Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Cláudia Ayumi Nakai Kobayashi

**Efeito do fluoreto no osso de camundongos
com diferentes susceptibilidades genéticas
à fluorose: uma análise proteômica**

Bauru
2012

Claudia Ayumi Nakai Kobayashi

**Efeito do fluoreto no osso de camundongos com
diferentes susceptibilidades genéticas à fluorose:
uma análise proteômica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de
concentração Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Versão corrigida

BAURU

2012

Kobayashi, Cláudia Ayumi Nakai

K791e Efeito do fluoreto no osso de camundongos com diferentes
susceptibilidades genéticas à fluorose: uma análise proteômica /
Claudia Ayumi Nakai Kobayashi. – Bauru, 2012.

215 p : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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°: 006/2008

Data: 19 de junho de 2008

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Thomas, pelo amor, pela grande ajuda, pelo incentivo sempre, pela paciência e pela compreensão em abdicar tanto tempo do nosso convívio para que eu pudesse concluir o doutorado,

Aos meus pais, por terem me dado a chance de participar desta experiência fascinante que é a vida. Em especial, à minha querida mãe, Chieko, pelo amor incondicional, pelo apoio e estímulo que sempre me deu para que eu pudesse vencer mais esta etapa,

Às minhas irmãs, Clara e Mônica, pela grande amizade que nos une e por serem importantes exemplos de competência, coragem e dedicação,

Dedico a vocês este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta trajetória.

Em especial à professora Marília por ter me dado a honra de fazer parte do seu laboratório por tantos anos, por ser um modelo de inspiração, pela confiança e incentivo que fizeram com que eu me tornasse uma pessoa completamente diferente do que eu era quando iniciei a vida acadêmica. Devo muito a você pelo meu amadurecimento profissional e pessoal. Levarei sempre comigo seus ensinamentos, seu exemplo de caráter e competência. Muito obrigada por ter sido muito mais do que minha orientadora em pesquisa, mas também pela amizade, por me apoiar nas horas difíceis, pela compreensão e por tornar mais fácil, apesar das dificuldades, o caminho percorrido nessa etapa da minha vida. **MUITO OBRIGADA!**

Ao professor Walter Siqueira pela oportunidade de realizar o meu estágio sanduíche no seu laboratório, na UWO (The University of Western Ontario) durante um ano. Muito obrigada por me aceitar em seu laboratório e pela grande e valiosa colaboração em um passo fundamental deste trabalho, a análise proteômica das proteínas ósseas. Foi uma importante experiência que contribuiu muito para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao professor Eric Everett não apenas pelos ensinamentos sobre micro-CT e análises de MAR, mas também pela paciência em ensinar, pela valiosa ajuda e por ter me recebido tão bem em seu laboratório na University of North Carolina.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira.

À Comissão de Pós-Graduação da FOB-USP, na pessoa de seu presidente, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2008/01449-3 e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Bolsa Sanduíche processo 2008/01449-3 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Nº 014/200808, pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo científico.

À Aline de Lima Leite, agradeço sinceramente pela grande ajuda no trabalho e na impressão da tese, pela amizade, pela companhia agradável durante o estágio na UNC, e por todos os bons momentos que passamos no laboratório. Muito obrigada por ser uma grande amiga que nos momentos mais difíceis sempre esteve pronta para me ajudar.

À Camila pela grande ajuda, em especial na análise de *Western Blotting* e dosagem de fosfatase alcalina, pela paciência em discutir os resultados e pela amizade.

À Mileni por me ajudar sempre que preciso, por me receber tão bem na sua casa e pela amizade.

À Flávia Iano pela amizade e pela grande ajuda sempre que preciso. No período dos estágios no exterior e durante essas idas e vindas para Bauru, sua preciosa ajuda foi fundamental.

À minha querida amiga Flavinha que já concluiu o seu trabalho nesse laboratório, mas apesar de não termos mais a convivência diária, nossa amizade continua forte e verdadeira.

À Juliane companheira no grupo “proteoma”, pela amizade e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À Mel, Lucas, Vinícius e Ju pela ajuda no laboratório e com o tratamento dos animais no biotério. Lucas, muito obrigada pelos dias que me ajudou digitando os valores para análise de MAR que pareciam infinitos...

