4 Avaliação clínica de fluorose dentária

Após a eutanásia, as cabeças dos animais foram removidas e enviadas para o laboratório do Prof. Eric Everett, na Universidade de North Carolina (Chapel Hill), onde dois examinadores (ETE e DY), cegos para a linhagem dos animais e para o tratamento do grupo, fizeram individualmente exame de fluorose dentária. A determinação da fluorose dentária foi feita clinicamente em toda a superfície dos incisivos inferiores, de acordo com o índice TF modificado (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação das características da aparência clínica do esmalte dos incisivos fluoróticos em camundongos como modificado por Thylstrup and Fejerskov*.

TF 0	A translucidez do esmalte permanece normal após a superfície dentária ser limpa e seca.
TF 1	Finas linhas brancas opacas são vistas percorrendo a superfície dentária. As linhas são encontradas em toda a superfície. As linhas correspondem à posição das periquemácias.
TF 2	As linhas brancas opacas são mais pronunciadas e frequentemente se fundem para formar pequenas áreas nebulosas espalhadas por toda a superfície.
TF 3	Ocorre a fusão das linhas brancas e as áreas de opacidade espalham sobre muitas partes da superfície. Entre as áreas nebulosas, linhas brancas podem também serem vistas.
TF 4	Toda a superfície exibe uma opacidade marcada ou parece giz branco. Partes da superfície exposta ao atrito ou desgaste podem parecer menos afetadas.

* (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1978; FEJERSKOV, LARSEN, RICHARDS *et al.*, 1994)

4.1.5 Avaliação de fluorose dentária por fluorescência quantitativa

Foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Eric Everett, na Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, NC, EUA.

A medida da fluorescência é uma modificação do sistema de fluorescência induzida por luz quantitativa (QLF), que tem sido usada para medir a severidade da fluorose em camundongos (EVERETT, MCHENRY, REYNOLDS *et al.*, 2002). O QLF tem sido usado no diagnóstico de cáries (ANGMAR-MANSSON, AL-KHATEEB e TRANAEUS, 1996). Há 20 anos, foi relatado que o fenômeno de fluorescência dos dentes poderia ser utilizado para se detectar lesões de cárie em dentes extraídos, nos quais a área da lesão aparecia como uma região escurecida circundada por uma estrutura sadia mais brilhante (BJELKHAGEN, SUNDSTROM, ANGMAR-MANSSON *et al.*, 1982). Examinando-se o espectro de fluorescência nos dentes humanos, foi observado que se a estrutura dentária fosse iluminada com laser de argônio em um comprimento de onda de 488 nm, o pico de fluorescência dos dentes era a 540 nm (SUNDSTROM, FREDRIKSSON, MONTAN *et al.*, 1985). Com base nesses achados, desenvolveu-se um equipamento para medir a quantidade de fluorescência com o propósito de detectar e quantificar lesões cariosas (SUNDSTROM, HAFSTROM-BJORKMAN, STROM *et al.*, 1989; DE JOSSELIN DE JONG, SUNDSTROM, WESTERLING *et al.*, 1995). O equipamento usava um laser de argônio como fonte de luz e uma câmera CCD para capturar uma imagem da luz fluorescente que retornava do dente, a qual era filtrada por um filtro de passagem larga de 520 nm. Posteriormente, o laser foi substituído por uma lâmpada em arco que emitia luz em torno de 380 nm (LAGERWEIJ, VAN DER VEEN, ANDO *et al.*, 1999).

No presente trabalho, foi empregada uma modificação dessa técnica, onde o *hardware* da Inspektor foi substituído por um microscópio de epifluorescência equipado com um conjunto de cubos Chroma Gold 11006v2 (excitador D360/40x, dicróico 400DCLP, e emissor E515LPv2). Os incisivos inferiores foram removidos da mandíbula e deixados levemente umedecidos. Os dentes foram analisados com o lado vestibular virado para cima sobre um fundo preto, num aumento de 2X. Foram adquiridas imagens tiff de 12 megapixels sob condições padrão de exposição. As imagens foram analisadas usando o Image J versão 1.33u (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Em resumo, dez áreas de 300 x 300 pixels foram posicionadas ao acaso sobre o par

de incisivos inferiores e os valores de escalas de cinza médios para cada quadrado foram determinados. A medida dos valores de escala de cinza para todas as 10 regiões foram então determinadas.

4.1.6 Dosagens de fluoreto

4.1.6.1 Dosagem de fluoreto no plasma

Para a análise do F^- no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico saturado com hexametildisiloxano (HMDS), num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F^- residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO_2 , o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por Taves (1968) e modificado por Whitford (1996). Na tampa destas placas, foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite.

No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota, contendo todo o F^- foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F^- da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F^- pelo eletrodo sensível, que é de $0,02 \mu\text{g/mL}$, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de $0,075 \text{ mL}$, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F^- acima de $0,0015 \mu\text{g}$. Considerando que os níveis de F^- plasmáticos geralmente giram em torno de $0,5\text{-}1,0 \mu\text{mol/L}$ ($0,0095\text{-}0,019 \mu\text{g/mL}$), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F^- de $0,0095\text{-}0,019 \mu\text{g}$, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo.

Para validação da análise de F^- , as soluções-padrão (contendo $0,00475$, $0,0095$, $0,019$, $0,095$ e $0,19 \mu\text{g F}$) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo $0,1 \text{ M F}$ (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma a serem analisadas. Foi feita uma primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV) foram convertidas para μg de F^- , através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F^- medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções ($\text{NaOH } 0,05 \text{ M}$ e ácido acético $0,20 \text{ M}$) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de F^- que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F^- nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Foi feita também uma sequência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV foram as mesmas tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

4.1.6.2 *Dosagem de fluoreto nas fezes*

As fezes foram secas em estufa ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) e pesadas para se determinar o peso seco das amostras. As amostras foram colocadas em tubos plásticos e adicionaram-se volumes de água deionizada que variaram de acordo com o volume das fezes (em média 3 mL por g de fezes). As amostras foram então homogeneizadas (Homogenizador Marconi, modelo MA 102) até que adquirissem consistência pastosa. A análise foi feita em duplicata, por difusão facilitada por HMDS, como realizada para o plasma, com exceção da pré-difusão. As figuras 3, 4, 5 e 6 demonstram a dosagem de F^{-} nas fezes por esse método.

Figura 3 - Placa de Petri vaselinada. Adição das amostras de fezes.

Figura 4 - Adição de 2 mL de água deionizada e 50 μ L de NaOH 0,05 M na tampa da placa de Petri.

Figura 5 - Fechamento das placas e adição de 2 mL de HMDS.

Figura 6 - Eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo calomelano de referência para leitura de F^- .

4.1.6.3 Dosagem de fluoreto no fêmur

Os fêmures foram pesados e levados para calcinação em um forno tipo mufla a 600°C *overnight*. As cinzas foram pesadas e pulverizadas com pistilo. Após virarem pó, foram pesadas alíquotas de 4-5 mg para análise do F⁻ pelo método de difusão facilitada por HMDS, conforme descrito para o plasma, exceto pela pré-difusão e pelos padrões empregados na realização da curva de calibração (1,9; 3,8; 19 e 38 µg F).

4.1.6.4 Dosagem de fluoreto no rim

Após pesado, o rim foi homogeneizado em água deionizada, utilizando o Homogenizador Marconi, modelo MA 102. A homogenização foi conduzida por 2 minutos. Para análise de F⁻ no rim, foi utilizado um volume da amostra correspondente a 100 mg de tecido renal. Esse volume foi pipetado em uma placa de Petri (Falcon 1007) e submetido à difusão facilitada por HMDS. A curva de calibração foi feita com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,00475, 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 µg F.

4.1.6.5 Dosagem de fluoreto na urina e na água

A concentração de F⁻ presente na urina e na água de beber foram determinadas em duplicata, usando-se o eletrodo Orion 9609 após serem tamponadas com um volume idêntico de TISAB II (Tampão de ajuste da força iônica total), contendo CDTA (ácido ciclo-hexano diamino tetracético) 0,4%, pH 5,0. As amostras de urina foram deixadas à temperatura ambiente para descongelar durante a noite anterior à dosagem.

A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação da análise de F⁻ no plasma. Foi feita uma curva de calibração com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 µg F.

4.1.7 Análise estatística do estudo metabólico

Foram utilizados os softwares *Graph Pad Prism* versão 4.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, EUA) e SPSS versão 11.0 para Windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, IL, EUA).

Inicialmente foram checadas a normalidade (Teste de *Kolmogorov, Smirnov*) e a homogeneidade (teste de *Bartlett*) dos dados. Satisfeitos esses critérios, os dados da quantidade de F^- ingerida, excretada, absorvida e retida e a $[F^-]$ no fêmur e no plasma foram analisados por ANOVA a dois critérios (linhagem e tratamento) e pelo teste Bonferroni para a comparação individual.

As comparações entre a quantidade de F^- ingerida e excretada nas sete semanas foram feitas por ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste Bonferroni para as linhagens A/J e 129P3/J, isoladamente. Os critérios utilizados foram tempo e tratamento.

Para análise das variáveis ordinais referentes aos dados do exame clínico, foi usado o teste de correlação de *Spearman* para analisar as diferenças entre as linhagens e os tratamentos.

O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.2.1 Preparo das amostras

Para a obtenção de géis de boa qualidade, o preparo da amostra deve resultar na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas presentes na amostra.

4.2.1.1 Extração de proteínas do rim

As amostras foram pesadas, transferidas individualmente para um cadinho contendo nitrogênio líquido e moídas com auxílio de um pistilo (Figura 7). A baixa temperatura proporcionada pelo nitrogênio líquido previne a degradação de

componentes da amostra e ao final do processo, amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo são obtidas.

Figura 7 - Homogeneização do tecido renal em N₂ para posterior extração das proteínas.

Após homogeneização do tecido, adicionou-se um tampão de extração (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4 % de CHAPS, 1 % de DTT e 0,5 % de anfólitos carreadores pH 3-10) baseado na recomendação do *handbook* da GE (GE Healthcare, 2004). A essa formulação foi adicionado um coquetel contendo inibidores de protease (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) no momento do uso. Após 1 hora de incubação em gelo, misturando ocasionalmente, o homogenato foi centrifugado a 25.000 x g por 30 min a 4°C (Sorvall, modelo Superspeed RC2-B) e o sobrenadante coletado.

Com o intuito de remover o excesso de sais e outros contaminantes que pudessem resultar em géis de baixa qualidade utilizou-se o kit *PlusOne 2D Clean-up* (GE Healthcare), que contém agentes precipitantes e co-precipitantes os quais auxiliam na limpeza da amostra. Foi utilizado um volume de amostra de 200 µL, seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante.

Depois de realizada a precipitação e limpeza das amostras, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 µL de solução de reidratação contendo 8 M de uréia, 0,5 % de CHAPS, 10 % de glicerol, 0,5 % de anfólitos carreadores pH 3-10 e 0,002 % de azul de bromofenol, e no momento do uso, foram adicionados 7 mg de DTT para cada 2,5 mL de tampão de reidratação, como recomendado pelo *handbook* da GE.(GEHEALTHCARE, 2004).

Para cada linhagem de camundongos foram realizados três *pools* dos homogenatos renais de seis animais, obtendo-se três amostras (grupo controle, baixa $[F^-]$ e alta $[F^-]$) da linhagem A/J e três amostras da linhagem 129P3/J.

4.2.1.2 Extração de proteínas da urina

Utilizando o método descrito por Havanapan e Thongboonkerd (2009) para extração de proteínas urinárias, as amostras de urina foram clarificadas, centrifugando-se a 1500 x g por 5 minutos a 4°C (Sorvall, USA). Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com etanol a 75% por 10 minutos a 4°C, utilizando a proporção urina:solvente de 1:5. Após esse período, centrifugou-se a 4000 x g por 40 min a 4°C (Sorvall, USA). Cada *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de tampão de reidratação contendo 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2 % de CHAPS, 0,5 % de IPG buffer pH 3-10 e 0,002 % de azul de bromofenol. Foram adicionados 7 mg de DTT para cada 2,5 mL de tampão de reidratação no momento do uso, como recomendado pelo *handbook* (GE Healthcare, 2004). Foi feito um *pool* de cada três precipitados urinários ressuspensos, obtendo-se seis amostras, uma de cada grupo de tratamento para as duas linhagens de camundongos. As amostras foram submetidas à filtração centrífuga, utilizando um tubo de filtração *amicon ultra 4 centrifugal filter device* (*ultracel* 3K, Millipore) com a finalidade de remover o sal e concentrar a amostra. Centrifugou-se a 14.000 x g a 20°C até que o volume fosse reduzido de 300 µL para 50 µL. Foram adicionados mais 500 µL de tampão de reidratação e repetiu-se o passo anterior, obtendo-se novamente 50 µL de solução protéica. Esse passo foi repetido por 5 vezes.

4.2.2 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas em triplicata pelo método de Bradford (1976) utilizando-se o kit *Biorad Protein Assay* (Biorad). Alíquotas de 2,0 µL de amostra de tecido renal e 1,0 µL de amostra de urina, juntamente com 1,0 mL do reagente de coloração, foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Suas absorbâncias foram determinadas a 595 nm em um espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). As concentrações protéicas foram calculadas através da comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de

albumina de soro bovino (BSA). As concentrações de proteína (em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) encontradas para cada amostra de tecido renal e urina estão demonstradas na terceira coluna das tabelas 5 e 6.

Tabela 6 - Dosagem de proteínas do homogenato renal e volume de amostra utilizado para obtenção do *pool* das linhagens A/J e 129P3/J.

Grupos	$A^{595\text{ nm}}$	[proteína]	Vol. (μL) equivalente a
A/J		$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1000 μg
Controle	1,142	38,62	52,16
Baixa [F ⁻]	1,073	35,84	56,05
Alta [F ⁻]	1,048	34,85	57,63
129P3/J			
Controle	1,040	34,57	58,97
Baixa [F ⁻]	1,037	34,39	58,64
Alta [F ⁻]	0,992	32,58	61,89

Tabela 7 - Dosagem de proteínas da urina e volume de amostra utilizado para obtenção do *pool* das linhagens A/J e 129P3/J.

Grupos	$A^{595\text{ nm}}$	[proteína]	Vol. (μL) equivalente a
A/J		$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	700 μg
Controle	0,995	33,12	21,1
Baixa [F ⁻]	1,076	36,14	19,4
Alta [F ⁻]	0,716	22,72	30,8
129P3/J			
Controle	1,225	41,73	16,8
Baixa [F ⁻]	1,309	44,87	15,6
Alta [F ⁻]	1,318	45,20	15,5

4.2.3 Eletroforese bidimensional

4.2.3.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (GE Healthcare) (Figura 8). A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com fitas IPG de 24 cm e gradiente de pH 3-10 para as amostras de rim e fitas IPG de 13 cm e gradiente de pH 4-7 para as amostras de urina.

As fitas IPG foram reidratadas durante 15 h a 20°C em 400 µL de solução de reidratação [7 M uréia; 2 M tiouréia; 2 % (v/v) CHAPS; 10 mM DTT; 0,5 % anfólitos e 0,002 % (p/v) azul de bromofenol] contendo aproximadamente 1000 µg de proteínas renais e em 250 µL da mesma solução de reidratação contendo aproximadamente 700 µg de proteínas urinárias. Sobre as fitas IPG acrescentaram-se 3 mL de óleo mineral (*Cover Fluid*, GE Healthcare) para evitar evaporação dos reagentes durante a reidratação.

A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 10000 V até atingir 40000 V.

Figura 8 - Focalização isoelétrica no Ettan IPGphor 3 e o *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (GE Healthcare).

4.2.3.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Após a focalização isoeétrica, as fitas IPG foram lavadas com água deionizada e mantidas por 15 minutos em tampão de equilíbrio [6M Uréia; 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 30% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS; 0,002% de azul de bromofenol] contendo 1 % (p/v) DTT (reductor). Em seguida, as fitas foram transferidas e mantidas por 15 minutos em solução de alquilação, que consiste no mesmo tampão de equilíbrio contendo 2,5 % (p/v) de iodoacetamida.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical homogêneo de 12,5% (p/v) de acrilamida (255 mm X 200 mm X 1,5 mm). Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas, as fitas foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida. A separação das proteínas foi conduzida no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare) a 20°C (Figura 9). Foi feita uma pré-corrida com 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 h, para migração das proteínas da fita IPG para o gel, e em seguida uma corrida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel.

Figura 9 - Segunda dimensão no sistema *Ettan DALTsix* (GE-Healthcare).

4.2.4 Visualização e análise de imagens da eletroforese bidimensional

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (CANDIANO, BRUSCHI, MUSANTE *et al.*, 2004). Para isso, ao fim

da corrida, os géis foram colocados em solução fixadora contendo 1,3 % de ácido fosfórico e 20 % de metanol durante 60 minutos, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e lavar os anfólitos. Então, foram lavados com água deionizada e deixados por 24 horas em solução de coloração contendo 10 % de ácido fosfórico, 10 % de sulfato de amônio, 0,12 % de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20 % de metanol. Depois de corados, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 7%.

Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan 6.0* (GE Healthcare) no *ImageScannerTM III* (GE Healthcare). Para a análise das imagens, foi adotado o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare).

A detecção dos *spots* e a determinação de seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros para os géis de rim: *smooth* = 4, área mínima = 5 e saliência = 100. Para os géis de urina os parâmetros utilizados para a detecção dos *spots* foram: área mínima = 5, fator *smooth* = 4 e saliência = 50.

Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o *match gels*, uma comparação entre os *spots* das réplicas de cada grupo. Após esse passo, foram realizadas correções com a adição e remoção manual dos *spots*. Após as correções, foi realizada a análise de classes que identifica a diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%

Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*.

4.2.5 Preparo das amostras para espectrometria de massa

Após análise no *ImageMaster 2D Platinum*, os *spots* selecionados foram excisados utilizando ponteiros de 1000 µL e 200 µL (cortadas em diferentes alturas para a obtenção de diferentes diâmetros). Os *spots* excisados foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ (Figura 10), transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% e armazenados a 4 °C até o passo seguinte.

Figura 10 - Excisão e recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa.

Para a remoção do corante, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min e desidratados, duas vezes, em 100% ACN por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 56°C por 40 min e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 min. A IAA foi removida, os fragmentos foram lavados em 25 mM AMBIC e em seguida desidratados em 100% de ACN. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega) em 25 mM de AMBIC por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37°C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (50% v/v ACN e 5% v/v ácido fórmico). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (50% v/v ACN e 1% v/v ácido fórmico), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (60% v/v metanol e 1% v/v ácido fórmico) e

mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em um ultra-som de banho (Branson, modelo 2510). A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em um concentrador centrífugo a vácuo (Eppendorff) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então armazenadas a -20 °C.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO METABÓLICO

5.1.1 Peso do rim

A figura 11 mostra a comparação entre o peso dos rins dos animais das linhagens A/J e 129P3/J nos diferentes grupos de tratamento. A ANOVA a dois critérios com medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa entre as linhagens ($F=0,187$ e $p=0,668$) nem entre os tratamentos ($F=0,812$ e $p=0,445$). Não houve interação significativa entre os dois critérios ($F=1,938$ e $p=0,166$).

Figura 11 - Peso dos rins (g) dos animais das linhagens A/J e 129P3/J em função da [F] na água de beber. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre as linhagens. (ANOVA a dois critérios, $p<0,05$).

5.1.2 Peso corporal dos animais

Quando se comparou a média do peso corporal dos animais, a ANOVA a dois critérios mostrou diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($F=78,51$ e $p<0,0001$) e entre os tratamentos ($F=4,622$ e $p=0,0107$). Houve interação entre os critérios ($F=13,70$, $p<0,0001$). Os animais da linhagem 129P3/J dos grupos controle e de alta [F] apresentaram um peso corporal significativamente menor que os animais da linhagem A/J. Já para o grupo de baixa [F], não houve diferença significativa entre as linhagens (Figura 12).

Figura 12 - Peso corporal (g) dos animais das linhagens A/J e 129P3/J em função da [F] na água de beber. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre as linhagens. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$).

As figuras 13 e 14 mostram o perfil do crescimento dos animais durante o estudo para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre os tratamentos ($F=0,894$, $p=0,429$), mas houve diferença entre as semanas ($F=256,5$, $p < 0,0001$) e interação significativa entre esses dois critérios ($F=3,828$, $p=0,0001$). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou uma diferença significativa entre os tratamentos ($F=4,351$, $p=0,032$) e entre as semanas ($F=197,4$, $p < 0,0001$) mas não houve interação significativa entre os dois critérios ($F=0,878$, $p=0,571$).

Figura 13 - Média do peso corporal durante 7 semanas da linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 14 - Média do peso corporal durante 7 semanas da linhagem 129P3/J. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

5.1.3 Ingestão de água

A tabela 8 mostra a média de ingestão de água (g) nas duas primeiras semanas anteriores ao início do estudo metabólico, assim como durante o estudo metabólico (nas sete semanas subsequentes). Durante o estudo metabólico, a ANOVA a dois critérios detectou diferença significativa entre as linhagens ($F=109,4$, $p<0,0001$), mas não entre os tratamentos ($F=2,749$, $p=0,068$). A interação não foi significativa ($F=2,363$, $p=0,099$). A linhagem A/J ingeriu significativamente mais água quando comparada com a 129P3/J ($p<0,001$). Para a linhagem A/J que ingeriu água com baixa $[F^-]$ observamos que nas duas primeiras semanas anteriores ao estudo a ingestão de água foi menor quando comparada com o controle e com os animais que receberam alta $[F^-]$, enquanto que nas sete semanas subsequentes, o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ ingeriu mais água que o controle e o grupo de alta $[F^-]$ ($p<0,05$). A linhagem 129P3/J não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (n.s.).

Tabela 8 - Quantidade de água ingerida (g) em 48 h nas duas semanas anteriores ao estudo metabólico e durante as sete semanas de estudo.

Água ingerida (g)*	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa $[F^-]$	Alta $[F^-]$
<i>1^{as} duas semanas</i>			
A/J ^A	15,77±0,52 ^a	11,34±0,69 ^b	14,91±0,53 ^a
129P3/J ^B	7,22±0,39 ^a	7,77±0,65 ^a	7,58±0,55 ^a
<i>Últimas 7 semanas</i>			
A/J ^A	12,17±0,28 ^a	14,50±1,38 ^b	12,16±0,28 ^a
129P3/J ^B	7,97±0,27 ^a	7,86±0,17 ^a	7,57±0,15 ^a

*Média ± EP. n= 6 para as duas primeiras semanas e n=21 para as últimas sete semanas. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA e Bonferroni, $p<0,05$).

As figuras 15 e 16 mostram o perfil de ingestão de água durante o estudo para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as

semanas ($F=1,843$, $p=0,118$), nem entre os tratamentos ($F=0,342$, $p=0,724$), mas houve interação significativa entre esses dois critérios ($F=2,034$, $p=0,0499$). Para o grupo tratado com baixa $[F^-]$, a quantidade de água ingerida foi significativamente maior na sétima semana em relação às outras semanas, com exceção da terceira. Para o grupo controle e o grupo de alta $[F^-]$, não houve diferença significativa na quantidade de água ingerida entre as semanas (n.s.). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou uma diferença significativa entre as semanas ($F=2,588$, $p=0,035$), mas não entre os tratamentos ($F=0,170$, $p=0,848$). A interação entre esses critérios não foi significativa ($F=0,877$, $p=0,576$). Para o tratamento controle, os animais ingeriram quantidade significativamente mais alta durante a quinta, sexta e sétima semanas em relação à primeira ($p<0,05$). Para os tratamentos com baixa e alta $[F^-]$ não foi detectada diferença significativa entre a quantidade de água ingerida nas diferentes semanas (n.s.).

Figura 15 - Média da quantidade de água ingerida (g) em 48 h durante as 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas para cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam erro padrão.

Figura 16 - Média da quantidade de água ingerida (g) em 48 h durante as 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas para cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). As barras indicam erro padrão.

5.1.4 Ingestão de fluoreto

A tabela 9 mostra a quantidade de F^- ingerida a partir da dieta, da água, bem como a ingestão total (dieta+água) durante as sete semanas do estudo metabólico. Com relação ao F^- ingerido pela dieta (μg), a ANOVA a 2 critérios revelou uma diferença significativa entre as linhagens ($F=330,4$, $p<0,0001$) e entre os grupos de tratamento ($F=3,817$, $p=0,025$). A interação entre os critérios não foi significativa ($F=1,853$, $p=0,161$). O F^- ingerido pela dieta foi significativamente mais alto para a linhagem A/J quando comparada com a 129P3/J ($p<0,001$). Para os diferentes grupos de tratamento, a linhagem A/J teve uma ingestão de F^- pela dieta significativamente mais alta pelo grupo de alta $[F^-]$ quando comparado com o grupo de baixa $[F^-]$ ($p<0,01$). Para as outras condições, a diferença entre os grupos não foi significativa (n.s.).

Com relação à ingestão de F^- a partir da água (Tabela 9), a ANOVA a 2 critérios detectou uma diferença significativa entre as linhagens ($F=5,973$, $p=0,016$), entre os tratamentos ($F=3,659$, $p<0,0001$), bem como para a interação entre esses critérios ($F=11,60$, $p<0,0001$). Os animais da linhagem 129P3/J no grupo com alta $[F^-]$ ingeriram significativamente mais F^- a partir da água quando comparados àqueles da linhagem A/J que receberam o mesmo tratamento ($p<0,001$). Para os outros tratamentos, não houve diferença significativa entre as linhagens (n.s.). Para ambas as linhagens, as diferenças na ingestão de F^- entre os tratamentos foram significativas ($p<0,001$).

Já para a ingestão total de F^- (água + dieta) (Tabela 9), a ANOVA a dois critérios detectou uma diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F=3607$, $p<0,0001$), mas não houve diferença significativa entre as linhagens ($F=2,466$, $p=0,119$). A interação entre estes dois critérios foi significativa ($F=11,10$, $p<0,0001$). Os animais da linhagem 129P3/J no grupo com alta $[F^-]$ ingeriram significativamente mais F^- total quando comparados àqueles da linhagem A/J que receberam o mesmo tratamento ($p<0,001$). Para os outros tratamentos, não houve diferença significativa entre as linhagens (n.s.). Para ambas as linhagens, as diferenças na ingestão de F^- entre os tratamentos foram significativas ($p<0,001$), sendo observado um aumento significativo na ingestão total de F^- em função do aumento na $[F^-]$ na água fornecida aos animais.

Tabela 9 - Quantidade de F⁻ ingerida durante as 7 semanas de estudo metabólico.

Ingestão F [*]	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa [F ⁻]	Alta [F ⁻]
F⁻ da dieta (µg)			
A/J ^A	14,76±0,15 ^{ac}	14,38±0,24 ^a	15,28±0,28 ^{bc}
129P3/J ^B	11,45±0,19 ^a	11,72±0,17 ^a	11,73±0,16 ^a
F⁻ da água (µg)			
A/J	0,00±0,00 ^{aA}	85,29±4,41 ^{bA}	345,48±6,06 ^{cA}
129P3/J	0,00±0,00 ^{aA}	78,62±1,68 ^{bA}	378,74±7,70 ^{cB}
F⁻ Total (µg)			
A/J	14,75±0,15 ^{aA}	99,67±4,49 ^{bA}	360,77±6,15 ^{cA}
129P3/J	11,45±0,19 ^{aA}	90,34±1,73 ^{bA}	390,47±7,73 ^{cB}

*Média ± EP. n=21. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni, p<0,05).

As figuras 17 e 18 mostram o perfil de ingestão de F⁻ pela água ao longo do tempo, para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas (F=0,371, p=0,892), mas houve diferença significativa entre os tratamentos (F=659,6, p<0,0001). Não houve interação entre os dois critérios (F=0,421, p=0,944). Não houve diferença significativa na ingestão de F⁻ pela água, entre as semanas, para os três grupos de tratamento da linhagem A/J (n.s). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou uma diferença significativa entre os grupos de tratamento (F=393,6, p<0,0001), mas não entre as semanas (F=1,340, p=0,265). A interação entre esses critérios não foi significativa (F=1,211, p=0,313). Para o tratamento com baixa [F⁻] não houve diferença significativa entre as semanas na ingestão de F⁻ pela água (n.s), enquanto que para o grupo de tratamento com alta [F⁻], houve uma menor ingestão de F⁻ na terceira semana quando comparada com a segunda, sexta e sétima semanas (p<0,05).

Figura 17 - Média de ingestão de F^- pela água durante 7 semanas pela linhagem A/J. Não houve diferenças significativas entre as semanas (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 18 - Média de ingestão de F^- pela água durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

As figuras 19 e 20 mostram o perfil de ingestão de F^- pela dieta ao longo do tempo, para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para as duas linhagens, a ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas detectou uma diferença significativa entre as semanas ($F=9,559$, $p<0,0001$ e $F=8,551$, $p<0,0001$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente), mas as diferenças entre os tratamentos não foram significativas ($F=1,628$, $p=0,272$ e $F=1,572$, $p=0,2825$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). A interação entre os critérios também não foi significativa ($F=0,584$, $p=0,840$ e $F=0,787$, $p=0,660$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). Para a linhagem A/J, o nível mais alto de ingestão de F^- pela dieta foi observado na 6ª semana, enquanto o nível mais baixo foi visto na 7ª semana. Para a linhagem 129P3/J, o nível mais alto de ingestão de F^- (com exceção ao grupo controle) pela dieta foi observado na 2ª semana, enquanto o mais baixo foi visto na 3ª semana.

Figura 19 - Média de ingestão de F⁻ pela dieta durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 20 - Média de ingestão de F⁻ pela dieta durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

As figuras 21 e 22 mostram o perfil de ingestão de F^- total (água + dieta) ao longo do tempo para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para as duas linhagens, a ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas ($F=0,321$, $p=0,922$ e $F=1,641$, $p=0,164$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente), mas as diferenças entre os tratamentos foram significativas ($F=620,4$, $p<0,0001$ e $F=399,3$, $p<0,0001$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). A interação entre os critérios não foi significativa ($F=0,422$, $p=0,944$ e $F=1,256$, $p=0,286$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). Para a linhagem A/J, não houve diferença significativa na ingestão total de F^- entre as semanas, em nenhum dos grupos de tratamento (n.s). Já para a linhagem 129P3/J, apenas para o grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água houve diferença significativa na terceira semana, tendo esta o nível mais baixo de ingestão total de F^- , quando comparada com a segunda, sexta e sétima semanas ($p<0,05$).

Figura 21 - Média de ingestão total de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 22 - Média de ingestão total de F^- durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0.05$). As barras indicam o erro padrão.

5.1.5 Excreção de fluoreto

A tabela 10 mostra a quantidade de F^- excretada pelas fezes, urina, bem como a excreção total (urina + fezes) durante as 7 semanas do estudo metabólico. Com relação ao F^- excretado pelas fezes (μg), a ANOVA a 2 critérios revelou uma diferença significativa entre os tratamentos ($F= 767,2$, $p<0,0001$), mas não houve diferença significativa entre as linhagens ($F= 3,323$, $p= 0,071$). A interação entre os critérios foi significativa ($F= 3,446$, $p= 0,035$). Quando se compararam as duas linhagens, apenas no grupo com alta $[F^-]$ na água houve uma excreção de F^- pelas fezes significativamente maior para a linhagem 129P3/J quando comparada à A/J. Para os demais grupos de tratamento, não houve diferença significativa entre as linhagens (n.s.). Para ambas as linhagens, foi observada uma relação dose-resposta na excreção de F^- através das fezes, sendo que o grupo que recebeu alta $[F^-]$ através da água apresentou uma excreção fecal de F^- significativamente maior em relação aos demais, e o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ através da água apresentou uma excreção fecal de F^- significativamente maior em relação ao controle ($p<0,05$).

Com relação à excreção de F^- a partir da urina (Tabela 10), a ANOVA a 2 critérios detectou uma diferença significativa entre as linhagens ($F= 34,65$, $P<0,0001$), entre os tratamentos ($F= 335,3$, $p<0,0001$), bem como para a interação entre esses critérios ($F= 11,52$, $p<0,0001$). A linhagem A/J teve uma excreção de F^- maior que a linhagem 129P3/J em todos os grupos, embora esta diferença só tenha sido significativa nos grupos que receberam F^- na água ($p<0,05$). Para os animais da linhagem 129P3/J, não houve diferença significativa na excreção de F^- pela urina entre os grupos controle e de baixa $[F^-]$ (n.s), para os outros tratamentos houve diferença significativa. Quando a excreção de F^- pelas fezes e urina foi somada, obtendo-se então a excreção total de F^- (Tabela 10), a ANOVA a dois critérios detectou uma diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F= 1117$, $p<0,0001$), assim como entre as linhagens ($F= 9,518$, $p= 0,003$), não havendo interação significativa entre estes dois critérios ($F= 1,67$, $p= 0,1926$). O padrão observado foi semelhante ao relatado para a excreção fecal de F^- . Quando se compararam as duas linhagens, apenas no grupo com alta $[F^-]$ na água houve uma excreção total de F^- significativamente maior para a linhagem 129P3/J quando comparada à A/J. Para os demais grupos de tratamento, não houve diferença significativa entre as linhagens (n.s.). Para ambas as linhagens, foi observada uma

relação dose-resposta na excreção total de F^- , sendo que o grupo que recebeu alta $[F^-]$ pela água apresentou uma excreção total de F^- significativamente maior em relação aos demais, e o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ pela água apresentou uma excreção total de F^- significativamente maior em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Quantidade de F^- excretada durante as 7 semanas de estudo metabólico.

Excreção F^- *	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa $[F^-]$	Alta $[F^-]$
Fezes (μg)			
A/J	6,39 $\pm$ 0,30 ^{aA}	31,08 $\pm$ 1,37 ^{bA}	129,64 $\pm$ 4,09 ^{cA}
129P3/J	4,70 $\pm$ 0,13 ^{aA}	32,75 $\pm$ 1,01 ^{bA}	145,57 $\pm$ 7,51 ^{cB}
Urina (μg)			
A/J	2,28 $\pm$ 0,14 ^{aA}	23,03 $\pm$ 2,26 ^{bA}	106,08 $\pm$ 5,46 ^{cA}
129P3/J	1,30 $\pm$ 0,10 ^{aA}	6,91 $\pm$ 1,20 ^{aB}	72,80 $\pm$ 5,59 ^{bB}
Total (μg)			
A/J	8,67 $\pm$ 0,37 ^{aA}	54,11 $\pm$ 2,75 ^{bA}	235,73 $\pm$ 6,60 ^{cA}
129P3/J	6,00 $\pm$ 0,16 ^{aA}	39,67 $\pm$ 1,56 ^{bA}	218,37 $\pm$ 8,81 ^{cB}

*Média $\pm$ EP. n=21. Diferentes sobrescritos em letras maiúsculas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes sobrescritos em letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA a 2 critérios e teste Bonferroni, $p < 0,05$).

As figuras 23 e 24 mostram o perfil de excreção de F^- pelas fezes ao longo do tempo para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para as duas linhagens, a ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas ($F = 1,275$, $p = 0,293$ e $F = 1,189$, $p = 0,334$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente), mas as diferenças entre os tratamentos foram significativas ($F = 1531$, $p < 0,0001$ e $F = 118,4$, $p < 0,0001$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). A interação entre os critérios não foi significativa ($F =$

1,649, $p= 0,121$ e $F= 1,200$, $p= 0,320$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). Para a linhagem A/J, não houve diferença na excreção de F^- pelas fezes nas diferentes semanas, para os grupos de tratamento controle e baixa $[F^-]$, mas no grupo de alta $[F^-]$ houve uma maior excreção de F^- durante a semana 3 quando comparada com as semanas 1, 6 e 7, bem como na semana 5 quando comparada com a 7. Já para a linhagem 129P3/J, houve uma excreção de F^- significativamente menor para a quarta semana, no grupo de alta $[F^-]$, quando comparada com a segunda, terceira e quinta semanas. Ainda nesse grupo foi observada uma excreção fecal de F^- significativamente maior na semana 3, quando comparada com as semanas 1 e 7. Para os outros grupos de tratamento da linhagem 129P3/J, não houve diferença significativa entre as semanas (n.s).

Figura 23 - Média da excreção de F^- pelas fezes durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 24 - Média da excreção de F^- pelas fezes durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

As figuras 25 e 26 mostram o perfil de excreção de F^- pela urina ao longo do tempo para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para as duas linhagens, a ANOVA a 2 critérios com medidas repetidas detectou diferença significativa entre as semanas ($F= 6,228$, $p= 0,0001$ e $F= 3,101$, $p= 0,015$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente), e entre os tratamentos ($F= 67,40$, $p<0,0001$ e $F= 147,0$, $p<0,0001$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). A interação entre os critérios também foi significativa ($F= 5,955$, $p<0,0001$ e $F= 2,218$, $p= 0,032$ para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente). Para a linhagem A/J, não houve diferença significativa na excreção de F^- pela urina entre as diferentes semanas para os grupos de tratamento controle e com baixa $[F^-]$ (n.s). Já para o grupo de alta $[F^-]$, houve uma excreção de F^- significativamente maior nas semanas 4, 5 e 6 quando comparadas com as outras semanas ($p<0,05$). A menor excreção foi observada na semana 3, que foi significativamente diferente das semanas 4, 5, 6 e 7. Para a linhagem 129P3/J, observou-se que o grupo de alta $[F^-]$ excretou significativamente menos F^- pela urina nas três primeiras semanas, quando comparadas às semanas 4, 5 e 6. Já para os grupos controle e de baixa $[F^-]$ não houve diferença significativa na excreção de F^- durante as sete semanas (n.s). Comparando-se as figuras 25 e 26, observa-se que, para ambas as linhagens, há uma excreção urinária menor de F^- nas 3 primeiras semanas, um aumento significativo nas 3 semanas subsequentes, voltando a haver novamente uma queda na excreção na sétima semana.

Figura 25 - Média da excreção de F^- pela urina durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 26 - Média da excreção de F^- pela urina durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

As figuras 27 e 28 mostram a excreção total de F^- (fezes + urina) durante as sete semanas de tratamento para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou diferença significativa entre as semanas ($F = 3,105$, $p = 0,015$), assim como entre os tratamentos ($F = 317,4$, $p < 0,0001$). Houve também interação significativa entre esses dois critérios ($F = 3,048$, $p = 0,0048$). Para o grupo tratado com alta $[F^-]$, a concentração total de F^- excretada foi significativamente maior na quinta semana em relação à primeira, segunda, terceira e sétima semanas. Para o grupo controle e o grupo de baixa $[F^-]$, não houve diferença significativa na excreção total de F^- entre as semanas (n.s). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas ($F = 0,994$, $p = 0,444$), mas sim entre os tratamentos ($F = 200,3$, $p < 0,0001$). A interação entre esses critérios não foi significativa ($F = 0,942$, $p = 0,518$). Para o tratamento controle e de baixa $[F^-]$, não houve diferença significativa entre as semanas (n.s). Já para o grupo de tratamento de alta $[F^-]$ houve uma excreção total de F^- significativamente menor na primeira semana quando comparada com a quinta e sexta semanas ($p < 0,05$). Entre as demais semanas não houve diferença significativa (n.s). Para a excreção total de F^- , observa-se, para ambas as linhagens, uma tendência de aumento na quinta e sexta semanas, com diminuição na sétima semana.

Figura 27 - Média da excreção total de F⁻ durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 28 - Média da excreção Total de F⁻ pela durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

5.1.6 Absorção e retenção de fluoreto

A tabela 11 mostra a quantidade e a porcentagem de F^- absorvida e retida pelos animais durante as 7 semanas do estudo metabólico. Com relação ao F^- absorvido (μg), a ANOVA a 2 critérios revelou que não houve diferença significativa entre as linhagens ($F= 0,0076$, $p= 0,9308$) mas houve diferença significativa entre os tratamentos ($F= 1210$, $p<0,0001$). A interação entre os dois critérios foi significativa ($F= 3,239$, $p= 0,043$). Para ambas as linhagens, foi observada uma dose-resposta em relação à absorção de F^- , sendo que o grupo que recebeu alta $[F^-]$ pela água apresentou uma absorção de F^- significativamente maior em relação aos demais, e o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ pela água apresentou uma absorção de F^- significativamente maior em relação ao controle ($p<0,05$). A ANOVA a 2 critérios revelou que não houve diferença significativa na porcentagem de absorção do F^- entre as linhagens ($F=0,935$, $p=0,3354$) mas houve diferença significativa entre os tratamentos ($F=15,757$, $p<0,0001$). Não houve interação entre os dois critérios ($F=2,222$, $p=0,1112$).