Aos alunos e funcionários do laboratório no Carolina Center for Genome Sciences, em especial a Lauren Katz pela valiosa ajuda na análise do micro-CT, a Daniela e Gustavo Mendonça pela simpatia e por me ajudar desde o início nos preparativos para viagem e durante todo o período que fiquei em Chapel Hill, tornando tudo muito mais fácil e agradável.

Aos alunos e funcionários do Siqueira Lab e de outros laboratórios da UWO, em especial, Tom Chrones, Nada Tabbara, Carla Martins, Cindy Xiao, Young, Heide Yinyin Liao e Paula Yamaguti pela ajuda, pelo bom convívio, por serem sempre tão prestativos e pela amizade.

Aos funcionários da Odontopediatria D Lia, Lilian e Estela e do laboratório de Bioquímica, Thelma, Ovídio, Larissa e Aline pelo apoio e amizade.

A todos os professores do curso de pós-graduação da FOB-USP, em especial aos professores da Odontopediatria e Bioquímica por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva e Dra Camila Peres-Buzalaf pela importante contribuição no Exame de Qualificação.

À Fátima e ao técnico administrativo Alexandre da Odontopediatria, sempre nos ajudando a resolver todos os trâmites burocráticos.

Aos colegas da odontopediatria Juliana, Adriana, Flavia, Vanessa, Natalino, Tati, Carla, e todos os outros e aos colegas de laboratório da bioquímica, por vivenciarmos juntos tantos momentos de trabalho e também descontração: Camila, Aline Leite, Mileni, Flávia Iano, Thiemi, Mel, Helo, Maria, Taísa, Senda, Amanda, Flávia Levy, Cris, Lucas, Ju, Aline Dionízio, Isa, todos os outros e aos que já estão longe Flavinha, Juliane e Juliano. Sentirei muita falta de todos vocês!

À minha família que sempre me apoia, meus pais Minoru e Chieko, minhas irmãs Clara e Mônica, meus cunhados Adam, Ricardo, Martin e sua esposa Marion, minhas sobrinhas Anna e Amanda que enchem nossas vidas de alegria, minha sogra Ursula e seu marido Gottfried, meu sogro Werner, e em especial meu marido, Thomas pela ajuda com o trabalho e com as planilhas de proteínas, pela paciência para me ensinar a usar o excel, pela força e estímulo para que eu alcance os meus objetivos.

*“Se a ciência é a constelação de fatos,
teorias e métodos coletados na
literatura, então os cientistas são
os indivíduos que têm se esforçado,
com sucesso ou não, para
contribuir com um ou outro
elemento desta particular
constelação.”*

Thomas S. Kuhn

RESUMO

Tem sido demonstrado que fatores genéticos influenciam a resposta do osso e esmalte ao fluoreto (F), mas os mecanismos moleculares envolvidos não estão bem definidos. No presente estudo, foi empregada uma abordagem proteômica livre de marcadores para identificar e avaliar alterações na expressão de proteínas ósseas em duas linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades à fluorose (A/J susceptível e 129P3/J resistente). Camundongos machos das linhagens 129P3/J e A/J foram distribuídos em três grupos para cada linhagem, que receberam ração com baixa concentração de F e água de beber contendo 0, 10 e 50 ppm F por 8 semanas. A concentração de F foi analisada no plasma e fêmur. A atividade da fosfatase alcalina foi dosada no plasma. Fêmur, tíbia e vértebra lombar foram submetidos à análise por micro-CT. A taxa de aposição mineral (MAR) também foi avaliada no osso cortical dos camundongos. Em adição, eletroforese unidimensional e cromatografia líquida - espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS) foram utilizadas para identificar e caracterizar as proteínas de fêmur da linhagem 129P3/J. Para análise proteômica quantitativa, proteínas ósseas foram extraídas para cada grupo empregando quatro diferentes etapas: (a) tampão PBS (pH 7,4) por 24h, (b) tampão de Guanidina HCl 4 M / Tris HCl 50 mM (pH 7,4) por 96 h, (c) tampão EDTA 0,5 M / Tris HCl 50 mM (pH 7,4) por 96 h, e por último (d) tampão de Guanidina HCl 4 M / Tris HCl 50 mM (pH 7,4) por 96 h. As proteínas ósseas extraídas para cada grupo foram separadamente submetidas ao LC-ESI-MS/MS, seguido da análise semi-quantitativa de diferença de expressão proteica livre de marcadores. Foram identificadas várias proteínas ósseas com alteração na abundância entre os 3 tratamentos com F para cada linhagem e entre as duas linhagens para cada tratamento com F (razão $\geq 1,5$ or $\leq 0,5$, respectivamente). O F promoveu alterações na expressão de proteínas envolvidas na osteogênese e osteoclastogênese de maneira distinta para cada linhagem. Embora não tenha sido observada diferença significativa nos valores de BMD e parâmetros histomorfométricos entre os grupos tratados com F para ambas as linhagens, a taxa de aposição mineral (MAR) foi maior no grupo 129P3/J tratado com 50 ppm F comparado com os grupos controle e 10 ppm F, demonstrando que o F aumentou a formação óssea nesse grupo. Em conclusão, o tratamento com F em baixa e alta dose apresentou um efeito específico para cada linhagem, confirmando uma influência genética na resposta do osso à exposição ao F.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. Osteoporose. Fluoreto de Sódio. Proteômica. Genética.

ABSTRACT

Effect of fluoride on bone of mice with different genetic susceptibilities to fluorosis: a proteomic analysis

Genetic factors have been shown to influence bone and enamel responses to fluoride (F), but the molecular mechanisms involved remain unclear. In this study, a label-free proteomics approach was employed to identify and evaluate changes in bone protein expression of two mouse strains with different susceptibilities to fluorosis (A/J a susceptible strain, 129P3/J a resistant strain). Male 129P3/J and A/J mice were assigned to three groups given low-F food and water containing 0, 10 or 50 ppmF for 8 weeks. Plasma and femur were analyzed for F levels. Plasma was also evaluated for alkaline phosphatase activity. Femurs, tibiae and lumbar vertebrae were subjected to micro-CT analysis. Mineral apposition rate (MAR) was also measured in mice cortical bone. In addition, unidimensional electrophoresis and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was used to identify and characterize the femur protein profile from 129P3/J mouse strain. For quantitative proteomic analysis, bone proteins were extracted using four different steps: (a) PBS buffer (pH 7.4) for 24h, (b) 4 M Guanidine HCl/50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) for 96 h, (c) 0.5 M EDTA/50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) for 96 h, followed by (d) 4 M Guanidine HCl/50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) for 96 h. Bone proteins extracted from each group were separately subjected to LC-ESI-MS/MS, followed by label-free semi-quantitative differential expression analysis. Changes in many bone proteins abundance were found among the F treatment groups for each mouse strain and between the strains for each F treatment group (ratio ≥ 1.5 or ≤ 0.5 , respectively). F led to alterations in expression of proteins involved in osteogenesis and osteoclastogenesis in a different way for each strain. Although F treatment had no significant effects on BMD and histomorphometric measurements for both strains, mineral apposition rate (MAR) was higher in 129P3/J mice treated with 50 ppm F compared to control and 10 ppm F groups, showing that F increased bone formation for this group. In conclusion, F treatment at low and high levels had strain specific effects in mice, confirming a genetic influence in bone response to F exposure.