Com relação à retenção de F^- (Tabela 11), a ANOVA a 2 critérios detectou uma diferença significativa entre as linhagens ($F= 20,45$, $P<0,0001$), entre os tratamentos ($F= 443,6$, $p<0,0001$), bem como para a interação entre esses critérios ($F= 16,47$, $p<0,0001$). A linhagem 129P3/J apresentou uma retenção de F^- significativamente maior em relação à linhagem A/J apenas no grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água ($p<0,05$). Nos grupos controle e de baixa $[F^-]$ na água, as retenções foram semelhantes entre as duas linhagens (n.s.). Para ambas as linhagens, foi observada uma dose-resposta em relação à retenção de F^- , sendo que o grupo que recebeu alta $[F^-]$ pela água apresentou uma retenção de F^- significativamente maior em relação aos demais, e o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ pela água apresentou uma retenção de F^- significativamente maior em relação ao controle ($p<0,05$). Para a porcentagem de retenção de F^- a ANOVA a 2 critérios mostrou uma diferença significativa entre as linhagens ($F=33.358$, $p<0,0001$), entre os tratamentos ($F=19,116$, $p<0,0001$) mas não houve interação entre os critérios ($F=0,7984$, $p=0,4524$).

Tabela 11 - Quantidade de F^- (μg) absorvido e retido e porcentagem (%) de absorção e retenção de F^- durante as 7 semanas de estudo metabólico.

	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa $[F^-]$	Alta $[F^-]$
Absorção de F^- (μg)			
A/J ^A	8,36 $\pm$ 0,29 ^a	68,58 $\pm$ 4,40 ^b	231,12 $\pm$ 5,93 ^c
129P3/J ^A	6,75 $\pm$ 0,20 ^a	57,59 $\pm$ 1,22 ^b	244,90 $\pm$ 9,34 ^c
Absorção (%)			
A/J ^A	56,7 $\pm$ 1,93 ^a	68,0 $\pm$ 1,59 ^b	64,0 $\pm$ 1,10 ^b
129P3/J ^A	58,8 $\pm$ 1,21 ^a	63,8 $\pm$ 0,79 ^a	62,6 $\pm$ 1,87 ^a
Retenção de F^- (μg)			
A/J	6,08 $\pm$ 0,33 ^{aA}	45,56 $\pm$ 3,01 ^{bA}	125,04 $\pm$ 6,43 ^{cA}
129P3/J	5,45 $\pm$ 0,21 ^{aA}	50,67 $\pm$ 1,97 ^{bA}	172,10 $\pm$ 8,49 ^{cB}
Retenção (%)			
A/J ^A	41,3 $\pm$ 2,29 ^a	45,4 $\pm$ 1,80 ^a	34,6 $\pm$ 1,65 ^b
129P3/J ^B	47,4 $\pm$ 1,52 ^a	56,0 $\pm$ 1,74 ^b	44,0 $\pm$ 1,96 ^a

*Média $\pm$ EP. n=21. Diferentes sobrescritos em letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes sobrescritos em letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA a 2 critérios e teste Bonferroni, $p < 0,05$).

As figuras 29 e 30 mostram a absorção de F^- durante as sete semanas de estudo metabólico para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F = 214,1$, $p < 0,0001$), mas não entre as semanas ($F = 1,600$, $p = 0,176$). Não houve interação entre os critérios ($F = 1,040$, $p = 0,436$). Para o grupo tratado com alta $[F^-]$, a $[F^-]$ absorvida foi significativamente maior na sétima semana em relação à segunda, terceira e quinta semanas ($p < 0,05$). Em relação às outras semanas não houve diferença significativa (n.s). Para o grupo controle e o grupo de baixa $[F^-]$, não houve diferença significativa na absorção de F^- entre as semanas (n.s). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas ($F = 1,660$, $p = 0,159$), mas sim entre os tratamentos ($F = 382,5$, $p < 0,0001$). A interação entre esses critérios não foi significativa ($F = 1,803$, $p = 0,085$). Para o tratamento

controle e de baixa $[F^-]$ não houve diferença significativa entre as semanas (n.s). Já para o grupo de tratamento de alta $[F^-]$ houve uma diminuição significativa na absorção de F^- na terceira semana quando comparada com as demais, com exceção da quinta semana.

Figura 29 - Média de absorção de F^- durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 30 - Média de absorção de F^- durante 7 semanas pela linhagem 129P3/J. Letras distintas indicam diferença significativa entre as semanas em cada grupo de tratamento (ANOVA a dois critérios de medidas repetidas, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

As figuras 31 e 32 mostram a retenção de F^- ao longo das sete semanas de estudo para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente. Para a linhagem A/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas detectou diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F= 257,7$, $p<0,0001$), entre as semanas ($F= 3,521$, $p= 0,0076$) bem como interação entre os critérios ($F= 2,592$, $p= 0,014$). Para o grupo tratado com alta $[F^-]$, a $[F^-]$ retida foi significativamente menor na quinta semana quando comparada com as demais, com exceção da quarta semana ($p<0,05$). Para o grupo controle e o grupo de baixa $[F^-]$, não houve diferença significativa na retenção de F^- entre as semanas (n.s). Em relação à linhagem 129P3/J, a ANOVA a dois critérios com medidas repetidas não detectou diferença significativa entre as semanas ($F= 1,461$, $p= 0,219$), mas sim entre os tratamentos ($F= 604,1$, $p<0,0001$). A interação entre esses critérios não foi significativa ($F= 1,524$, $p= 0,161$). Para o tratamento controle e de baixa $[F^-]$ não houve diferença significativa na retenção de F^- pelos animais entre as semanas (n.s). Já para o grupo de tratamento de alta $[F^-]$ houve uma redução significativa na retenção de F^- na terceira e quinta semanas em relação à primeira, segunda e sétima semanas ($p<0,05$).

Figura 31 - Média de retenção de F⁻ durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0.05$). As barras indicam o erro padrão.

Figura 32 - Média de retenção de F⁻ durante 7 semanas pela linhagem A/J. Letras distintas indicam diferença estatística entre as semanas em cada grupo de tratamento. (ANOVA a dois critérios, $p < 0.05$). As barras indicam o erro padrão.

5.1.7 Concentração de fluoreto no plasma, fêmur e rim

A tabela 12 mostra a $[F^-]$ presente no plasma, no fêmur e nos rins dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J após as 7 semanas de estudo metabólico. Com relação ao F^- no plasma ($\mu g/L$), a ANOVA a 2 critérios revelou que não houve diferença significativa entre as linhagens ($F= 2,874$, $p= 0,104$) mas houve diferença significativa entre os tratamentos ($F= 42,55$, $p<0,0001$). A interação entre os dois critérios não foi significativa ($F= 2,035$, $p= 0,155$). Conforme se observa na tabela 12, as concentrações de F^- presentes no plasma dos animais da linhagem 129P3/J foram maiores que aquelas presentes nos animais da linhagem A/J, embora essa diferença só tenha sido significativa no grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água. Embora tenha sido observado um efeito dose-resposta na $[F^-]$ presente no plasma em função dos tratamentos, apenas o grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água teve valores de F^- no plasma significativamente maiores em relação aos demais.

Com relação ao F^- presente no fêmur (mg/Kg), a ANOVA a 2 critérios mostrou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F= 11,48$, $p= 0,002$), assim como entre os tratamentos ($F= 140,2$, $p<0,0001$). Houve, também, interação significativa entre os dois critérios ($F= 4,384$, $p= 0,021$). O perfil observado foi de certa forma semelhante ao encontrado para o plasma, o que é consistente com a correlação significativa ($r^2=0,632$, $p<0,0001$) entre essas variáveis (Figura 33). As concentrações de F^- presentes no fêmur dos animais da linhagem 129P3/J foram maiores que aquelas presentes nos animais da linhagem A/J, embora essa diferença só tenha sido significativa no grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água. Para a linhagem A/J, embora tenha sido observado um efeito dose-resposta na $[F^-]$ presente no plasma em função dos tratamentos, apenas o grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água teve valores de F^- no plasma significativamente maiores em relação aos demais. Já para a linhagem 129P3/J, o efeito dose-resposta foi mais pronunciado, tendo sido observadas diferenças significativas entre todos os grupos de tratamento (Tabela 12). Os resultados encontrados para a quantidade de F^- presente nos rins foram similares aos encontrados para o fêmur, com diferença significativa entre as linhagens ($F=4,667$; $p=0,0401$) e entre os tratamentos ($F=41,32$; $p<0,0001$), mas sem interação entre os critérios ($F= 3,094$; $p= 0,0623$).

Tabela 12 - Concentração de F^- presente no plasma ($\mu\text{g/L}$), no fêmur (mg/Kg) e no rim ($\mu\text{g/g}$).

	TRATAMENTO		
	Controle	Baixa $[F^-]$	Alta $[F^-]$
$[F^-]$ plasma ($\mu\text{g/L}$)			
A/J	6,93 $\pm$ 0,37 ^{aA}	24,95 $\pm$ 3,69 ^{aA}	97,87 $\pm$ 7,83 ^{bA}
129P3/J	8,97 $\pm$ 0,82 ^{aA}	31,00 $\pm$ 4,50 ^{aA}	143,40 $\pm$ 26,90 ^{bB}
$[F^-]$ fêmur (mg/Kg)			
A/J	198,76 $\pm$ 11,73 ^{aA}	774,17 $\pm$ 100,03 ^{aA}	2890,85 $\pm$ 446,53 ^{bA}
129P3/J	330,77 $\pm$ 43,38 ^{aA}	1075,29 $\pm$ 90,18 ^{bA}	3994,25 $\pm$ 314,17 ^{cB}
$[F^-]$ rim ($\mu\text{g/g}$)			
A/J	0,009 $\pm$ 0,001 ^{aA}	0,011 $\pm$ 0,001 ^{aA}	0,020 $\pm$ 0,002 ^{bA}
129P3/J	0,009 $\pm$ 0,0006 ^{aA}	0,012 $\pm$ 0,002 ^{aA}	0,027 $\pm$ 0,002 ^{bB}

Média $\pm$ EP. n=6. Diferentes sobrescritos em letras maiúsculas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes sobrescritos em letras minúsculas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA a 2 critérios e teste Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 33 - Correlação entre a [F-] presente no plasma e no fêmur dos animais.

5.1.8 Fluorescência quantitativa e análise clínica

A tabela 13 mostra o resultado da análise de fluorescência quantitativa dos incisivos dos camundongos ($n=5$) das linhagens A/J e 129P3/J e do exame clínico realizado por dois examinadores. Com relação à fluorescência quantitativa, a ANOVA a 2 critérios revelou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F=17,65$, $p=0,0003$), assim como entre os tratamentos ($F=24,20$, $p=0,0001$). A interação entre os dois critérios também foi significativa ($F=14,35$, $p=0,0001$). Também foi encontrada diferença significativa entre as linhagens e os tratamentos através do exame clínico ($p=0,007$ e $p=0,001$). Comparando-se as duas diferentes linhagens, pode-se observar que no grupo que recebeu alta $[F^-]$ na água, os valores de fluorescência quantitativa foram significativamente maiores para os animais da linhagem A/J, quando comparados com os da linhagem 129P3/J, o que foi confirmado pelo exame clínico ($p=0,003$) e está ilustrado na Figura 36. Para o grupo controle e o que recebeu baixa $[F^-]$ na água, não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens na fluorescência quantitativa, mas o exame clínico detectou diferença significativa ($p=0,001$) (Figuras 34 e 35). Em relação aos diferentes tratamentos, apenas os animais da linhagem A/J que receberam alta $[F^-]$ na água apresentaram valores de fluorescência quantitativa significativamente maiores que os animais do grupo controle e de baixa $[F^-]$. Já para os animais da linhagem 129P3/J, não houve diferenças significativas na fluorescência quantitativa entre os diferentes tratamentos, comprovando que os animais dessa linhagem, mesmo expostos a doses de F^- circulantes mais altas, são “resistentes” ao desenvolvimento da fluorose dentária.

Tabela 13 - Fluorescência quantitativa (QF) e exame clínico dos incisivos dos animais (n=5).

Linhagens	Animais	TRATAMENTO		
		Controle	Baixa [F]	Alta [F]
A/J		QLF/Clínico	QLF/Clínico	QLF/Clínico
	1	12,66/1	13,38/1	68,05/4
	2	10,35/1	12,83/1	55,47/4
	3	11,66/0	12,49/2	27,11/3
	4	11,60/0	14,67/2	31,54/3
129P3/J	5	11,51/1	13,29/1,5	45,87/4
	1	11,06/1	11,14/0	12,39/1
	2	12,06/1	11,60/0	17,57/1
	3	11,46/1	11,08/1	15,94/2
	4	12,11/1	11,22/0	15,95/2
A/J	5	11,45/0	10,53/0	16,72/3
		11,56 ±0,37 ^{aA}	13,33 ±0,37 ^{aA}	45,61 ±7,55 ^{bA}
		11,63 ±0,20 ^{aA}	11,1 ±0,17 ^{aA}	15,71 ±0,88 ^{aB}

Diferentes letras maiúsculas sobrescritas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as linhagens. Diferentes letras minúsculas sobrescritas nas mesmas linhas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA a 2 critérios e Bonferroni, $p < 0,05$)

Figura 34 - Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J do grupo controle.

Figura 35 - Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J que ingeriram água com baixa concentração de fluoreto.

Figura 36 - Incisivos dos animais da linhagem A/J e 129P3/J que ingeriram água com alta concentração de flúor.

5.2 ESTUDO PROTEÔMICO

5.2.1 Análise proteômica do rim

Para visualização dos spots de proteínas renais, um total de 18 géis foram corados com azul de *Coomassie* coloidal G250 (2 linhagens X 3 tratamentos, em triplicata).

As figuras 37 e 38 mostram os géis representativos de cada grupo de tratamento para as linhagens A/J e 129P3/J respectivamente.

Figura 37 - Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de camundongos da linhagem A/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F] (B) e alta [F] (C). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Figura 38 - Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de camundongos da linhagem 129P3/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F] (B) e alta [F] (C). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Após a detecção automática realizada pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*. Quando se avaliaram as proteínas renais dos camundongos da linhagem A/J, foram detectados 566 *spots* para o grupo controle, 567 *spots* para o grupo que ingeriu baixa [F] e um total de 556 *spots* para o grupo

que ingeriu alta [F⁻]. Para a linhagem 129P3/J, o grupo controle apresentou 552 *spots* detectados, o grupo de baixa [F⁻] 554 *spots* e o grupo de alta [F⁻] 557 *spots*. Depois de realizada a detecção, foram efetuadas comparações (*matches*) entre as linhagens nos diferentes grupos, utilizando como géis de referência aqueles que apresentaram o maior número de *spots*.

A análise interclasses através da ANOVA detectou 122 *spots* com expressão diferencial alterada ($p < 0,05$) para o grupo controle, sendo 62 *spots* presentes ou superexpressos na linhagem A/J e ausentes ou subexpressos na linhagem 129P3/J e 60 *spots* ausentes ou subexpressos na linhagem A/J e presentes ou superexpressos na 129P3/J (Figura 39 e Tabela 14).

Para o grupo que recebeu baixa [F⁻], a ANOVA detectou 126 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$), sendo que 67 tiveram sua expressão aumentada ou apareceram e 59 desapareceram ou tiveram sua expressão reduzida para o gel da linhagem A/J, quando comparado com o da 129P3/J (Figura 40 e Tabela 15).

Quando se comparou o grupo que recebeu alta [F⁻], a ANOVA mostrou 134 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$). Destes, 60 *spots* estavam presentes ou superexpressos e 74 estavam ausentes ou subexpressos na linhagem A/J comparada com a 129P3/J (Figura 41 e Tabela 16).

A Figura 42 mostra o perfil de expressão proteica diferencial no tecido renal entre as linhagens A/J e 129P3/J. No grupo controle, foram observados 35 *spots* presentes apenas na linhagem A/J e 21 presentes apenas na linhagem 129P3/J. Foram observados ainda 66 *spots* comuns a ambas as linhagens, mas com expressão diferencial. Para o grupo que recebeu baixa [F⁻], os números correspondentes foram 34, 20 e 72 *spots*, respectivamente. Já para o grupo que recebeu alta [F⁻], os números correspondentes foram 27, 25 e 81 *spots*, respectivamente.

Figura 39 - Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o software *Image Master 2D Platinum* revelaram 122 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo controle.

Figura 40 - Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o software *Image Master 2D Platinum* revelaram 126 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de baixa [F].

Figura 41 - Mapa bidimensional de proteínas renais diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o *software Image Master 2D Platinum* revelaram 134 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de alta [F].

Tabela 14 - Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo controle. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J controle	129P3/J controle	p*	pI (min-máx)	PM (min-máx)
2	0,050	0,066	0,046	4,63-4,79	86-96
3	0,273	0,151	0,022	2,63-3,01	15-16
7	0,105	0,156	0,018	5,60-5,75	37-40
8	0,012	0,041	0,014	4,92-5,14	121-140
31	0,043	0,055	0,047	5,18-5,31	21-23
32	0,047	0,033	0,023	7,24-7,56	22-24
60	0,145	0,065	0,001	4,41-4,55	26-28
65	0,528	0,359	0,048	7,38-7,70	26-28
99	0,051	0,044	0,041	5,79-5,98	29-31
100	0,045	0,030	0,020	6,00-6,19	29-31
116	0,124	0,205	0,043	5,86-6,05	31-34
119	0,170	0,255	0,038	5,09-5,22	32-34
140	0,190	0,129	0,032	7,72-8,11	34-36
151	0,236	0,288	0,011	5,03-5,17	35-38
155	0,101	0,197	0,012	5,53-5,70	37-39
159	0,090	0,217	0,032	7,60-7,95	37-39
170	0,489	0,678	0,004	5,95-6,16	37-39
171	0,684	0,603	0,049	7,35-7,67	37-39
175	0,128	0,195	0,012	7,74-8,14	37-40
180	0,057	0,042	0,034	6,30-6,50	38-41
189	0,280	0,219	0,041	6,76-7,01	39-42
190	0,132	0,097	0,029	6,46-6,70	39-43
205	0,090	0,070	0,044	3,89-4,02	41-44
209	0,251	0,114	0,000	6,48-6,72	41-44
213	0,073	0,121	0,037	7,45-7,81	41-44
217	0,315	0,482	0,001	7,85-8,26	41-44
221	0,224	0,380	0,004	7,99-8,41	41-45
233	0,076	0,053	0,024	5,63-5,81	43-47
237	0,093	0,066	0,033	7,91-8,19	43-47
245	0,059	0,077	0,041	5,50-5,67	43-48
260	0,084	0,099	0,019	7,92-8,35	46-50
269	0,060	0,119	0,011	7,04-7,36	48-52
271	0,235	0,388	0,001	5,63-5,83	48-52

* ANOVA

continua

Match ID	A/J controle	129P3/J controle	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
273	0,110	0,283	0,000	5,99-6,21	49-53
280	0,365	0,632	0,007	4,22-4,35	48-54
283	0,033	0,054	0,004	4,97-5,12	48-54
285	0,096	0,123	0,001	6,11-6,33	49-55
288	0,149	0,121	0,001	5,95-6,15	49-55
291	0,054	0,075	0,005	4,93-5,10	50-57
310	0,514	0,419	0,035	3,29-4,02	55-60
317	0,053	0,076	0,032	7,21-7,53	57-59
321	0,070	0,101	0,018	7,67-8,06	57-60
324	0,146	0,205	0,022	4,80-4,95	58-61
327	0,038	0,059	0,011	6,41-6,73	60-64
345	0,625	1,090	0,008	5,14-5,31	66-74
351	0,136	0,177	0,023	5,69-5,89	68-76
354	0,858	0,434	0,030	5,03-5,19	68-76
355	3,925	2,803	0,022	5,24-5,42	66-73
363	0,016	0,022	0,030	5,56-5,76	75-83
375	0,159	0,360	0,005	5,79-5,98	79-88
384	0,091	0,125	0,041	6,03-6,25	89-101
385	0,182	0,116	0,020	5,35-5,51	88-98
386	0,184	0,114	0,004	5,19-5,37	96-101
391	0,032	0,058	0,028	5,68-5,89	92-105
396	0,045	0,066	0,013	5,36-5,53	94-106
401	0,034	0,092	0,011	5,30-5,47	98-112
413	0,143	0,229	0,009	6,09-6,31	61-65
426	0,050	0,070	0,010	4,54-4,66	88-98
432	0,037	0,022	0,001	4,40-4,52	40-44
451	0,023	0,042	0,002	5,59-5,81	94-105
453	0,023	0,015	0,043	5,57-5,78	89-100
466	0,099	0,047	0,035	5,46-5,68	23-26
474	0,055	0,104	0,016	7,08-7,38	56-61
515	0,044	0,028	0,001	5,35-5,50	29-32
520	0,127	0,031	0,001	5,48-5,68	89-100
528	0,695	0,277	0,003	5,74-5,94	47-52
531		0,068	0,000	7,24-7,34	24-25
533		0,162	0,000	7,60-7,71	18
534		0,067	0,003	10,14-10,24	23-24
535		0,058	0,001	10,33-10,44	23-24
536		0,136	0,000	5,74-5,84	27-28