Keywords: Mass spectrometry. Osteoporosis. Sodium Fluoride. Proteomics. Genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das estratégias baseadas em 2DE e LC/MS mais comumente empregadas em análise proteômica quantitativa. Adaptado de: (COLUCCI-D'AMATO et al. 2011).....	39
Figura 2 – Administração de 10 mg/Kg corporal de calceína em 2% de bicarbonato de sódio (A) e 30 mg/Kg corporal de alizarina complex one (B) por via intra-peritoneal, em dose única, 11 e 2 dias antes da eutanásia, respectivamente	62
Figura 3 – Avaliação da taxa de aposição mineral (MAR) de fêmures de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J submetidos a tratamento com 0, 10 e 50 ppm F	64
Figura 4 – Gel 2DE representativo de proteínas de fêmures de camundongos A/J controle extraídos com o método 1 (A), 2 (B) e 3 (C). As proteínas ósseas foram separadas em <i>strips</i> de 24 cm e pH 3-10 linear, seguido de SDS-PAGE e coradas com azul de coloidal CBB G250	68
Figura 5 – Fluxograma do método de extração sequencial para proteínas ósseas (DOMENICUCCI et al. 1988 modificado).	69
Figura 6 – SDS-PAGE 12% de extratos PBS de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 20 µg dos extratos de PBS não submetidos à centrifugação prévia sem e com adição de 0,5 mM EDTA, do sobrenadante após centrifugação sem e com adição de 0,5 mM EDTA e do precipitado após centrifugação sem e com adição de EDTA 0,5 mM foram aplicadas nos poços 2, 3, 5, 6, 8 e 9, respectivamente. As proteínas foram coradas com Coomassie <i>Blue</i> (A) e prata (B).....	70
Figura 7 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmures de camundongos AJ grupo controle (AJC). Foram aplicados 10 µg do extrato G1G2. As proteínas foram coradas com Coomassie <i>Blue</i>	71
Figura 8 – SDS – PAGE de saliva da parótida (PS). Alíquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. Apenas as amostras contendo guanidina HCl apresentaram o precipitado, cujo aumento foi diretamente proporcional à concentração de guanidina HCl.....	73
Figura 9 – SDS-PAGE 12% de saliva da parótida (PS). Alíquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. Durante a corrida, a guanidina HCl aumentou a condutividade do gel, diminuindo o campo eletroforético, mesmo em baixas concentrações.....	73
Figura 10 – SDS-PAGE 12% de saliva da parótida (PS). Alíquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. As proteínas foram coradas com Coomassie <i>Blue</i>	75

Figura 11 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmur de camundongo 129P3/J. Aliquotas correspondentes a 10 e 20 µg do extrato G1G2 foram precipitadas com etanol 90% e aplicadas nos poços 3 e 5, respectivamente. As proteínas foram coradas com <i>Coomassie Blue</i> (A) e prata (B)	77
Figura 12 – SDS-PAGE 12% de 20 µg do extrato E de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, após filtração centrífuga com <i>Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit</i> (membrana de 3KDa). As proteínas foram coradas com <i>Coomassie Blue</i> (A) e prata (B)..	79
Figura 13 – Gel de poliacrilamida catiônico dos extratos PBS, G1G2 e E da linhagem de camundongos 129P3/J grupo controle. Aliquotas correspondentes a 10 µg do extrato PBS, 20 µg do extrato G1G2 e 10 µg do extrato E foram aplicadas nos poços 1, 2 e 3, respectivamente. As proteínas foram coradas com prata.	80
Figura 14 - Gel de poliacrilamida catiônico dos extratos PBS, G1G2 e E da linhagem de camundongos 129P3/J grupo controle. Aliquotas correspondentes a 20 µg do extrato PBS, 50 µg do extrato G1G2 e 20 µg do extrato E foram aplicadas nos poços 1, 2 e 3, respectivamente. As proteínas foram coradas com <i>Coomassie Blue</i> (A) e prata (B).....	81
Figura 15 – Concentração de proteína (µg/mL) para cada fração eluída no PD Mini Trap G-10 determinada pelo método BCA.....	83
Figura 16 – Quantificação da concentração de guanidina HCl utilizando uma escala com diferentes concentrações de guanidina HCl (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 M) para cada fração eluída no PD Mini Trap G-10.....	83
Figura 17 – Alinhamento cromatográfico das amostras 129P3/J e A/J grupo controle realizado no <i>SIEVE software</i> 1.3, utilizando o algoritmo <i>ChromAlign</i>	86
Figura 18 – <i>Workflow</i> da análise proteômica semi-quantitativa livre de marcadores utilizada no presente estudo para avaliar diferenças na expressão de proteínas ósseas de fêmures de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com F	87
Figura 19 – Quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) no plasma de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J em função do tratamento com F (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p < 0,05$)	94
Figura 20 – Média dos valores de BMD e de parâmetros histomorfométricos da região trabecular de tíbia nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 8$ /grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p < 0,05$)	99
Figura 21 – Média dos valores de BMD e de parâmetros histomorfométricos da região trabecular da quarta vértebra lombar (L4) nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 8$ /grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p < 0,05$)	100

Figura 22 – Média da BMD e de parâmetros histomorfométricos da região cortical de fêmur nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8/grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento (p<0,05)	101
Figura 23 – Média da taxa de aposição mineral de fêmur nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8/grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento, e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada linhagem (p<0,05)	102
Figura 24 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J controle	103
Figura 25 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J tratados com 10 ppm F	105
Figura 26 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J tratados com 50 ppm F	107
Figura 27 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J controle	109
Figura 28 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J tratados com 10 ppm F	111
Figura 29 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J tratados com 50 ppm F	113
Figura 30 – SDS-PAGE 12% representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 20 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com prata	115
Figura 31 – Gel catiônico representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 50 µg dos extratos PBS e E foram aplicadas no gel A e 50 µg do extrato G1G2 no gel B, e submetidas à eletroforese com polaridade reversa. Histatina 1, 3 e 5 (2 µg) foram utilizadas como padrão. As proteínas foram coradas com prata	117
Figura 32 – Gel aniônico representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 20 µg e 50 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas nos géis aniônico A e B, respectivamente. As proteínas foram coradas com prata	117
Figura 33 – Diagrama de Venn representando a sobreposição dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J	119
Figura 34 – Distribuição das proteínas identificadas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, de acordo com a localização celular (A), processos biológicos (B) e função molecular (C)	128