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J Controle	129P3/J controle	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
537		0,039	0,000	5,69-5,79	31
538		0,154	0,000	7,16-7,31	40-42
539		0,042	0,000	5,27-5,42	43-44
540		0,106	0,002	6,92-6,95	61-63
541		0,040	0,000	6,68-6,81	62-63
542		0,085	0,000	7,23-7,40	63-64
543		0,021	0,001	6,73-6,88	84-86
545		0,081	0,032	8,84-9,00	44-46
547		0,039	0,001	6,51-6,60	30-31
548		0,032	0,012	6,42-6,51	31
549		0,056	0,001	5,81-5,92	31-33
550		0,074	0,010	6,42-6,49	35-37
551		0,016	0,002	5,81-5,97	113-116
552		0,038	0,001	6,26-6,37	36-37
553		0,028	0,010	5,57-5,72	103-106
554		0,119	0,000	4,68-4,83	61-62
471	0,033		0,002	7,14-7,37	34-35
555	0,048		0,003	5,28-5,37	96-121
556	0,286		0,049	6,85-7,00	17-18
557	0,149		0,000	6,20-6,31	26
558	0,074		0,005	5,14-5,22	28-29
559	0,025		0,000	5,48-5,56	29-30
560	0,038		0,000	4,65-4,75	32-33
561	0,037		0,001	6,53-6,67	35-36
562	0,053		0,004	4,93-5,01	36-38
563	0,088		0,000	5,76-5,87	37-40
564	0,078		0,012	6,67-6,84	38-41
565	0,193		0,000	6,58-6,74	39-41
567	0,140		0,001	7,68-7,92	41-45
568	0,025		0,000	5,49-5,59	51-57
569	0,038		0,001	5,84-5,99	57-62
570	0,027		0,003	6,43-6,59	70-79
571	0,058		0,001	5,76-5,89	92-100
572	0,027		0,001	5,20-5,30	108-120
573	0,032		0,002	4,58-4,66	40-43
574	0,016		0,013	4,87-4,96	89-99
575	0,023		0,006	6,70-6,80	78-81
576	0,026		0,037	5,94-6,07	45-51
577	0,048		0,010	5,99-6,08	14-15

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J controle	129P3/J controle	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
578	0,054		0,000	7,42-7,69	47-53
579	0,136		0,005	8,00-8,28	39-43
580	0,036		0,000	4,61-4,70	57-62
581	0,101		0,000	9,71-10,01	14-15
582	0,053		0,001	4,33-4,53	14
583	0,046		0,000	4,69-4,78	55-62
584	0,079		0,001	5,64-5,72	15-16
585	0,024		0,001	8,47-8,85	53-60
586	0,055		0,000	8,07-8,39	36-39
587	0,080		0,003	6,31-6,41	43-47
593	0,038		0,000	7,94-8,23	18-19
* ANOVA					conclusão

Tabela 15 - Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de baixa [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J baixa [F]	129P3/J baixa [F]	p*	PI (min-máx)	PM (min-máx)
3	0,098	0,145	0,040	2,51-3,09	15-16
5	0,263	0,291	0,025	5,69-6,12	36-38
7	0,121	0,161	0,004	5,59-5,99	38-40
29	0,110	0,087	0,029	3,83-4,11	21-22
57	0,034	0,058	0,017	8,03-8,36	24-26
60	0,138	0,069	0,003	4,36-4,68	25-27
66	0,101	0,131	0,015	7,04-7,38	25-28
75	0,109	0,072	0,050	10,02-10,25	26-27
85	0,330	0,145	0,005	4,39-4,71	28-29
87	0,270	0,162	0,017	8,48-8,75	27-29
142	0,861	1,132	0,003	4,74-5,09	35-36
146	0,083	0,121	0,027	4,56-4,90	36-37
157	0,925	0,750	0,002	5,31-5,70	36-38
164	0,279	0,367	0,033	8,84-9,21	36-38
170	0,532	0,829	0,005	5,96-6,38	37-38
176	0,047	0,090	0,018	6,71-7,13	38-40
182	0,046	0,064	0,016	6,42-6,83	39-41
185	0,090	0,068	0,016	5,33-5,74	40-42
201	0,036	0,097	0,009	7,52-8,01	40-43
203	0,437	0,246	0,004	8,99-9,44	41-42
204	0,194	0,118	0,016	7,37-7,79	41-45
209	0,206	0,126	0,021	6,50-6,93	42-44
210	0,236	0,285	0,013	5,73-6,15	42-43
216	0,163	0,190	0,010	4,48-4,81	43-45
218	0,050	0,103	0,029	6,91-7,36	42-45
221	0,244	0,612	0,001	8,04-8,46	42-44
223	0,147	0,208	0,047	6,16-6,58	43-46
233	0,076	0,054	0,002	5,62-6,04	44-47
245	0,095	0,055	0,003	5,48-5,90	45-48
259	0,036	0,048	0,031	7,51-8,07	45-50
260	0,069	0,107	0,030	7,95-8,42	45-49
261	0,039	0,068	0,015	8,23-8,60	45-49
267	0,102	0,081	0,016	5,25-5,64	48-51
268	0,066	0,049	0,000	3,48-3,77	49-51
280	0,363	0,745	0,002	4,17-4,47	50-53
285	0,100	0,141	0,005	6,12-6,56	51-54
289	0,235	0,290	0,037	5,47-5,89	52-55

* ANOVA

continua

Match ID	A/J baixa [F]	129P3/J baixa [F]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
291	0,054	0,083	0,027	4,89-5,26	53-56
293	0,963	0,783	0,006	4,12-4,43	53-56
299	0,250	0,190	0,041	2,68-3,15	55-57
300	0,306	0,552	0,010	6,99-7,46	52-58
311	0,079	0,065	0,028	4,59-4,93	56-59
317	0,037	0,072	0,001	7,20-7,69	55-61
320	0,326	0,259	0,043	5,52-5,94	58-61
327	0,036	0,067	0,007	6,41-6,95	58-61
336	0,063	0,173	0,037	6,32-6,77	60-67
345	0,677	1,194	0,007	5,12-5,49	65-70
354	1,033	0,468	0,002	5,02-5,38	66-73
355	3,997	3,046	0,020	5,23-5,61	66-72
356	0,103	0,063	0,042	4,89-5,23	68-73
369	0,133	0,060	0,003	4,19-4,48	76-85
385	0,239	0,112	0,002	5,33-5,67	85-94
386	0,182	0,105	0,005	5,19-5,56	88-95
391	0,034	0,066	0,014	5,67-6,09	90-98
400	0,276	0,189	0,011	3,85-4,13	94-105
417	0,045	0,027	0,010	5,33-5,70	17-18
426	0,032	0,053	0,003	4,46-4,82	86-93
428	0,082	0,100	0,005	4,16-4,47	48-51
438	0,065	0,033	0,036	4,07-4,35	27-29
447	0,050	0,029	0,024	4,80-5,13	96-107
451	0,021	0,052	0,001	5,60-6,00	91-99
462	0,030	0,044	0,047	5,90-6,32	41-43
467	0,099	0,135	0,039	6,21-6,62	33-35
474	0,048	0,099	0,045	7,06-7,54	57-65
475	0,010	0,019	0,024	6,77-7,26	68-81
489	0,079	0,130	0,035	8,86-9,34	42-44
498	0,027	0,047	0,016	9,98-10,30	37-39
512	0,518	0,337	0,041	4,49-4,80	65-74
518	0,072	0,043	0,041	5,81-6,22	41-43
520	0,137	0,031	0,000	5,48-5,88	87-94
524	0,086	0,034	0,037	3,57-3,85	19-22
528	0,712	0,293	0,001	5,72-6,16	49-51
533		0,178	0,000	7,53-7,89	17-18
534		0,064	0,001	10,18-10,30	22-23
535		0,037	0,034	10,40-10,49	22-23
536		0,143	0,000	5,66-6,06	26-27
537		0,046	0,001	5,60-5,83	29-31
538		0,154	0,003	7,12-7,48	40-42
539		0,053	0,001	5,23-5,60	42-43

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J baixa [F]	129P3/J baixa [F]	p*	PI (min-máx)	PM (min-máx)
540		0,107	0,002	6,77-7,17	60-61
541		0,034	0,012	6,62-7,03	60-61
542		0,070	0,001	7,16-7,57	62-64
543		0,024	0,000	6,70-7,10	77-80
545		0,084	0,018	8,54-9,02	44-45
547		0,036	0,002	6,43-6,81	29-31
548		0,041	0,008	6,30-6,70	29-31
549		0,052	0,011	5,75-5,97	30-32
550		0,092	0,037	6,30-6,71	35-36
551		0,013	0,007	5,75-6,16	99-110
552		0,047	0,009	6,18-6,59	35-37
553		0,045	0,012	5,49-5,91	91-100
554		0,123	0,004	4,64-4,97	59
555	0,058		0,012	5,33-5,63	109-114
556	0,129		0,000	6,97-7,22	16-18
557	0,136		0,000	6,25-6,56	25-27
558	0,062		0,000	5,17-5,42	28-30
560	0,049		0,003	4,69-4,92	32-33
561	0,043		0,033	6,56-6,91	36-37
562	0,045		0,000	4,96-5,21	37
563	0,061		0,010	5,78-6,10	39-40
564	0,053		0,004	6,69-7,07	40-41
565	0,136		0,000	6,59-6,97	40-42
566	0,057		0,006	6,18-6,54	43-45
567	0,109		0,023	7,73-8,09	44-45
568	0,026		0,000	5,52-5,81	55-58
569	0,027		0,019	5,86-6,21	59-64
570	0,039		0,010	6,44-6,85	72-83
571	0,062		0,001	5,78-6,11	90-108
572	0,040		0,004	5,26-5,52	108-114
573	0,037		0,000	4,63-4,85	41-42
574	0,012		0,000	4,85-5,17	86-96
575	0,019		0,000	6,71-7,14	72-85
576	0,039		0,000	5,95-6,30	48-51
577	0,068		0,000	6,06-6,30	13-15
578	0,068		0,002	7,44-7,87	49-53
579	0,124		0,009	8,07-8,39	40-42
580	0,039		0,000	4,68-4,89	59-63
581	0,170		0,002	10,02-10,30	14
582	0,076		0,006	4,43-4,64	13-14
583	0,046		0,000	4,77-4,99	58-63
584	0,061		0,012	5,69-5,97	15-16

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J baixa [F ⁻]	129P3/J baixa [F ⁻]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
585	0,039		0,000	8,48-8,90	55-60
586	0,034		0,021	8,11-8,47	37-39
587	0,036		0,003	6,34-6,70	44-47
591	0,016		0,000	6,47-6,88	51-55
592	0,038		0,046	9,93-10,00	18

* ANOVA

conclusão

Tabela 16 - Proteínas renais com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de alta [F]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J alta [F]	129P3/J alta [F]	p*	PI (min-máx)	PM (min-máx)
1	0,087	0,117	0,047	5,94-6,10	51-58
2	0,058	0,079	0,029	4,70-4,84	83-97
29	0,072	0,132	0,031	3,88-4,10	21-23
35	0,170	0,215	0,036	5,03-5,29	23-25
45	0,166	0,180	0,017	5,76-6,06	24-26
60	0,137	0,073	0,003	4,41-4,64	26-28
90	0,230	0,163	0,003	7,01-7,46	27-30
96	0,239	0,198	0,041	6,87-7,33	28-31
115	0,243	0,328	0,026	6,04-6,37	31-34
116	0,126	0,304	0,045	5,89-6,19	31-34
119	0,193	0,316	0,024	5,10-5,34	32-34
133	0,221	0,273	0,035	9,04-9,52	32-35
140	0,193	0,111	0,000	7,84-8,33	34-36
142	0,782	1,288	0,003	4,80-5,02	35-38
143	0,035	0,058	0,001	7,51-8,00	34-37
146	0,086	0,155	0,034	4,64-4,84	36-38
155	0,109	0,194	0,004	5,57-5,84	37-40
157	0,913	0,791	0,009	5,37-5,61	36-39
170	0,498	0,803	0,000	6,00-6,31	37-40
174	0,033	0,025	0,042	4,54-4,73	38-41
175	0,146	0,199	0,003	7,85-8,35	36-38
184	0,080	0,117	0,003	6,60-7,01	39-42
188	0,158	0,226	0,006	7,22-7,67	38-42
190	0,134	0,111	0,044	6,54-6,94	39-42
204	0,181	0,119	0,021	7,44-7,89	40-43
206	0,065	0,028	0,002	6,02-6,32	41-44
209	0,238	0,118	0,000	6,56-6,96	42-44
210	0,232	0,299	0,006	5,79-6,05	41-44
217	0,347	0,616	0,009	7,98-8,46	40-43
233	0,075	0,053	0,006	5,78-5,93	44-48
241	0,115	0,051	0,021	5,73-5,99	44-50
244	0,262	0,151	0,003	6,87-7,27	43-47
262	0,036	0,030	0,029	5,18-5,39	46-51
267	0,099	0,081	0,015	5,32-5,56	47-52
269	0,070	0,224	0,002	7,19-7,63	46-52

* ANOVA

continua

Match ID	A/J alta [F]	129P3/J alta [F]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
271	0,239	0,421	0,007	5,71-5,95	47-53
273	0,127	0,278	0,001	6,07-6,37	48-55
280	0,379	0,772	0,001	4,27-4,42	48-54
283	0,036	0,053	0,003	5,01-5,20	49-56
285	0,101	0,137	0,024	6,20-6,51	49-57
298	0,098	0,239	0,026	8,40-8,84	48-54
307	0,078	0,118	0,003	5,86-6,13	54-62
314	0,104	0,134	0,005	7,55-7,98	52-61
321	0,069	0,120	0,008	7,84-8,27	53-59
322	0,191	0,281	0,037	8,27-8,69	52-59
331	0,181	0,087	0,000	6,75-7,13	57-66
339	0,186	0,252	0,004	5,37-5,60	60-72
345	0,758	1,184	0,001	5,21-5,42	63-77
353	0,096	0,059	0,030	5,58-5,79	66-83
354	0,888	0,381	0,001	5,11-5,32	64-80
355	4,195	3,084	0,026	5,32-5,52	63-77
356	0,092	0,044	0,014	4,99-5,17	66-82
360	0,019	0,031	0,033	5,94-6,20	69-85
372	0,038	0,086	0,015	6,15-6,46	77-91
375	0,148	0,344	0,034	5,91-6,18	75-91
376	0,210	0,155	0,019	7,08-7,44	74-90
378	0,123	0,194	0,001	4,97-5,18	78-94
385	0,183	0,119	0,014	5,44-5,65	91-102
386	0,180	0,105	0,001	5,29-5,49	88-103
388	0,056	0,088	0,013	4,88-5,03	88-105
391	0,040	0,092	0,017	5,79-6,02	89-109
393	0,097	0,072	0,007	4,19-4,33	92-105
397	0,164	0,126	0,045	7,88-8,30	85-103
401	0,048	0,094	0,021	5,41-5,61	96-108
426	0,049	0,084	0,049	4,58-4,73	84-99
449	0,070	0,034	0,012	5,06-5,25	95-113
451	0,027	0,061	0,021	5,71-5,94	92-109
455	0,124	0,231	0,002	6,27-6,54	63-77
459	0,039	0,061	0,005	6,57-6,94	70-85
461	0,059	0,110	0,026	6,37-6,80	52-61
465	0,095	0,175	0,007	5,71-5,97	31-34
471	0,035	0,058	0,021	7,23-7,71	33-36
491	0,457	0,867	0,001	9,17-9,65	43-45
492	0,410	0,956	0,001	9,33-9,84	42-45
502	0,236	0,117	0,007	9,71-10,10	26-29
507		0,036	0,027	9,43-10,05	22-23
512	0,530	0,310	0,009	4,59-4,74	64-76
513	0,169	0,086	0,011	4,37-4,53	43-48

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J alta [F]	129P3/J alta [F]	p*	PI (min-máx)	PM (min-máx)
516		0,035	0,001	5,26-5,51	29-31
518	0,099	0,033	0,018	5,85-6,13	40-43
520	0,130	0,034	0,000	5,59-5,80	87-103
528	0,688	0,274	0,003	5,80-6,06	47-53
530	0,094	0,193	0,031	9,51-10,01	31-34
533		0,128	0,001	7,39-8,07	16-17
534		0,057	0,002	9,92-10,06	20-21
535		0,042	0,007	10,11-10,68	20-21
536		0,135	0,000	5,67-5,98	26-27
537		0,059	0,001	5,64-5,92	29-31
538		0,186	0,000	7,13-7,54	39-41
539		0,066	0,036	5,28-5,48	42-44
540		0,095	0,000	6,82-7,20	42-67
541		0,038	0,000	6,68-7,07	57-68
542		0,093	0,000	7,23-7,65	58-70
543		0,025	0,000	6,75-7,14	73-90
544		0,133	0,029	6,45-6,84	39-41
545		0,101	0,019	8,70-9,17	42-44
546		0,048	0,004	9,94-10,46	28-29
548		0,056	0,041	6,37-6,78	28-31
549		0,054	0,009	5,78-6,08	30-32
550		0,064	0,035	6,36-6,88	35-37
551		0,017	0,000	5,87-6,11	101-111
552		0,034	0,019	6,21-6,77	35-37
553		0,041	0,043	5,62-5,85	91-106
554		0,119	0,005	4,74-4,87	57-64
588		0,065	0,007	7,17-7,68	26-27
590		0,046	0,005	4,97-5,18	42-44
555	0,061		0,012	5,41-5,51	110-126
556	0,168		0,001	6,98-7,14	18
557	0,134		0,000	6,38-6,49	27-28
558	0,066		0,000	5,21-5,39	29-31
559	0,048		0,008	5,57-5,79	31-32
560	0,044		0,000	4,72-4,87	33-35
561	0,038		0,000	6,67-6,84	37-38
562	0,063		0,022	5,01-5,17	36-39
563	0,099		0,000	5,90-6,05	38-41
564	0,068		0,000	6,83-6,98	40-41
565	0,179		0,000	6,73-6,88	40-42
566	0,054		0,000	6,31-6,47	42-45
567	0,184		0,027	7,92-8,06	43-44
568	0,026		0,001	5,64-5,76	53-59

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J alta [F]	129P3/J alta [F]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
569	0,039		0,014	6,01-6,11	59-65
570	0,043		0,006	6,60-6,74	75-87
571	0,075		0,000	5,94-6,02	92-109
572	0,025		0,001	5,34-5,44	108-124
573	0,035		0,021	4,66-4,80	40-43
574	0,027		0,000	4,90-5,08	87-92
575	0,032		0,003	6,90-7,03	75-85
576	0,053		0,001	6,10-6,23	47-52
577	0,074		0,012	6,08-6,25	15
578	0,057		0,000	7,61-7,73	49-52
580	0,040		0,001	4,71-4,82	56-64
581	0,071		0,005	9,97-10,04	15
582	0,066		0,024	4,44-4,59	14-15
583	0,047		0,002	4,80-4,92	56-63

* ANOVA

conclusão

Figura 42 - Representação das comparações dos géis de proteínas renais diferencialmente expressas entre as linhagens de camundongos nos diferentes tratamentos.

5.2.2 Análise proteômica da urina

Para visualização dos spots de proteínas urinárias, da mesma forma como realizado para as proteínas renais, um total de 18 géis foram corados com azul de Coomassie coloidal G250 (2 linhagens x 3 tratamentos, em triplicata).

As figuras 43 e 44 mostram os géis representativos das proteínas urinárias de cada grupo de tratamento para as linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente.

Figura 43 - Géis bidimensionais representativos de proteínas urinárias de camundongos da linhagem A/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F] (B) e alta [F] (C). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 4-7 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.

Figura 44 - Géis bidimensionais representativos de proteínas urinárias de camundongos da linhagem 129P3/J dos grupos controle (A), grupo de baixa [F] (B) e alta [F] (C). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 4-7 linear, separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.

Utilizou-se o *Software Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare) para avaliar a expressão diferencial de proteínas. A detecção e o *matching* dos *spots* foram realizados automaticamente e manualmente. Foram detectados nos géis da linhagem A/J, 87 *spots* no grupo controle, 64 *spots* no grupo que ingeriu baixa [F⁻] e 47 *spots* no grupo que ingeriu alta [F⁻]. Para a linhagem 129P3/J o grupo controle apresentou 72 *spots*, o grupo de baixa [F⁻] 73 *spots* e o grupo de alta [F⁻] 77 *spots*.

A ANOVA detectou 84 *spots* com expressão diferencial alterada ($p < 0,05$) para o grupo controle, sendo 53 *spots* presentes ou superexpressos na linhagem A/J e ausentes ou subexpressos na linhagem 129P3/J e 31 *spots* ausentes ou subexpressos na linhagem A/J e presentes ou superexpressos na 129P3/J (Figura 45 e Tabela 17).

Para o grupo que recebeu baixa [F⁻], a ANOVA detectou 68 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$), sendo que 32 tiveram sua expressão aumentada ou apareceram e 36 desapareceram ou tiveram sua expressão reduzida para o gel da linhagem A/J, quando comparado com o da 129P3/J (Figura 46 e Tabela 18).

Quando se comparou o grupo que recebeu alta [F⁻], a ANOVA mostrou 66 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$). Destes, 20 *spots* estavam presentes ou superexpressos e 46 estavam ausentes ou subexpressos na linhagem A/J comparada com a 129P3/J (Figura 47 e Tabela 19).

Devido ao fato de nos animais da linhagem A/J ter havido uma grande diferença no número de *spots* detectados entre os grupos controle, e que ingeriram baixa ou alta [F⁻], também foi realizada uma comparação entre o grupo controle e o que ingeriu baixa [F⁻], bem como entre o grupo controle e o que ingeriu alta [F⁻]. Quando se comparou o grupo controle com o que ingeriu baixa [F⁻], foram observados 59 *spots* com expressão diferencial ($p < 0,05$), sendo que 41 tiveram sua expressão aumentada ou apareceram e 18 desapareceram ou tiveram sua expressão reduzida para o gel do grupo controle, quando comparado com o grupo que recebeu baixa [F⁻] (Tabela 20). Já quando se comparou o grupo controle com o que ingeriu alta [F⁻], a ANOVA mostrou 62 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$). Destes, 50 *spots* estavam presentes ou superexpressos e 12 estavam ausentes ou subexpressos no grupo controle comparado com o de alta [F⁻] (Tabela 21).

A Figura 48 mostra o perfil de expressão proteica diferencial na urina entre as linhagens A/J e 129P3/J. No grupo controle, foram observados 40 *spots* presentes

apenas na linhagem A/J e 26 presentes apenas na linhagem 129P3/J. Foram observados ainda 18 *spots* comuns a ambas as linhagens, mas com expressão diferencial. Para o grupo que recebeu baixa $[F^-]$, os números correspondentes foram 25, 33 e 10 *spots*, respectivamente. Já para o grupo que recebeu alta F^- , os números correspondentes foram 11, 42 e 13 *spots*, respectivamente.

Figura 45 - Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o *software Image Master 2D Platinum* revelaram 84 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo controle.

Figura 46 - Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o software *Image Master 2D Platinum* revelaram 68 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de baixa [F].

Figura 47 - Mapa bidimensional de proteínas urinárias diferencialmente expressas. Análises quantitativas usando o software *Image Master 2D Platinum* revelaram 66 spots de proteínas com diferença de expressão quando se comparou a linhagem A/J (A) com a linhagem 129P3/J(B) no grupo de alta [F].

Tabela 17 - Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo controle. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J controle	129P3/J controle	p*	pI (min-máx)	PM (min-máx)
1	0,172	0,081	0,005	6,22-6,28	13
2	0,289	0,109	0,003	6,71-6,88	14-15
8	0,042	0,066	0,049	5,35-5,43	19-20
10	75,877	88,143	0,001	4,70-4,86	19-20
11	0,044	0,019	0,001	5,54-5,66	23-25
13	1,002	0,470	0,032	4,18-4,36	24-25
14	0,174	0,017	0,000	5,53-5,64	27-28
16	0,195	0,026	0,000	5,75-5,88	27-29
18	0,266	0,063	0,003	4,47-4,67	27-30
21	0,028	0,019	0,039	5,53-5,70	89-92
22	0,043	0,021	0,015	5,60-5,80	89-95
24		0,022	0,000	5,51-5,59	66-70
32		0,010	0,012	5,75-5,82	37-38
33		0,010	0,000	5,87-5,95	34-35
35	0,030	0,014	0,006	5,76-5,81	25-27
43	5,186	0,791	0,015	4,39-5,51	23-24
44	2,772	1,244	0,039	4,28-4,43	23-24
46	0,143	0,043	0,000	4,10-4,29	32-33
48	0,099	0,182	0,007	4,21-4,39	27-28
49	0,054	0,103	0,006	4,30-4,45	27-28
52	0,168	0,347	0,014	4,74-4,87	37-42
55		0,012	0,036	6,02-6,10	34-36
56		0,010	0,002	5,48-5,54	46-48
57		0,012	0,000	5,28-5,33	51-53
58		0,012	0,000	5,31-5,36	91-96
59		0,028	0,011	5,93-6,07	91-95
67		0,211	0,000	5,66-5,74	69-73
68		0,048	0,013	5,80-5,91	69-74
69		0,056	0,001	5,59-5,66	70-74
70		0,021	0,000	5,53-5,59	69-75
71		0,020	0,000	5,60-5,67	62-69
72		0,023	0,000	5,58-5,64	62-64
73		0,013	0,020	5,63-5,68	38-39
130		0,078	0,006	6,73-6,79	17
131		0,028	0,000	5,71-5,79	80-85
132		0,022	0,002	5,60-5,67	81-85
133		0,021	0,010	5,50-5,57	81-85
134		0,016	0,001	5,50-5,45	91-95
135		0,022	0,000	5,54-5,60	102

* ANOVA

continua

Match ID	A/J Controle	129P3/J controle	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
136		0,030	0,000	5,74-5,83	101-102
137		0,028	0,000	5,63-5,70	101
138		0,016	0,001	5,44-5,50	102-103
139		0,018	0,000	5,35-5,41	103
140		0,020	0,000	5,83-5,94	100-101
39	0,032		0,008	5,31-5,39	14-15
74	0,033		0,000	6,00-6,18	25-26
77	0,649		0,011	4,78-4,88	35
78	0,129		0,006	4,69-4,80	37-38
79	0,105		0,029	4,59-4,70	37-38
80	0,128		0,018	4,81-4,89	38
81	1,345		0,002	4,34-4,65	68-73
83	0,157		0,038	6,76-6,87	12-13
84	0,037		0,000	5,35-5,42	12-13
85	0,025		0,002	5,28-5,35	12-13
86	0,018		0,001	5,47-5,54	18-19
87	0,023		0,000	5,03-5,11	30
89	0,014		0,013	4,96-5,04	31
150	0,195		0,002	4,13-4,18	19
151	0,048		0,000	6,14-6,30	31-32
152	0,034		0,000	4,94-5,06	12-13
153	0,319		0,008	4,00-4,06	19
154	0,057		0,002	5,78-5,89	13-14
155	0,035		0,023	5,71-5,80	13-14
156	0,020		0,000	5,10-5,17	24
157	0,024		0,000	5,26-5,33	24
158	0,015		0,014	5,17-5,25	26
159	0,027		0,037	5,91-5,99	27
160	0,111		0,000	4,92-5,01	26
161	0,054		0,000	5,24-5,32	27
162	0,041		0,013	5,31-5,38	27
163	0,052		0,000	5,43-5,51	27-28
164	0,052		0,000	5,08-5,16	28
165	0,075		0,001	5,23-5,30	28-29
166	0,051		0,002	5,03-5,11	28-29
167	0,060		0,000	4,49-4,58	29-30
168	0,163		0,006	4,87-4,97	29
169	0,159		0,000	4,73-4,86	28-29
170	0,078		0,020	4,28-4,32	30
171	0,068		0,002	4,34-4,38	30

* ANOVA

continuação

Match ID	A/J Controle	129P3/J controle	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
172	0,054		0,018	4,42-4,49	30
173	0,045		0,001	4,90-4,98	31
174	0,059		0,001	4,78-4,91	32
175	0,054		0,002	4,63-4,75	32
176	0,071		0,000	4,25-4,30	19

* ANOVA

conclusão

Tabela 18 - Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de baixa [F⁻]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J baixa [F ⁻]	129P3/J baixa [F ⁻]	p*	pI (min-máx)	PM (min-máx)
3	0,099	0,044	0,036	5,28-5,38	16
6	0,080	0,034	0,032	5,54-5,65	16-17
7	0,264	0,703	0,017	4,67-4,84	16-17
12	1,040	0,459	0,018	4,13-4,35	23-24
28	0,137	0,095	0,020	6,01-6,15	42-46
32	0,010	0,046	0,005	5,80-5,90	37-38
33	0,013	0,045	0,013	5,92-6,03	34-35
37	0,117	0,034	0,012	5,36-5,47	18-19
43	3,635	1,427	0,025	4,42-4,57	23-24
44	3,324	1,898	0,010	4,35-4,49	23-24
51		0,032	0,000	5,98-6,14	25-27
55		0,035	0,030	6,07-6,18	34-36
56		0,011	0,000	5,52-5,60	45-48
57		0,012	0,000	5,30-5,38	51-53
60		0,014	0,011	6,02-6,14	63-71
61		0,020	0,021	5,73-5,84	35-37
62		0,017	0,009	5,20-5,29	39-40
63		0,079	0,010	5,26-5,36	30-31
64		0,025	0,025	4,38-4,54	42-43
65		0,037	0,023	4,16-4,37	42-43
67		0,097	0,019	5,70-5,79	66-78
68		0,020	0,012	5,86-5,96	67-79
69		0,032	0,014	5,63-5,72	67-78
70		0,016	0,003	5,57-5,66	67-78
71		0,014	0,004	5,63-5,73	65-73
72		0,039	0,019	5,63-5,71	60-66
73		0,045	0,002	5,67-5,76	38-40
113		0,011	0,000	5,68-5,77	37-39
114		0,207	0,000	4,73-4,82	38
115		0,011	0,015	5,37-5,46	32-34
116		0,022	0,002	4,97-5,05	29-31
117		0,009	0,016	5,79-5,89	62-70
118		0,047	0,001	4,59-4,71	15-16
120		0,077	0,016	4,70-4,76	29-30
121		0,028	0,003	5,09-5,17	29-31
122		0,035	0,038	5,72-5,82	34-35

* ANOVA

continua

Match ID	A/J baixa [F']	129P3/J baixa[F']	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
123		0,011	0,004	5,55-5,64	38-40
124		0,014	0,003	5,04-5,12	40-41
125		0,009	0,007	5,42-5,51	46-49
126		0,011	0,000	5,62-5,70	55-60
127		0,014	0,024	5,78-5,88	59-64
128		0,017	0,015	5,71-5,80	60-65
129		0,016	0,038	5,32-5,41	91-102
2	0,497		0,000	6,77-6,85	14-15
16	0,024		0,007	5,82-5,85	27-28
25	0,017		0,004	5,72-5,78	60-63
26	0,010		0,033	5,71-5,78	58-61
31	0,011		0,012	5,67-5,86	38-40
39	0,040		0,001	5,33-5,41	14
42	0,030		0,009	4,25-4,32	17
74	0,052		0,022	6,07-6,12	25-26
75	0,022		0,018	5,21-5,24	37-38
76	0,011		0,024	6,59-6,62	30-31
77	0,136		0,047	4,75-4,79	34-35
78	0,079		0,002	4,74-4,79	38-39
79	0,083		0,001	4,64-4,70	37-38
80	0,078		0,006	4,87-4,90	38-39
81	3,618		0,000	4,47-4,50	65-72
82	0,067		0,007	4,92-4,94	12-13
83	0,163		0,007	6,74-6,84	12-13
86	0,022		0,011	5,49-5,54	18-19
87	0,039		0,001	4,97-5,10	30-31
88	0,012		0,001	6,65-6,68	28-29
89	0,041		0,027	4,94-5,02	31-32
145	0,074		0,029	5,75-5,80	21
146	0,068		0,045	4,56-4,58	12
147	0,035		0,001	4,43-4,48	15
149	0,024		0,007	5,62-5,69	56-59

* ANOVA

conclusão

Tabela 19 - Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa entre camundongos da linhagem A/J e 129P3/J no grupo de alta [F⁻]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J alta [F ⁻]	129P3/J alta [F ⁻]	p*	pI (min-máx)	PM (min-máx)
4	0,031	0,021	0,049	6,31-6,41	16-17
7	0,292	0,971	0,010	4,67-4,86	16-17
10	79,202	88,285	0,024	4,74-4,86	19-20
12	1,099	0,357	0,026	4,09-4,33	23-24
13	1,146	0,512	0,046	4,17-4,38	24-25
14		0,011	0,000	5,48-5,49	26-29
18		0,025	0,046	4,51-4,62	29-30
21		0,020	0,005	5,47-5,57	95-101
22		0,023	0,014	5,58-5,69	94-103
25	0,020	0,125	0,001	5,65-5,80	59-66
27	0,201	0,060	0,001	5,73-5,90	43-45
30	0,100	0,047	0,018	6,40-6,56	41-42
31		0,031	0,000	5,62-5,68	39-40
32		0,022	0,000	5,75-5,82	37-39
33		0,019	0,000	5,88-5,94	34-35
38		0,015	0,004	5,60-5,61	18
39	0,082	0,018	0,040	5,27-5,34	14-15
43	4,160	1,026	0,045	4,39-4,54	23-24
44	3,189	1,406	0,041	4,27-4,46	23-24
45	1,634	0,815	0,022	4,19-4,28	23-24
50	0,100	0,552	0,043	4,79-4,90	43-51
55		0,023	0,002	6,03-6,11	34-36
56		0,014	0,001	5,47-5,53	46-49
57		0,008	0,004	5,27-5,32	51-53
58		0,029	0,024	5,38-5,46	86-98
59		0,027	0,024	5,94-6,07	86-100
60		0,011	0,000	5,99-6,11	66-71
62		0,027	0,001	5,20-5,21	38-40
63		0,035	0,000	5,25-5,26	30-31
64		0,041	0,008	4,37-4,38	42-44
65		0,027	0,024	4,16-4,20	42-43
66		0,030	0,012	4,26-4,27	42-43
90		0,028	0,031	5,07-5,09	28-30
91		0,034	0,024	4,90-4,94	34-35
92		0,024	0,007	6,49-6,61	27-29

* ANOVA

continua

Match ID	A/J alta [F ⁻]	129P3/J alta [F ⁻]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
93		0,010	0,004	5,51-5,56	39-40
94		0,013	0,017	5,48-5,55	57-60
95		0,013	0,007	5,40-5,47	57-59
96		0,012	0,002	5,43-5,50	62-65
97		0,012	0,005	5,52-5,60	71-79
98		0,010	0,003	5,12-5,13	32-33
99		0,017	0,008	5,00-5,03	33-34
100		0,050	0,004	4,66-4,78	14
101		0,040	0,001	4,52-4,67	15-16
102		0,043	0,011	4,65-4,72	29-31
103		0,008	0,003	5,03-5,05	41-42
104		0,017	0,003	5,38-5,44	47-49
105		0,018	0,005	5,74-5,83	60-65
106		0,017	0,007	5,65-5,74	62-66
107		0,009	0,002	5,75-5,84	64-71
108		0,024	0,019	5,81-5,92	71-79
109		0,078	0,001	5,65-5,75	68-79
110		0,036	0,013	5,58-5,68	69-80
111		0,047	0,006	5,31-5,36	87-97
112		0,058	0,024	5,17-5,18	37-38
74	0,092		0,001	6,10-6,11	25
75	0,024		0,002	5,22-5,25	37
78	0,112		0,004	4,74-4,84	37-38
79	0,085		0,000	4,64-4,70	37-38
80	0,102		0,003	4,87-4,93	37-38
81	3,637		0,002	4,46-4,88	68-70
88	0,023		0,008	6,56-6,59	26-27
141	0,097		0,034	4,42-4,51	45-46
142	0,015		0,002	5,79-5,80	49-52
143	0,065		0,026	4,91-4,93	12-13
144	0,022		0,000	5,67-5,69	54-57

* ANOVA

conclusão

Tabela 20 - Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa de camundongos da linhagem A/J do grupo controle comparado com o de baixa [F⁻]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J Controle	A/J baixa[F ⁻]	p*	pI (min-máx)	PM (min-máx)
2	0,289	0,497	0,002	6,77-6,88	14-15
14	0,174	0,016	0,000	5,55-5,64	27-28
16	0,195	0,024	0,000	5,77-5,88	27-28
24		0,013	0,003	5,63-5,70	61-64
25		0,017	0,004	5,72-5,78	60-63
26		0,010	0,033	5,71-5,78	58-61
31		0,011	0,012	5,67-5,72	38-40
32		0,010	0,006	5,84-5,86	37-38
38		0,029	0,000	5,64-5,70	18
40		0,040	0,000	4,51-4,54	14
75		0,022	0,018	5,21-5,24	37-38
76		0,011	0,024	6,59-6,62	30-31
77	0,649	0,136	0,029	4,78-4,88	35
81	1,345	3,618	0,001	4,34-4,50	65-72
87	0,023	0,039	0,029	5,03-5,11	30-31
88		0,012	0,001	6,65-6,68	28-29
145		0,074	0,029	5,75-5,80	21
146		0,068	0,045	4,56-4,58	12
147		0,035	0,001	4,43-4,48	15
149		0,024	0,007	5,62-5,69	56-59
1	0,172		0,000	6,27-6,40	13-14
11	0,044		0,000	5,60-5,66	23
17	0,065		0,017	4,17-4,21	28-29
18	0,266		0,001	4,57-4,69	29-30
35	0,030		0,000	5,77-5,87	25-26
36	0,027		0,011	5,55-5,64	25-26
41	0,048		0,004	4,14-4,19	17
46	0,143		0,000	4,12-4,15	32-33
47	0,077		0,006	4,15-4,18	32
48	0,099		0,000	4,24-4,28	28
49	0,054		0,001	4,32-4,37	27
51	0,041		0,000	5,79-5,90	23-24
150	0,195		0,002	4,13-4,18	19
151	0,048		0,000	6,14-6,30	31-32
152	0,034		0,000	4,49-5,06	12-13

* ANOVA

continua

Match ID	A/J controle	A/J baixa[F]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
153	0,319		0,008	4,00-4,06	19
154	0,057		0,002	5,78-5,89	13-14
155	0,035		0,023	5,71-5,80	13-14
156	0,020		0,000	5,10-5,17	24
157	0,024		0,000	5,26-5,33	24
158	0,015		0,014	5,17-5,25	26
159	0,027		0,037	5,87-5,99	27
160	0,111		0,000	4,92-5,01	26
161	0,054		0,000	5,24-5,32	27
162	0,041		0,013	5,31-5,38	27
163	0,052		0,000	5,43-5,51	27-28
164	0,052		0,000	5,08-5,16	28
165	0,075		0,001	5,23-5,30	28-29
166	0,051		0,002	5,03-5,11	28-29
167	0,060		0,000	4,49-4,58	29
168	0,163		0,006	4,87-4,97	29
169	0,159		0,000	4,73-4,86	28-29
170	0,078		0,020	4,28-4,32	30
171	0,068		0,002	4,34-4,41	30
172	0,054		0,018	4,42-4,49	30
173	0,045		0,001	4,90-4,98	31
174	0,059		0,001	4,78-4,91	32
175	0,054		0,002	4,63-4,75	32
176	0,071		0,000	4,25-4,30	19

*ANOVA

conclusão

Tabela 21 - Proteínas urinárias com diferença de expressão significativa de camundongos da linhagem A/J do grupo controle comparado com o de alta [F⁻]. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot* e os valores mínimo e máximo de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

Match ID	A/J Controle	A/J alta [F ⁻]	p*	PI (min-máx)	PM (min-máx)
24		0,013	0,004	5,68-5,69	60-62
25		0,020	0,000	5,78-5,80	59-62
26		0,008	0,013	5,78-5,79	59
40		0,056	0,001	4,47-4,52	14
74	0,033	0,092	0,005	6,00-6,18	25-26
75		0,024	0,002	5,22-5,25	37
81	1,345	3,637	0,012	4,34-4,88	66-73
88		0,023	0,008	6,56-6,59	27
141		0,097	0,034	4,42-4,51	45-46
142		0,015	0,002	5,79-5,80	49-52
143		0,065	0,026	4,91-4,93	12-13
144		0,022	0,000	5,67-5,69	54-57
1	0,172		0,000	6,27-6,40	13-14
11	0,044		0,000	5,57-5,66	23
14	0,174		0,000	5,55-5,64	27
16	0,195		0,000	5,77-5,88	27-28
17	0,065		0,017	4,17-4,21	28-29
18	0,266		0,001	4,57-4,69	29-30
21	0,028		0,001	5,60-5,70	89-92
22	0,043		0,001	5,75-5,84	89-91
35	0,030		0,000	5,77-5,87	25-26
36	0,027		0,011	5,55-5,64	25-26
41	0,048		0,004	4,14-4,19	17
42	0,035		0,001	4,32-4,38	17
46	0,143		0,000	4,12-4,15	32-33
47	0,077		0,006	4,15-4,18	31-32
48	0,099		0,000	4,24-4,28	28
49	0,054		0,001	4,32-4,37	27
51	0,041		0,000	5,79-5,90	23-24
83	0,157		0,038	6,76-6,87	12-13
84	0,037		0,000	5,35-5,42	12-13
85	0,025		0,002	5,28-5,35	12-13
86	0,018		0,001	5,47-5,54	18-19
87	0,023		0,000	5,03-5,11	30
89	0,014		0,013	4,96-5,04	31

*ANOVA

continua

Match ID	AJ controle	A/J alta [F]	p*	pl (min-máx)	PM (min-máx)
150	0,195		0,002	4,13-4,18	19
151	0,048		0,000	6,14-6,30	31-32
152	0,034		0,000	4,94-5,06	12-13
153	0,319		0,008	4,00-4,06	19
154	0,057		0,002	5,78-5,89	12-14
155	0,035		0,023	5,71-5,80	13-14
156	0,020		0,000	5,10-5,17	24
157	0,024		0,000	5,26-5,33	24
158	0,015		0,014	5,17-5,25	26
159	0,027		0,037	5,87-5,99	27
160	0,111		0,000	4,92-5,01	26
161	0,054		0,000	5,24-5,32	27
162	0,041		0,013	5,31-5,38	27
163	0,052		0,000	5,43-5,51	27-28
164	0,052		0,000	5,08-5,16	28
165	0,075		0,001	5,23-5,30	28-29
166	0,051		0,002	5,03-5,11	28-29
167	0,060		0,000	4,49-4,58	29-30
168	0,163		0,006	4,87-4,97	29
169	0,159		0,000	4,73-4,86	28-29
170	0,078		0,020	4,28-4,32	30
171	0,068		0,002	4,34-4,41	30
172	0,054		0,018	4,42-4,49	30
173	0,045		0,001	4,90-4,98	31
174	0,059		0,001	4,78-4,91	32
175	0,054		0,002	4,63-4,75	32
176	0,071		0,000	4,25-4,30	19

*ANOVA

conclusão

Figura 48 - Representação das comparações dos géis de proteínas urinárias diferencialmente expressas entre as linhagens de camundongos nos diferentes tratamentos.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O metabolismo do F^- pelas duas linhagens de camundongos neste estudo apresentou diferenças significativas em vários aspectos. O principal objetivo de estudar o metabolismo destes animais foi determinar se essas diferenças existiam e, em caso afirmativo, se poderiam, pelo menos parcialmente, explicar a diferença na suscetibilidade à fluorose dentária previamente relatada por Everett et al (2002).

A primeira diferença encontrada foi que os camundongos A/J ingeriram mais ração e beberam mais água do que os animais da linhagem 129P3/J (Tabela 8). Inicialmente pensou-se que esta diferença, por si só, poderia ter esclarecido a suscetibilidade à fluorose dentária comunicada por Everett et al., em 2002, uma vez que, nesse estudo, as concentrações de F^- na água não foram alteradas de forma a assegurar que os animais de ambas as linhagens ingerissem a mesma quantidade de F^- , ou seja, a quantidade de água e ração ingerida não foi analisada. Por causa da diferença de água ingerida entre as duas linhagens, as concentrações de F^- na água dos animais da linhagem A/J foram ajustadas semanalmente no presente trabalho, na tentativa de fornecer quantidades similares de F^- para as duas linhagens. Conforme mostrado na tabela 9, a única diferença estatisticamente significativa foi encontrada no grupo que ingeriu alta $[F^-]$, sendo que os animais 129P3/J ingeriram 7,4% a mais de F^- que os da linhagem A/J. Além disso, deve-se notar que a maior quantidade de água (e F^-) ingerida pelos camundongos A/J nas primeiras duas semanas não poderia ter influenciado os resultados da fluorose dentária, uma vez que os incisivos dos camundongos têm crescimento contínuo e são completamente renovados em 35 a 45 dias (ZEGARELLI, 1944).

Outra diferença entre as linhagens foi que a razão entre o volume de urina excretada e a quantidade de água ingerida pelos camundongos A/J foi 33% menor quando comparada com a razão observada para a linhagem 129P3/J. De fato, tem sido relatado que os animais da linhagem A/J apresentam subexpressão de receptores $P2X_3$. Camundongos nos quais estes receptores foram deletados mostram uma resposta atenuada à distensão da bexiga, necessitando de um volume maior de urina para provocar a micção (VLASKOVSKA, KASAKOV, RONG *et al.*, 2001; TSUDA, SHIGEMOTO-MOGAMI, UENO *et al.*, 2002), o que explicaria a menor razão entre o volume de urina excretada e quantidade de água ingerida observada na linhagem A/J.

Em adição, apesar de as ingestões de F^- entre as duas linhagens serem similares ou até mesmo ligeiramente maiores na linhagem 129P3/J, a excreção urinária e total de F^- pelos animais desta linhagem foi menor quando comparada com aquela dos camundongos da linhagem A/J. Essa diferença foi mais acentuada no grupo de baixa $[F^-]$ por motivos que os dados do presente estudo não permitem determinar. Sabe-se que isto não foi devido a problemas com as gaiolas, tubos de coleta de urina, garrafas de água ou tampas de garrafas de água. A diferença pode ter sido devida a um pH urinário menor. O pH urinário é um dos principais determinantes do *clearance* renal do F^- (WHITFORD, 1996), mas esta variável não foi medida no presente estudo. Foram observados 126 *spots* protéicos com expressão diferencial no tecido renal entre as duas linhagens de camundongos, quando expostos a baixa $[F^-]$. Também foram observados 68 *spots* protéicos com expressão diferencial na urina na mesma condição. É possível que alguma destas proteínas diferencialmente expressas, quando identificada, ajude a esclarecer esta questão.

A retenção de F^- e a porcentagem de F^- ingerido que foi retido nos grupos de baixa e de alta $[F^-]$ foram maiores nos animais 129P3/J. Essa diferença refletiu na maior concentração de F^- no plasma e no fêmur (Tabela 11), apesar do fato de que nas duas primeiras semanas de estudo, a linhagem A/J ingeriu uma quantidade de F^- muito mais alta quando comparada à linhagem 129P3/J, até que fosse iniciado o ajuste da concentração de F^- na água fornecida aos animais. Os dados de $[F^-]$ encontrados no plasma e no fêmur são consistentes com os dados de excreção e retenção de F^- , ou seja, os animais da linhagem 129P3/J apresentam uma tendência de excretarem menos F^- através da urina, o que levaria a uma maior retenção de F^- , consequentemente elevando os níveis de F^- encontrados no plasma e no fêmur. Uma vez que as condições experimentais foram estritamente controladas nesse estudo metabólico e a ingestão de F^- pelos animais de ambas as linhagens foi semelhante, pode-se concluir que essas diferenças no metabolismo do F^- , sua concentração plasmática e incorporação nos tecidos calcificados são devidas ao “background” genético dos animais. No trabalho de Everett et al. (2002) não se observaram diferenças significativas nas concentrações de F^- presentes no fêmur dos animais da linhagem A/J expostos a água contendo 50 ppm de F^- , quando comparados àqueles da linhagem 129P3/J, expostos à mesma concentração. Deve ser destacado que o estudo de Everett et al. (2002) não teve características

metabólicas, ou seja, o consumo de água e ração não foi controlado e nem a excreção de F^- avaliada. Consequentemente, não foi feito o ajuste da concentração de F^- presente na água administrada aos animais. O presente estudo mostrou que os animais da linhagem A/J ingerem um volume de água maior que aquele ingerido pelos animais da linhagem 129P3/J. Portanto, no estudo de Everett et al. (2002), deve ter havido uma maior ingestão de F^- através da água pelos animais da linhagem A/J quando comparados aos da linhagem 129P3/J, o que explica a ausência de diferença na concentração de F^- no fêmur entre as duas linhagens.

Já num trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (MOUSNY, BANSE, WISE *et al.*, 2006), os camundongos da linhagem 129P3/J, expostos a baixas doses de F^- , apresentaram uma maior concentração de F^- no osso em relação à linhagem A/J, à semelhança dos resultados do presente estudo. Segundo os autores, os mecanismos envolvidos não são conhecidos, mas provavelmente envolvem alterações na função renal ou na remodelação óssea da linhagem resistente (129P3/J). Embora cada linhagem tenha demonstrado um aumento dose-dependente significativo da $[F^-]$ no fêmur e na vértebra, como o tratamento com F^- não afetou nem a macro arquitetura óssea, nem a densidade mineral nas três linhagens, esses fatores não poderiam explicar as variações nas propriedades mecânicas ósseas observadas entre as três linhagens avaliadas, ou seja, alterações significativas na qualidade óssea (avaliada por testes mecânicos) na linhagem A/J e ausência de alterações na linhagem 129P3/J. Esses resultados sugerem que fatores genéticos podem contribuir para variações na resposta óssea à exposição ao F^- e que o F^- afeta as propriedades ósseas sem, contudo, alterar a densidade mineral óssea. Num estudo subsequente, Mousny et al. (2008) confirmaram que as diferenças nas propriedades mecânicas ósseas observadas entre estas linhagens de camundongos não são afetadas pela microarquitetura, avaliada por microtomografia computadorizada e microdureza. Um achado interessante foi o menor tamanho dos cristalitos ósseos na linhagem 129P3/J, e isto poderia ser devido à interface mineral-orgânica mais forte, o que sugere um crescimento mais lento do cristal, diminuindo o seu tamanho. O menor tamanho dos cristais ósseos poderia levar a uma área superficial de contato maior, o que facilitaria a incorporação de F^- no osso. A menor excreção urinária encontrada em crianças tem sido atribuída a uma maior incorporação de F^- no esqueleto em desenvolvimento, uma vez que os cristais ósseos menores e mais desorganizados proporcionariam uma área superficial maior

para a incorporação de F^- no osso (WHITFORD, 1996). O fato de que a linhagem 129P3/J tem o osso mais resistente e com cristais de menor tamanho sugere que estes animais têm uma ligação de interface mineral-orgânica mais forte e isto tem um importante papel na qualidade óssea (MOUSNY, OMELON, WISE *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que quando o presente projeto de pesquisa foi idealizado, na tentativa de investigar se alterações no metabolismo do F^- pelos animais poderiam explicar os diferentes níveis de fluorose dentária que são observados quando os mesmos são expostos ao F^- , a hipótese era de que os animais da linhagem A/J, que têm sido relatados como “suscetíveis” à fluorose dentária (EVERETT, MCHENRY, REYNOLDS *et al.*, 2002), bem como aos efeitos do F^- no tecido ósseo (MOUSNY, BANSE, WISE *et al.*, 2006; MOUSNY, OMELON, WISE *et al.*, 2008), deveriam excretar menos F^- e conseqüentemente reter mais este elemento, o que elevaria os níveis de F^- plasmáticos, deixando, portanto, os tecidos dentários e ósseos mais expostos ao F^- . Para nossa surpresa, o estudo metabólico mostrou exatamente o oposto, ou seja, os animais da linhagem 129P3/J que excretam menos F^- pela urina e retêm mais F^- , tendo níveis de F^- plasmáticos e no tecido ósseo maiores. Apesar de ficarem mais expostos ao F^- , esses animais têm resistência ao desenvolvimento de fluorose dentária, como pode ser observado na tabela 13.

Na verdade, é necessário ainda determinar se existe realmente uma tendência dos animais da linhagem 129P3/J em reduzirem a excreção urinária de F^- , ou se a menor excreção urinária de F^- ocorre porque há uma maior retenção de F^- que fica incorporado aos tecidos calcificados. Observando-se a tabela 11, nota-se que, ao contrário do descrito para a excreção urinária de F^- para a linhagem 129P3/J, com relação à retenção de F^- por essa linhagem no grupo de baixa concentração de F^- na água não houve um aumento significativo, quando comparado à linhagem A/J, o que sugere que a diferença metabólica entre as duas linhagens é primariamente devida a diferentes padrões de excreção urinária de F^- . Entretanto, deve ser considerado que para o cálculo da retenção de F^- , consideram-se as quantidades ingeridas e excretadas tanto pela urina e pelas fezes. Assim, os parâmetros de ingestão e excreção fecal de F^- podem ter afetado os resultados de retenção, impedindo que fossem detectadas diferenças significativas entre as duas linhagens no grupo que recebeu baixa concentração de F^- na água.

Em virtude do exposto, é fundamental a determinação, em estudos futuros, se a diferença no metabolismo do F^- entre as duas linhagens se dá primariamente na

capacidade do organismo em excretar o F^- pela urina, ou em reter o F^- pela sua incorporação aos tecidos calcificados (principalmente tecido ósseo). A análise de proteínas diferencialmente expressas nos tecidos renal e ósseo poderá trazer uma contribuição importante para esta questão. Conforme observado no presente estudo, há uma diferença inerente às linhagens A/J e 129P3/J na expressão de proteínas renais e urinárias. Mesmo na ausência de F^- (grupo controle), foram observados, nos rins, 122 *spots* protéicos com expressão diferencial entre as linhagens, enquanto que na urina foram observados 84 *spots* protéicos na mesma situação. O tratamento com F^- elevou um pouco o número de *spots* protéicos com expressão diferencial entre as linhagens para os rins (128 para o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ e 132 para o grupo que recebeu alta $[F^-]$), mas reduziu (68 para o grupo que recebeu baixa $[F^-]$ e 66 para o grupo que recebeu alta $[F^-]$) para a urina. É curioso notar que os animais da linhagem A/J apresentaram o maior número de *spots* exclusivos nos rins em todas as situações (35 para o grupo controle, 34 para o que recebeu baixa $[F^-]$ e 27 para o que recebeu alta $[F^-]$). Os números correspondentes para a linhagem 129P3/J foram 21, 20 e 25 *spots*, respectivamente (Figura 42). A mesma tendência foi observada na análise proteômica da urina, ou seja 40 *spots* exclusivos para a linhagem A/J no grupo controle, 25 para o grupo de baixa $[F^-]$ e 11 para o grupo de alta $[F^-]$, respectivamente, contra 26, 33 e 42 para a linhagem 129P3/J (Figura 48). A identificação destas proteínas com expressão diferencial, que será feita numa próxima etapa, será fundamental para esclarecer o papel do sistema renal nas diferenças no metabolismo do F^- entre estas duas linhagens de camundongos.

Além das diferenças no metabolismo, na concentração de F^- nos tecidos e na expressão diferencial de proteínas renais e urinárias, os resultados clínicos e de fluorescência quantitativa confirmam que os dentes dos animais da linhagem 129P3/J são mais resistentes aos efeitos do F^- (EVERETT et al, 2002), mas os mecanismos envolvidos nesta resistência/suscetibilidade, em especial os genes candidatos e suas respectivas proteínas, ainda não foram determinados.

Recentemente, foi realizado um estudo com as linhagens A/J e 129P3/J, com o objetivo de determinar qual parte do genoma destes camundongos carregaria a suscetibilidade à fluorose. Foi detectada uma associação entre fluorose dentária e *locus* de características quantitativas (QTL) nos cromossomos 2 e 11. Em adição, a falta de evidência de associação significativa observada nos cromossomos X, 3, 5, 7 ou 9 sugere um pequeno papel da amelogenina, ameloblastina, enamelina,

amelotina, calicreína 4 e MMP-20 (EVERETT, YAN, WEAVER *et al.*, 2009), que seriam as maiores candidatas, em virtude do conhecimento atual acerca do mecanismo de ocorrência da fluorose dentária (AOBA e FEJERSKOV, 2002). Outro dado interessante do estudo de Everett *et al.* (2009) foi que o exame histológico do esmalte de maturação mostrou que o tratamento com F^- resultou em acúmulo de amelogeninas nos camundongos A/J, mas não nos camundongos 129P3/J, mesmo na ausência de exposição ao F^- , o que sugere uma diferença inerente na formação do esmalte dentário entre as duas linhagens (EVERETT, YAN, WEAVER *et al.*, 2009).

A suscetibilidade genética à fluorose dentária também tem sido investigada em humanos recentemente, tendo sido observadas associações entre o genótipo osteopontina (*OPN12*) (DAWSON, LEVY, WARREN *et al.*, 2006) e tuftelina (*TUFT1*) (DAWSON, XIAO, LEVY *et al.*, 2008) e fluorose dentária.

Estudos envolvendo epigenética, igualmente, têm sido feitos. Num estudo caso-controle com crianças de 8 a 12 anos de idade com e sem fluorose dentária, foi observado que as crianças portadoras do genótipo homozigoto PP do polimorfismo PvuII no gene *COL1A2* (colágeno tipo 1 α -2) tinham um risco aproximadamente 5 vezes maior de desenvolverem fluorose dentária, quando comparadas com as portadoras do genótipo homozigoto pp, moradoras numa área de fluorose endêmica, mas este risco aumentado não foi observado nos residentes numa comunidade não endêmica (HUANG, BA, CUI *et al.*, 2008). O gene para o colágeno tipo I não tem sido em geral incluso entre os genes normalmente expressos por ameloblastos em quaisquer estágios de formação. Recentemente, Chen *et al.* (2009) relataram um aumento de duas vezes na expressão de colágeno tipo I em culturas primárias de ameloblastos expostas ao cálcio, e sugeriram que esta proteína possa ser um marcador do estágio inicial das células epiteliais do órgão do esmalte (CHEN, ZHANG, MENDOZA *et al.*, 2009). Portanto, pode ser que realmente exista uma implicação desta proteína na patogênese da fluorose. Um estudo proteômico da matriz do esmalte nas linhagens de animais avaliadas no presente trabalho seria bastante instrutivo a este respeito.

Os dados obtidos no presente estudo mostram que a exposição ao F^- altera o padrão de expressão protéica, tanto no tecido renal, quanto na urina, em ambas as linhagens de camundongos. Esta alteração é dose-dependente e é caracterizada por uma redução no número de *spots* exclusivos para a linhagem A/J e um aumento

neste número para a linhagem 129P3/J, com o aumento da exposição ao F^- . Em adição, os efeitos da exposição ao F^- nos *spots* exclusivos são bem mais pronunciados na urina que no tecido renal (Figuras 42 e 48). Esta informação é de alta relevância, uma vez que estas proteínas exclusivas, uma vez tendo suas homólogas detectadas em humanos poderão ser importantes biomarcadores que poderão ajudar a identificar, no futuro, indivíduos com maior ou menor suscetibilidade aos efeitos do F^- no organismo, já que a coleta de urina é fácil e não invasiva.

Pode-se especular que a resistência das células que produzem tecidos mineralizados (esmalte ou osso) aos efeitos do F^- pode ser uma consequência da alteração no metabolismo do F^- a nível renal, ou seja, a maior retenção de F^- que os animais da linhagem 129P3/J possuem elevaria os níveis circulantes de F^- . Com isto, os ameloblastos e osteoblastos desenvolvem um mecanismo de resistência aos efeitos do F^- .

A identificação das proteínas renais diferencialmente expressas detectadas entre as duas linhagens de camundongos com diferentes suscetibilidades à fluorose dentária contribuirá sobremaneira para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência/suscetibilidade. A identificação das proteínas urinárias diferencialmente expressas nestas linhagens é de especial interesse. Em especial as proteínas ausentes numa linhagem e presentes em outra, que foram observadas mesmo na ausência de exposição ao F^- , seriam potenciais candidatas a biomarcadores de suscetibilidade à fluorose dentária, tendo suas homólogas identificadas em humanos, uma vez que a coleta de urina é um procedimento não invasivo e fácil de ser realizado.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

- Houve diferença no metabolismo do F^- entre as duas linhagens:
 - A ingestão total de F^- não diferiu significativamente entre as linhagens, exceto para o grupo que ingeriu alta $[F^-]$, onde foi significativamente maior para a linhagem 129P3/J;
 - Os animais da linhagem 129P3/J excretaram uma quantidade significativamente menor de F^- nos grupos que ingeriram F^- .
 - A retenção de F^- foi significativamente maior para os animais da linhagem 129P3/J que ingeriram alta $[F^-]$, quando comparados aos animais da linhagem A/J na mesma condição;
 - Os níveis de F^- encontrados no plasma e fêmur dos animais da linhagem 129P3/J que ingeriram alta $[F^-]$ foram significativamente maiores, quando comparados aos animais da linhagem A/J na mesma condição.
- Houve diferença no perfil de expressão protéica no tecido renal e na urina entre as duas linhagens avaliadas:
 - Para o tecido renal foram detectados, entre as linhagens A/J e 129P3/J, 122, 126 e 134 *spots* diferencialmente expressos nos grupos controle, e que receberam baixa e alta concentração de F^- , respectivamente;
 - Para a urina foram detectados, entre as linhagens A/J e 129P3/J, 84, 68 e 66 *spots* diferencialmente expressos nos grupos controle, e que receberam baixa e alta concentração de F^- , respectivamente;
- Os dados mostraram que há diferenças metabólicas e no perfil de expressão protéica renal e urinária intrínsecas a estas linhagens e que a exposição ao F^- é capaz de alterar estes padrões.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAIR, S. M., HANES, C. M., RUSSELL, C. M., *et al.* Dental caries and fluorosis among children in a rural Georgia area. **Pediatr Dent**, v.21, n.2, p.81-5, Mar-Apr. 1999.
- AKOSU, T. J. e ZOAKAH, A. I. Risk factors associated with dental fluorosis in Central Plateau State, Nigeria. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.36, n.2, p.144-8, Apr. 2008.
- AL-NOWAISER, A., ROBERTS, G. J., TROMPETER, R. S., *et al.* Oral health in children with chronic renal failure. **Pediatr Nephrol**, v.18, n.1, p.39-45, Jan. 2003.
- ANGMAR-MANSSON, B., AL-KHATEEB, S. e TRANAEUS, S. Monitoring the caries process. Optical methods for clinical diagnosis and quantification of enamel caries. **Eur J Oral Sci**, v.104, n.4 (Pt 2), p.480-5. 1996.
- ANGMAR-MANSSON, B. e WHITFORD, G. M. Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. **J Dent Res**, v.69 Spec No, p.706-13; discussion 721, Feb. 1990.
- AOBA, T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.8, n.2, p.136-53. 1997.
- AOBA, T. e FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n.2, p.155-70. 2002.
- ARTHUR, J. M., THONGBOONKERD, V., SCHERZER, J. A., *et al.* Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. **Kidney Int**, v.62, n.4, p.1314-21, Oct. 2002.
- AWADIA, A. K., HAUGEJORDEN, O., BJORVATN, K., *et al.* Vegetarianism and dental fluorosis among children in a high fluoride area of northern Tanzania. **Int J Paediatr Dent**, v.9, n.1, p.3-11, Mar. 1999.
- BHARGAVI, V., KHANDARE, A. L., VENKAIAH, K., *et al.* Mineral content of water and food in fluorotic villages and prevalence of dental fluorosis. **Biol Trace Elem Res**, v.100, n.3, p.195-203, Sep. 2004.

BJELKHAGEN, H., SUNDSTROM, F., ANGMAR-MANSSON, B., *et al.* Early detection of enamel caries by the luminescence excited by visible laser light. **Swed Dent J**, v.6, n.1, p.1-7. 1982.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, May 7. 1976.

BURT, B. A. The changing patterns of systemic fluoride intake. **J Dent Res**, v.71, n.5, p.1228-37, May. 1992.

BUTLER, W. J., SEGRETO, V. e COLLINS, E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. **Am J Public Health**, v.75, n.12, p.1408-12, Dec. 1985.

BUZALAF, M. A. Fluoretos e Saúde Bucal. Bauru. 2008

BUZALAF, M. A. e CARDOSO, V. E. S. Destinos do fluoreto no organismo. In: M. A. BUZALAF (Ed.). **Fluoreto e Saúde Bucal**. Bauru, 2008. Destinos do fluoreto no organismo

BUZALAF, M. A. R., CAROSELLI, E. E., CARDOSO DE OLIVEIRA, R., *et al.* Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. **J Anal Toxicol**, v.28, n.4, p.249-52, May-Jun. 2004.

CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, n.9, p.1327-33, May. 2004.

CHEN, J., ZHANG, Y., MENDOZA, J., *et al.* Calcium-mediated differentiation of ameloblast lineage cells in vitro. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v.312B, n.5, p.458-64, Jul 15. 2009.

CHEN, Y. X., LIN, M. Q., XIAO, Y. D., *et al.* Nutrition survey in dental fluorosis-afflicted areas. **Fluoride**, v.30, n.2, p.77-80. 1997.

CLARK, D. C. Trends in prevalence of dental fluorosis in North America. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.22, n.3, p.148-52, Jun. 1994.

CORREIA SAMPAIO, F., RAMM VON DER FEHR, F., ARNEBERG, P., *et al.* Dental fluorosis and nutritional status of 6- to 11-year-old children living in rural areas of Paraiba, Brazil. **Caries Res**, v.33, n.1, p.66-73. 1999.

CUTRESS, T. W. e SUCKLING, G. W. Differential diagnosis of dental fluorosis. **J Dent Res**, v.69 Spec No, p.714-20; discussion 721, Feb. 1990.

DAWSON, D., LEVY, S., WARREN, J., *et al.* Candidate Gene Analysis of Fluorosis Phenotypes in the Permanent Dentition. IADR 84th General Session & Exhibition 2006.

DAWSON, D., XIAO, X., LEVY, S., *et al.* Candidate Gene Associations with Fluorosis in the Early Permanent Dentition. IADR 86th General Session & Exhibition 2008.

DE JOSSELIN DE JONG, E., SUNDSTROM, F., WESTERLING, H., *et al.* A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. **Caries Res**, v.29, n.1, p.2-7. 1995.

DENBESTEN, P. K. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.27, n.1, p.41-7, Feb. 1999.

EKSTRAND, J. Fluoride Metabolism. In: O. E. FEJERSKOV, J.; BURT, B.A. (Ed.). **Fluoride in dentistry**, 1996. Fluoride Metabolism, p.55-68

EKSTRAND, J., ALVAN, G., BOREUS, L. O., *et al.* Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. **Eur J Clin Pharmacol**, v.12, n.4, p.311-7, Dec 2. 1977.

EKSTRAND, J., ERICSSON, Y. e ROSELL, S. Absence of protein-bound fluoride from human and blood plasma. **Arch Oral Biol**, v.22, n.4, p.229-32. 1977.

EKSTRAND, J., SPAK, C. J. e VOGEL, G. Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. **J Dent Res**, v.69 Spec No, p.550-5; discussion 556-7, Feb. 1990.

EVERETT, E. T., MCHENRY, M. A., REYNOLDS, N., *et al.* Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **J Dent Res**, v.81, n.11, p.794-8, Nov. 2002.

EVERETT, E. T., YAN, D., WEAVER, M., *et al.* Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. **Cells Tissues Organs**, v.189, n.1-4, p.212-8. 2009.

FARGE, P., RANCHIN, B. e COCHAT, P. Four-year follow-up of oral health surveillance in renal transplant children. **Pediatr Nephrol**, v.21, n.6, p.851-5, Jun. 2006.

FEJERSKOV, O., LARSEN, M. J., RICHARDS, A., *et al.* Dental tissue effects of fluoride. **Adv Dent Res**, v.8, n.1, p.15-31, Jun. 1994.

FEJERSKOV, O., MANJI, F. e BAEUM, V. The nature and mechanisms of dental fluorosis in man. **J Dent Res**, v.69 Spec No, p.692-700; discussion 721, Feb. 1990.

FEJERSKOV, O., RICHARDS, A. e DENBESTEN, P. The effect of fluoride on tooth mineralization. In: O. FEJERSKOV, J. EKSTRAND, *et al* (Ed.). **Fluoride in Dentistry**. Munksgaard, 1996. The effect of fluoride on tooth mineralization, p.112-152

GIAMBRO, N. J., PROSTAK, K. e DEN BESTEN, P. K. Characterization of fluorosed human enamel by color reflectance, ultrastructure, and elemental composition. **Caries Res**, v.29, n.4, p.251-7. 1995.

GUPTA, S., MEHTA, U. e SINGH, A. Fluoride food items. **Fluoride**, v. 23, p.113-6. 1991.

HAVANAPAN, P. O. e THONGBOONKERD, V. Are protease inhibitors required for gel-based proteomics of kidney and urine? **J Proteome Res**, v.8, n.6, p.3109-17, Jun. 2009.

HEALTHCARE, G. 2-D Electrophoresis. Principles and methods. 2004. 67 p.

HEBERT, B. R. e HARRY, J. L. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends Biotechnol.** , v.19, p.3-9. 2001.

HUANG, H., BA, Y., CUI, L., *et al.* COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calciotropic hormone levels, and dental fluorosis. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.36, n.6, p.517-22, Dec. 2008.

IBARRA-SANTANA, C., RUIZ-RODRIGUEZ MDEL, S., FONSECA-LEAL MDEL, P., *et al.* Enamel hypoplasia in children with renal disease in a fluoridated area. **J Clin Pediatr Dent**, v.31, n.4, p.274-8, Summer. 2007.

JAKUBOWSKA, K., CHLUBEK, D., LAGOCKA, R., *et al.* Fluoride concentration in superficial enamel layers of permanent teeth in children residing in areas with different levels of environmental pollution with fluorine compounds. **Environ Sci**, v.11, n.6, p.337-44. 2004.

JUNGBLUT, P. e WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **J Biotechnol**, v.41, n.2-3, p.111-20, Jul 31. 1995.

KENNEDY, S. The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. **Biomarkers**, v.7, n.4, p.269-90, Jul-Aug. 2002.

KHAN, A. e PACKER, N. H. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. **J Proteome Res**, v.5, n.10, p.2824-38, Oct. 2006.

KHANDARE, A. L., HARIKUMAR, R. e SIVAKUMAR, B. Severe bone deformities in young children from vitamin D deficiency and fluorosis in Bihar-India. **Calcif Tissue Int**, v.76, n.6, p.412-8, Jun. 2005.

KHARASCH, E. D., HANKINS, D. C. e THUMMEL, K. E. Human kidney methoxyflurane and sevoflurane metabolism. Intrarenal fluoride production as a possible mechanism of methoxyflurane nephrotoxicity. **Anesthesiology**, v.82, n.3, p.689-99, Mar. 1995.

KLEIN, E., KLEIN, J. B. e THONGBOONKERD, V. Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies. **Contrib Nephrol**, v.141, p.25-39. 2004.

KLEIN, J. B. e THONGBOONKERD, V. Overview of proteomics. **Contrib Nephrol**, v.141, p.1-10. 2004.

KNEPPER, M. A. Proteomics and the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v.13, n.5, p.1398-408, May. 2002.

KOBAYASHI, C. A., LEITE, A. L., SILVA, T. L., *et al.* Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. **Chem Biol Interact**, v.180, n.2, p.305-11, Jul 15. 2009.

KOCH, M. J., BUHRER, R., PIOCH, T., *et al.* Enamel hypoplasia of primary teeth in chronic renal failure. **Pediatr Nephrol**, v.13, n.1, p.68-72, Jan. 1999.

KRISHNAMACHARI, K. A. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. **Prog Food Nutr Sci**, v.10, n.3-4, p.279-314. 1986.

LAGERWEIJ, M., VAN DER VEEN, M., ANDO, M., *et al.* The validity and repeatability of three light-induced fluorescence systems: An in vitro study. **Caries Res**, v.33, n.3, p.220-6. 1999.

LUDLOW, M., LUXTON, G. e MATHEW, T. Effects of fluoridation of community water supplies for people with chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.22, n.10, p.2763-7, Oct. 2007.

LYARUU, D. M., BRONCKERS, A. L., SANTOS, F., *et al.* The effect of fluoride on enamel and dentin formation in the uremic rat incisor. **Pediatr Nephrol**, v.23, n.11, p.1973-9, Nov. 2008.

MARTINEZ-MIER, E. A., SOTO-ROJAS, A. E., URENA-CIRETT, J. L., *et al.* Dental fluorosis and altitude: a preliminary study. **Oral Health Prev Dent**, v.2, n.1, p.39-48. 2004.

MASCARENHAS, A. K. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. **Pediatr Dent**, v.22, n.4, p.269-77, Jul-Aug. 2000.

MESSER, H. H., NOPAKUM, J. e RUDNEY, J. D. Influence of pH on intestinal fluoride transport in vitro. **J Dent Assoc Thai**, v.39, n.6, p.226-32, Nov-Dec. 1989.

MESSER, H. H. e OPHAUG, R. Effect of delayed gastric emptying on fluoride absorption in the rat. **Biol Trace Elem Res**, v.31, n.3, p.305-15, Dec. 1991.

MESSER, H. H. e OPHAUG, R. H. Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. **J Dent Res**, v.72, n.3, p.619-22, Mar. 1993.

MOUSNY, M., BANSE, X., WISE, L., *et al.* The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. **Bone**, v.39, n.6, p.1283-9, Dec. 2006.

MOUSNY, M., OMELON, S., WISE, L., *et al.* Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. **Bone**, v.43, n.6, p.1067-74, Dec. 2008.

NGAI, H. H., SIT, W. H., JIANG, P. P., *et al.* Serial changes in urinary proteome profile of membranous nephropathy: implications for pathophysiology and biomarker discovery. **J Proteome Res**, v.5, n.11, p.3038-47, Nov. 2006.

NOPAKUN, J., MESSER, H. H. e VOLLER, V. Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. **J Nutr**, v.119, n.10, p.1411-7, Oct. 1989.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v.250, n.10, p.4007-21, May 25. 1975.

PENDRYIS, D. G. Risk of enamel fluorosis in nonfluoridated and optimally fluoridated populations: considerations for the dental professional. **J Am Dent Assoc**, v.131, n.6, p.746-55, Jun. 2000.

RWENYONYI, C., BJORVATN, K., BIRKELAND, J., *et al.* Altitude as a risk indicator of dental fluorosis in children residing in areas with 0.5 and 2.5 mg fluoride per litre in drinking water. **Caries Res**, v.33, n.4, p.267-74, Jul-Aug. 1999.

SAMPAIO, F. C. Fluoride exposures and biomarkers in humans University of Oslo, Oslo, Norway, 2000.

SAMPAIO, F. C. Toxicidade crônica dos fluoretos. In: M. A. BUZALAF (Ed.). **Fluoretos e Saúde Bucal**. Bauru, 2008. Toxicidade crônica dos fluoretos

SANTOS, P. M., TEIXEIRA, M. C. e SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de biotecnologia**, v.77, p.7-17. 2004.

SCHIFFEL HH, B. U. Human urinary fluoride excretion as influenced by renal functional impairment. **Nephron.**, v.26 (2), p.69-72. 1980.

SMITH, F. e EKSTRAND, J. The occurrence and the chemistry of fluoride. In: O. FEJERSKOV, B. A. BURT, *et al* (Ed.). **Fluoride in dentistry**, 1996. The occurrence and the chemistry of fluoride, p.17-26

SUNDSTROM, F., FREDRIKSSON, K., MONTAN, S., *et al*. Laser-induced fluorescence from sound and carious tooth substance: spectroscopic studies. **Swed Dent J**, v.9, n.2, p.71-80. 1985.

SUNDSTROM, F., HAFSTROM-BJORKMAN, U., STROM, J., *et al*. Evaluation of a model for short-term clinical testing of cariogenicity. **J Biol Buccale**, v.17, n.2, p.115-20. 1989.

TAVES, D. R. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. **Talanta**, v.15, n.10, p.1015-23, Oct. 1968.

THONGBOONKERD, V., CHUTIPONGTANATE, S. e KANLAYA, R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. **J Proteome Res**, v.5, n.1, p.183-91, Jan. 2006.

THONGBOONKERD, V., KLEIN, E. e KLEIN, J. B. Sample preparation for 2-D proteomic analysis. **Contrib Nephrol**, v.141, p.11-24. 2004.

THYLSTRUP, A. e FEJERSKOV, O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.6, n.6, p.315-28, Nov. 1978.

TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., UENO, S., *et al*. Downregulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. **Eur J Neurosci**, v.15, n.9, p.1444-50, May. 2002.

VIEIRA, A. P., HANCOCK, R., LIMEBACK, H., *et al*. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? **J Dent Res**, v.83, n.1, p.76-80, Jan. 2004.

VIEIRA, A. P., HANOCOCK, R., EGGERTSSON, H., *et al*. Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. **Calcif Tissue Int**, v.76, n.1, p.17-25, Jan. 2005.

VLASKOVSKA, M., KASAKOV, L., RONG, W., *et al.* P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. **J Neurosci**, v.21, n.15, p.5670-7, Aug 1. 2001.

WESTEMEIER, R. e NAVEN, T. Proteomics in practice. Weinheim:Wiley-VCH. 2002

WHITFORD, G. M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J Dent Res**, v.69 Spec No, p.539-49; discussion 556-7, Feb. 1990.

WHITFORD, G. M. Effects of plasma fluoride and dietary calcium concentrations on GI absorption and secretion of fluoride in the rat. **Calcif Tissue Int**, v.54, n.5, p.421-5, May. 1994.

WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monogr Oral Sci**, v.16 Rev 2, p.1-153. 1996.

WILKINS, M. R., SANCHEZ, J. C., GOOLEY, A. A., *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v.13, p.19-50. 1996.

WILLIAMS, J. E. e ZWEMER, J. D. Community water fluoride levels, preschool dietary patterns, and the occurrence of fluoride enamel opacities. **J Public Health Dent**, v.50, n.4, p.276-81, Summer. 1990.

WITZMANN, F. A., FULTZ, C. D., GRANT, R. A., *et al.* Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics. **Electrophoresis**, v.19, n.14, p.2491-7, Oct. 1998.

XU, H., HU, L.-S., CHANG, M., *et al.* Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. **Toxic Letters**, v.160, n.1, p.69-75. 2005.

YODER, K. M., MABELYA, L., ROBISON, V. A., *et al.* Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.26, n.6, p.382-93, Dec. 1998.

ZEGARELLI, E. Adamantoblastomas in the Slye stock of mice. **Am J Pathol** v.20, p.23-87. 1944.

Anexos

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de ética no ensino e pesquisa em animais

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 026/2007

Bauru, 13 de março de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Susceptibilidade genética à fluorose dentária: um estudo metabólico, proteômico e genômico com diferentes linhagens de camundongos"**, de autoria de Aline de Lima Leite e Juliane Guimarães de Carvalho, sob sua orientação, aprovado *"ad referendum"* desta Comissão, foi apreciado e referendado em reunião realizada no dia 12 de março de 2008.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Artigo referente aos resultados do estudo metabólico

RESEARCH REPORTS

Biological

J.G. Carvalho¹, A.L. Leite¹, D. Yan²,
E.T. Everett³, G.M. Whitford⁴, and
M.A.R. Buzalaf^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru—SP 17012-901, São Paulo, Brazil; ²Dental Research, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA; ³Department of Pediatric Dentistry and The Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA; and ⁴Department of Oral Biology and Maxillofacial Pathology, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA; *corresponding author, mbuzalaf@fob.usp.br

J Dent Res 88(11):1054-1058, 2009

ABSTRACT

A/J and 129P3/J mouse strains have different susceptibilities to dental fluorosis, due to their genetic backgrounds. This study tested whether these differences are due to variations in water intake and/or F metabolism. A/J (susceptible to dental fluorosis) and 129P3/J mice (resistant) received drinking water containing 0, 10, or 50 ppm F. Weekly F intake, excretion and retention, and terminal plasma and femur F levels were determined. Dental fluorosis was evaluated clinically and by quantitative fluorescence (QF). Data were tested by two-way ANOVA. Although F intakes by the strains were similar, excretion by A/J mice was significantly higher due to greater urinary F excretion, which resulted in lower plasma and femur F levels. Compared with 129P3/J mice given 50 ppm F, significantly higher QF scores were recorded for A/J mice. In conclusion, these strains differ with respect to several features of F metabolism, and amelogenesis in the 129P3/J strain seems to be unaffected by high F exposure.

KEY WORDS: dental fluorosis, fluoride metabolism, genetic susceptibility/resistance, inbred mouse strains, bone.

DOI: 10.1177/0022034509347249

Received September 28, 2008; Last revision June 28, 2009;
Accepted July 1, 2009

Influence of Genetic Background on Fluoride Metabolism in Mice

INTRODUCTION

Concurrent with the decline in dental caries, there has been an increase in the prevalence of dental fluorosis (Clark, 1994; Marthaler, 2004; Khan and Packer, 2006). While it is well-accepted that fluoride (F) interacts with mineralized tissues and, at elevated levels of intake, disturbs the mineralization process (Aoba and Fejerskov, 2002), the molecular mechanisms that underlie the pathogenesis of dental fluorosis remain unknown.

It has been suggested that genetic determinants influence an individual's susceptibility to develop dental fluorosis (Yoder *et al.*, 1998). This hypothesis was tested in a mouse model system where genotype, age, gender, food, housing, and drinking water F-levels were under control (Everett *et al.*, 2002). Examination of 12 inbred strains of mice showed differences in susceptibilities to dental fluorosis. The A/J mouse strain was highly susceptible, with a rapid onset and severe development of dental fluorosis compared with the other strains tested, whereas the 129P3/J mouse strain was less affected, with minimal dental fluorosis. More recently, it has also been shown that these two strains have different bone responses to F exposure (Mousny *et al.*, 2006).

The protocols for the studies mentioned above (Everett *et al.*, 2002; Mousny *et al.*, 2006), however, did not include determination of F intake or excretion. Therefore, it was not known whether the "resistant" 129P3/J strain consumed less or excreted more F. We conducted this study to test the hypothesis that differences in susceptibilities to dental fluorosis are due to differences in water intake and/or F metabolism.

MATERIALS & METHODS

Mice

Weanling (3-week-old) male 129P3/J and A/J mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), and animals of the same strain were housed in pairs in plastic metabolic cages equipped with secondary cups that collected any spilled food and water, in the animal research facility at the Medical College of Georgia (MCG). The temperature and humidity in the climate-controlled room, which had a 12-hour light/dark cycle, were $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and 40-80%, respectively. The mice had free access to a low-F (0.95 mg/kg or ppm) diet (AIN76A, PMI Nutrition, Richmond, IN, USA). The research protocol was approved by the appropriate review boards of the MCG.

Fluoride Treatment

Initially, the mice were assigned to 3 groups based on the F concentrations in the drinking water (0, 10 or 50 ppm added as NaF). Each group consisted of 12 mice, 6 from each strain. During the first 2 wks, it was determined that the

volume of water consumed by the A/J mice was significantly higher than that by the 129P3/J mice. Thus, for the remainder of the study (7 wks) the F concentrations in the water given to the A/J mice were adjusted weekly in an attempt to equalize F intake by the 2 strains.

Body weights and food and water intakes were determined gravimetrically once each hr. In addition, 48-hr collections of urine and feces were made each hr so that the absorption and retention of F could be determined. The following equations were used: absorption = amount ingested – amount excreted in feces; retention = total ingested (food and water) – total excretion (urine and feces).

Sample Collection and Death

At the end of the study, when the mice were 12 wks old, they were anesthetized with ketamine and xylazine. A blood sample was collected from the heart into a lightly heparinized syringe for the determination of plasma F.

The right femurs were removed, cleaned of soft tissue, and frozen at -20°C . Prior to F analysis, they were ashed at 600°C overnight. The lower and upper jaws were removed and shipped to the University of North Carolina for the assessment of the degree of dental fluorosis according to clinical criteria and by quantitative fluorescence (QF).

Dental Fluorosis Phenotyping

Clinical Analysis

The determination of dental fluorosis was made clinically by two independent examiners for the entire lower incisor tooth surfaces, according to a modified TF index (Thylstrup and Fejerskov, 1978; Everett *et al.*, 2002).

Quantitative Fluorescence

The measure of fluorescence is a modification of the quantitative light-induced fluorescence (QLF) system that has been used to measure the severity of fluorosis in mice (Everett *et al.*, 2002). We used a modification of that technique, where the Inspektor hardware was replaced with a Nikon epifluorescence microscope equipped with a Chroma Gold 11006v2 set cube (exciter D360/40x, dichroic 400DCLP, and emitter E515LPv2). The lower incisors were removed from the mandible and allowed to remain slightly moistened. Teeth were viewed, labial side up and flat, on a black background at 2X magnification. Twelve-megapixel TIFF images were acquired under standard exposure conditions. Images were analyzed with Image J software version 1.33u (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Briefly, ten 300 x 300 pixel areas were randomly positioned over the pair of lower incisors and the mean grayscale values for each square determined. The average grayscale values for all 10 regions were then determined.

Fluoride Analysis

F concentrations in plasma, bone ash, and feces were determined after overnight hexamethyldisiloxane (HMDS)-facilitated diffusion (Taves, 1968; Whitford, 1996) with an ion-specific

electrode (Orion Research, Beverly, MA, USA; Model 9409) and a calomel electrode (Accumet, Cambridge, MA, USA; Model 13-620-79), both coupled to a potentiometer (Orion Research, Model 720A).

F standards (0.0095 to 38 μg F) were prepared in triplicate and diffused in the same manner as the samples. In addition, non-diffused standards were prepared as the diffused standards, with exactly the same F concentrations. Comparison of the mV readings demonstrated that the F in the diffused standards had been completely trapped and analyzed (recovery > 95%). The mV potentials were converted to μg F based on a standard curve with a correlation coefficient of $r \geq 0.99$.

F concentrations in water and urine were determined with the electrode by the direct method after the samples were buffered with an equal volume of TISAB II. The standards ranged between 0.95 and 95.0 mg F/L.

Statistical Analysis

GraphPad Prism software version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all the variables tested, except the clinical examinations. The assumptions of equality of variance (Bartlett's test) and normal distribution of errors (Kolmogorov-Smirnov test) were checked for all the variables tested (F intake, excretion, absorption, retention, and plasma and femur F concentrations). Since the assumptions were satisfied, two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test were carried out for statistical comparisons. The factors used were strain and treatment (water F concentration). Linear regression was also used to determine the relationship between plasma and femur F concentrations at the end of the metabolic study.

SPSS software version 11.0 for Windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, IL, USA) was used for testing ordinal variables from the clinical data. The Spearman correlation test was used for the analysis of differences between the strains and among the treatments.

In all cases, the significance limit was set at 5%. The data are expressed as mean $\pm$ SE.

RESULTS

The mean ($\pm$ SE) body weights of the A/J mice were 26.83 ± 0.32 , 25.48 ± 0.49 , and 27.24 ± 0.54 g for control, low-F, and high-F groups, respectively. 129P3/J mice presented similar values: 21.74 ± 0.29 , 24.78 ± 0.46 , and 23.86 ± 0.36 g, respectively.

A/J mice ingested nearly twice as much water as the 129P3/J mice during the 2 wks prior to starting the metabolic study and during the 7 wks of the metabolic study ($p < 0.001$). They also excreted more urine: 4.46 ± 0.18 vs. 3.89 ± 0.09 mL/48 hrs/cage ($p = 0.005$). The ratios of urine output to water intake during the 9 wks of the study were 0.34 ± 0.01 and 0.51 ± 0.01 , respectively ($p < 0.0001$). Within the A/J strain, the mice in the low-F group ingested significantly more water than those in the control and high-F groups during the 7-week metabolic study, but less during the preceding 2 wks ($p < 0.05$) (Table 1).

The A/J mice ate more food, so their F intake from this source was significantly higher than that by the 129P3/J mice

Table 1. Water Intake Data during the 2 wks Prior to the Metabolic Study and during the 7-wk Metabolic Study

Water Intake	Strains	Treatments*		
		Control	Low	High
First 2 wks	A/J ^a	15.77 ± 0.52 ^a	11.34 ± 0.69 ^b	14.91 ± 0.53 ^a
	129P3/J ^b	7.22 ± 0.39 ^a	7.76 ± 0.65 ^a	7.58 ± 0.55 ^a
Last 7 wks	A/J ^a	12.17 ± 0.28 ^a	14.50 ± 1.38 ^b	12.16 ± 0.28 ^a
	129P3/J ^b	7.97 ± 0.27 ^a	7.86 ± 0.17 ^a	7.57 ± 0.15 ^a

* Mean ± SE. *n* = 6 for the first 2 wks and *n* = 21 for the last 7 wks. Unit: g/48 hrs/cage (2 mice/cage). Distinct uppercase superscripts indicate significant differences between the strains. Distinct lowercase superscripts in the same row indicate significant differences among the treatments.

Table 2. Fluoride Intake, Excretion, Absorption, and Retention during the 7 wks of the Metabolic Study

		Drinking Water Fluoride Levels		
	Strains	Control	Low [F]	High [F]
Intake				
Food	A/J ^a	14.76 ± 0.15 ^{ab*}	14.38 ± 0.24 ^a	15.28 ± 0.28 ^b
	129P3/J ^b	11.45 ± 0.19 ^a	11.72 ± 0.17 ^a	11.73 ± 0.16 ^a
Water	A/J	None ^{aa}	85.29 ± 4.41 ^{ba}	345.48 ± 6.06 ^{ca}
	129P3/J	None ^{aa}	78.62 ± 1.68 ^{ba}	378.74 ± 7.70 ^{cb}
Total	A/J	14.76 ± 0.15 ^{aa}	99.67 ± 4.49 ^{ba}	360.77 ± 6.15 ^{ca}
	129P3/J	11.45 ± 0.19 ^{aa}	90.34 ± 1.73 ^{ba}	390.47 ± 7.73 ^{cb}
Excretion				
Feces	A/J	6.39 ± 0.30 ^{aa}	31.08 ± 1.37 ^{ba}	129.64 ± 4.09 ^{ca}
	129P3/J	4.70 ± 0.13 ^{aa}	32.75 ± 1.01 ^{ba}	145.57 ± 7.51 ^{cb}
Urine	A/J	2.28 ± 0.14 ^{aa}	23.03 ± 2.26 ^{ba}	106.08 ± 5.46 ^{ca}
	129P3/J	1.30 ± 0.10 ^{aa}	6.91 ± 1.20 ^{ns}	72.80 ± 5.59 ^{cb}
Total	A/J	8.67 ± 0.37 ^{ca}	54.11 ± 2.75 ^{ba}	235.73 ± 6.60 ^{ca}
	129P3/J	6.00 ± 0.16 ^{ca}	39.67 ± 1.56 ^{ba}	218.37 ± 8.81 ^{cb}
Absorption	A/J ^a	8.36 ± 0.29 ^a	68.58 ± 4.40 ^b	231.12 ± 5.93 ^c
	129P3/J ^a	6.75 ± 0.20 ^c	57.59 ± 1.22 ^b	244.90 ± 9.34 ^c
Absorption (%)				
	A/J ^a	56.7 ± 1.93 ^a	68.0 ± 1.59 ^b	64.0 ± 1.10 ^b
	129P3/J ^a	58.8 ± 1.21 ^a	63.8 ± 0.79 ^a	62.6 ± 1.87 ^a
Retention	A/J	6.08 ± 0.33 ^{aa}	45.56 ± 3.01 ^{ba}	125.04 ± 6.43 ^{ca}
	129P3/J	5.45 ± 0.21 ^{aa}	50.67 ± 1.97 ^{ba}	172.10 ± 8.49 ^{cb}
Retention (%)				
	A/J ^a	41.3 ± 2.29 ^a	45.4 ± 1.80 ^a	34.6 ± 1.65 ^b
	129P3/J ^b	47.4 ± 1.52 ^a	56.0 ± 1.74 ^b	44.0 ± 1.96 ^a

* Mean ± SE (*n* = 21). Unit: µg/48 hrs/cage (2 mice/cage). Distinct uppercase superscripts indicate significant differences between the strains. Distinct lowercase superscripts indicate significant differences among the treatments.

(*p* < 0.001). Within the A/J treatment groups, F intake with food was slightly but significantly higher in the high-F group than in the low-F group (*p* < 0.01) (Table 2).

F intake with water and total F intake were directly related to the water F concentrations (*p* < 0.0001). In the high-F treatment group, the 129P3/J mice ingested more F with water (and total intake) than the A/J mice (*p* < 0.001) (Table 2).

Fecal, urinary, and total F excretions were also directly related to the water F concentrations (*p* < 0.0001). Overall,

total F excretion between the strains was not significantly different (*p* = 0.071). In the high-F group, fecal F excretion by the 129P3/J mice was higher than by the A/J mice. Urinary and total F excretions, however, were higher by the A/J mice in the low-F and high-F groups (*p* = 0.003) (Table 2).

The amounts of F that were absorbed, as well as the percentages of the ingested amounts that were absorbed by the 2 strains, did not differ significantly. Overall, significant differences in the amounts retained were found between the strains (129P3/J > A/J; *p* < 0.0001) and among the treatments (*p* < 0.0001). The percentages of ingested F that were retained by the 2 strains were also significant (129P3/J > A/J; *p* < 0.001) (Table 2).

Plasma and femur ash F concentrations were strongly related to the water F concentrations (*p* < 0.0001). The 129P3/J plasma concentrations were numerically higher than the A/J concentrations in each treatment group, but the difference was statistically significant only for the high-F group. The femur concentrations showed the same profile as that in plasma. Linear regression analysis relating plasma to femur F concentrations was highly significant (*r*² = 0.632, *p* < 0.0001) (Table 3).

There were significant differences in the clinical and QF data between the strains (*p* = 0.007 and *p* = 0.0003 for clinical and QF, respectively) and among the treatments (*p* = 0.001 and *p* < 0.0001 for clinical and QF, respectively). Despite the clinical

evaluations being significantly different in both the low-F (*p* = 0.001) and high-F groups (*p* = 0.003), the QF data were significantly different only in the high-F group (*p* < 0.001) (Table 4). Despite the fact that the 129P3/J mice had higher F retentions and higher plasma and femur concentrations than the A/J mice (Tables 2 and 3), the expression of dental fluorosis in their incisors was less marked, although the difference was significant only in the high-F treatment group (Table 4).

DISCUSSION

This is the first in-depth fluoride metabolism study ever conducted with mice. A similar, 6-week study with weanling Sprague-Dawley rats was conducted in one of our laboratories (Whitford, 1991). The rats in Group E of that study received F in a manner similar to the mice in the present study, *i.e.*, they were fed a low-F diet (AIN76A) and fluoridated water. A

comparison of the results from Group E with those of the present study indicates that these 2 species metabolized F quite differently. For example, according to the average values of the low-F and high-F groups of the present study, the mice and rats absorbed 63% and 89% of their ingested fluoride, they excreted 55% and 17% of their ingested F, and they retained 45% and 83% of their ingested F, respectively.

The metabolic characteristics of the 2 mouse strains in the present study also differed significantly in several respects. The main purpose of the present study was to determine whether such differences existed, and, if so, if they could at least partially explain the differences in susceptibility to dental fluorosis previously reported (Everett *et al.*, 2002). The first difference found was that the A/J mice ate more food and drank more water than the 129P3/J mice. Initially, we thought that this, by itself, could have accounted for the reported different susceptibilities to dental fluorosis (Everett *et al.*, 2002), since, in that study, the water F concentrations were unchanged, and food or water intake was not measured.

Because of the difference in water intake, we adjusted the F concentrations for the A/J mice on a weekly basis, in an attempt to provide similar amounts of F intake by the 2 strains. Our attempt was not entirely successful, but the only statistically significant difference was in the high-F group, where the 129P3/J mice ingested 7.4% more F than the A/J mice. Additionally, it should be noted that the higher water (and F) intake presented by the A/J mice in the first 2 wks might not have influenced the results of dental fluorosis, since mouse incisors have continuous growth and are completely renewed in 35–45 days (Zegarelli, 1944).

Other notable differences include the following:

- (a) The A/J mice excreted a greater volume of urine than the 129P3/J mice, which was consistent with greater water intake, but the ratio of their urine output to water intake was 33% lower, which suggests a major difference in the metabolic handling of water.
- (b) Despite similar or actually higher total F intakes, urinary and total F excretions by the 129P3/J mice were lower than those by the A/J mice. This difference was greatest in the low-F group for reasons that remain unknown. We determined that it was not due to problems with the cages, urine collection tubes, water bottles, or water bottle stoppers. The difference may have been due to a lower urinary pH, a major determinant of the renal

Table 3. F Concentrations in Plasma and Femur Ash

		Treatment		
		Control	Low [F]	High [F]
Plasma [F] (µg/L)	A/J	6.9 ± 0.4 ^{ab}	25.0 ± 3.7 ^{ab}	97.9 ± 7.8 ^{ab}
	129P3/J	9.0 ± 0.8 ^{ab}	31.0 ± 4.5 ^{ab}	143.4 ± 26.9 ^{ab}
Femur [F] (mg/Kg)	A/J	198.8 ± 11.7 ^{ab}	774.2 ± 100.0 ^{ab}	2890.9 ± 446.5 ^{ab}
	129P3/J	330.8 ± 43.4 ^{ab}	1075.3 ± 90.2 ^{ab}	3994.3 ± 314.2 ^{ab}

* Mean ± SE. n = 6. Distinct uppercase superscripts indicate significant differences between the strains. Distinct lowercase superscripts in the same row indicate significant differences among the treatments.

Table 4. Quantitative Fluorescence (QF) and Clinical Examination of Mouse Incisors (n = 5)

		Treatments		
		Control	Low [F]	High [F]
Strains	Animals	QF/Clinical	QF/Clinical	QF/Clinical
A/J	1	12.66/1	13.38/1	68.05/4
	2	10.35/1	12.83/1	55.47/4
	3	11.66/0	12.49/2	27.11/3
	4	11.60/0	14.67/2	31.54/3
	5	11.51/1	13.29/1.5	45.87/4
129P3/J	1	11.06/1	11.14/0	12.39/1
	2	12.06/1	11.60/0	17.57/1
	3	11.46/1	11.08/1	15.94/2
	4	12.11/1	11.22/0	15.95/2
	5	11.45/0	10.53/0	16.72/3
A/J	Total	11.56 ± 0.37 ^{ab}	13.33 ± 0.37 ^{ab}	45.61 ± 7.55 ^{ab}
129P3/J	Total	11.63 ± 0.20 ^{ab}	11.1 ± 0.17 ^{ab}	15.71 ± 0.88 ^{ab}

Distinct uppercase superscripts indicate significant differences between the strains. Distinct lowercase superscripts in the same row indicate significant differences among the treatments for the QF data.

clearance of F (Whitford, 1996), but this variable was not measured.

- (c) The retention of F and the percentage of ingested F that was retained in the low-F and high-F groups were greater in the 129P3/J mice. This difference was reflected in their higher plasma and femur F concentrations, despite the fact that F intake by the A/J mice was much higher during the first 2 wks of the study, before we started adjusting their water F concentrations.

With regard to the latter point, it would have been reasonable to expect higher femur F concentrations in the A/J mice than in the 129P3/J mice in the study by Everett *et al.* (2002), because both strains were given water with the same F concentrations, assuming that their A/J mice consumed more water, as noted in the present study. The femur concentrations, however, were lower, although not significantly so. These higher F concentrations were observed, however, in the whole incisors (enamel and dentin) of the A/J mice given 50 ppm F in the water. Thus, there

is the possibility that the pattern of F uptake in the different types of hard tissues (tooth and bone) is not equal in these strains.

Despite these differences in the metabolic handling and tissue concentrations of F, the clinical and QF findings confirm that the teeth of the 129P3/J mice are more resistant to the effects of F (Everett *et al.*, 2002). The physiological, biochemical, and/or molecular mechanisms underlying this resistance remain to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms. Aarti Arun for her fluoride analyses and Prof. Fábio Sampaio for aid with the statistical analysis. This study was supported by FAPESP (2005-04671-0), CNPq (471485/2007-1), and NIH/NIDCR (DE-014853). This study was based on a thesis to be submitted to Bauru Dental School, University of São Paulo (Brazil), in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Oral Biology.

REFERENCES

- Aoba T, Fejerskov O (2002). Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:155-170.
- Clark DC (1994). Trends in prevalence of dental fluorosis in North America. *Community Dent Oral Epidemiol* 22:148-152.
- Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, *et al.* (2002). Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res* 81:794-798.
- Khan A, Packer NH (2006). Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res* 5:2824-2838.
- Marthaler TM (2004). Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res* 38:173-181.
- Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, *et al.* (2006). The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone* 39:1283-1289.
- Taves DR (1968). Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta* 15:1015-1023.
- Thylstrup A, Fejerskov O (1978). Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol* 6:315-328.
- Whitford GM (1991). Fluoride, calcium and phosphorus metabolism in the rat: comparison of 'natural ingredient' with semipurified diets. *Arch Oral Biol* 36:291-297.
- Whitford GM (1996). Metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* 16(Rev 2):1-153.
- Yoder KM, Mabelya L, Robison VA, Dunipace AJ, Brizendine EJ, Stookey GK (1998). Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community Dent Oral Epidemiol* 26:382-393.
- Zegarelli EV (1944). Adamantoblastomas in the Slye stock of mice. *Am J Pathol* 20:23-87.