Figura 35 – SDS-PAGE 12% representativo de proteínas de fêmur de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com 0, 10 e 50 ppm F. Alíquotas correspondentes a 10 µg dos extratos PBSe E e 20 µg do extrato G1G2 foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com prata	129
Figura 36 – Distribuição de acordo com o processo biológico das proteínas de fêmur com expressão diferencial quando se compararam os grupos controle e tratados com 10 e 50 ppm F para cada linhagem (A/J ou 129 P3/J). n = 8 por grupo	150
Figura 37 – Distribuição de acordo com a localização celular das proteínas de fêmur com expressão diferencial quando se compararam os grupos controle e tratados com 10 e 50 ppm F para cada linhagem (A/J ou 129 P3/J). n = 8 por grupo	151
Figura 38 – Distribuição de acordo com o processo biológico das proteínas de fêmur identificadas com expressão diferencial quando se compararam as linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8 por grupo.....	152
Figura 39 – Distribuição de acordo com a localização celular das proteínas de fêmur com expressão diferencial quando se compararam as linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8 por grupo	153
Figura 40 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem A/J e 129P3/J utilizadas nos experimentos de Western Blotting. Alíquotas correspondentes a 30 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com Coomassie <i>Blue</i> . N= 4 animais/grupo	154
Figura 41 – Imagem representativa de 4 experimentos para validação da diferença de expressão do colágeno tipo I (140 kDa) por Western Blotting, realizados com diferentes amostras de fêmures de camundongos (n=4 animais/grupo)	154
Figura 42 – Análise de Western Blotting do colágeno tipo I (140 kDa) nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 4 animais/grupo. Na análise de densitometria foi atribuído para o grupo A/J controle um valor arbitrário = 1, sendo que os valores para os demais grupos foram calculados considerando o A/J como referência. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento (p<0,05).	155
Figura 43 – Representação esquemática do algoritmo usado na análise 3D para calcular a espessura (A) e separação trabecular (B) (BOUXSEIN et al. 2010).	163
Figura 44 – Géis de poliácridamida catiônico (A e B) e aniônico (C e D) do extrato G1G2 de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 10 µg foram aplicadas nos poços 1 e 3, e a 20 µg nos poços 2 e 4. As proteínas dos géis catiônico e aniônico foram coradas com <i>Coomassie Blue</i> (A e C) e prata (B e D).....	167
Figura 45 – Proteínas identificadas com abundância diferencial entre os tratamentos na linhagem A/J e 129P3/J demonstrando efeitos simultâneos do F na osteogênese e osteoclastogênese.	185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação protéica utilizando Bradford para três diferentes métodos de extração de proteínas ósseas	67
Tabela 2 – Concentração de F no plasma ($\mu\text{g/L}$) e no fêmur (mg/Kg) de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J em função do tratamento com F (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas	93
Tabela 3 – Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) pelo método BCA e número proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS para cada extrato proteico obtidos de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J	118
Tabela 4 – Lista de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão PBS (extrato PBS) identificadas por LC-ESI-MS/MS	120
Tabela 5 – Lista de proteína de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão 4 M Guanidina HCl (extrato G1G2) identificadas por LC-ESI-MS/MS	122
Tabela 6 – Lista de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão 0,5 M EDTA (extrato E) identificadas por LC-ESI-MS/MS	125
Tabela 7 – Quantidade total de proteínas identificadas com diferença de expressão para as comparações entre os tratamentos e linhagens de camundongos A/J e 129P3/J utilizando o SIEVE software	130
Tabela 8 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo A/J controle (A) comparado ao A/J 10 ppm F (B).....	133
Tabela 9 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo A/J controle (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B).....	135
Tabela 10 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo A/J 10 ppm F (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B)	136
Tabela 11 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo 129P3/J controle (A) comparado ao 129P3/J 10 ppm F (B)	136
Tabela 12 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo 129P3/J controle (A) comparado ao 129P3/J 50 ppm F (B).	138
Tabela13 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo 129P3/J 10 ppm F (A) comparado ao 129P3/J 50 ppm F (B)	142
Tabela 14 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial entre as linhagens 129P3/J controle (A) comparado ao A/J controle (B).....	142
Tabela 15 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial entre as linhagens A/J 10 ppm F (A) comparado ao 129P3/J 10 ppm F (B)	148
Tabela 16 – Lista de proteínas identificadas com expressão diferencial entre as linhagens 129P3/J 50 ppm F (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B)	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese de Fluorescência Diferencial em Gel Bidimensional
2D-PAGE	<i>Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida
AFB1-AR	<i>Aflatoxin B1 Aldehyde Reductase Member 2</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> / Fosfatase Alcalina
B.Ar	<i>Mean Total Cross Sectional Bone Area</i> / Área Média do Osso nas Seções Transversais da Amostra
B.Pm	<i>Mean Total Cross Sectional Bone Perimeter</i> / Perímetro Médio do Osso nas Seções transversais da Amostra
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> / Ácido Bicinconínico
BGP	<i>Bone Gla Protein</i> ou <i>Osteocalcin</i>
BMD	<i>Bone Mineral Density</i> / Densidade Mineral Óssea
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> / Proteína Morfogenética Óssea
BS/BV	<i>Bone Specific Surface</i> / Razão entre a Superfície Óssea Trabecular e o Volume Ósseo Trabecular
BS/TV	<i>Bone Surface Density</i> / Razão entre a Superfície Óssea Trabecular e o Volume Total da Amostra
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
BV/TV	<i>Bone Volume Fraction</i> / Razão entre o Volume Ósseo Trabecular e o Volume Total da Amostra
CaM	<i>Calmodulin</i>
CBR	<i>Carbonyl Reductase NADPH 2</i>
CHD	<i>Chromodomain_Helicase_DNA_Binding Protein</i>
Cl	Cloro
CO ₂	Dióxido de Carbono
COL1A1	<i>Collagen Type I Alpha 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> / Matriz Extracelular
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EF-Gmt	<i>Elongation Factor G Mitochondrial</i>
eIF2αk3	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3 Precursor</i>

emPAI	<i>Exponentially Modified Protein Abundance Index</i> / Índice de Abundância Proteica Exponencialmente Modificado
EP	Erro Padrão
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Eletrospray
F	Fluoreto
FAp	Fluorapatita
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FGFR3	Receptor FGF 3
FIGNL1)	<i>Fidgetin_Like Protein 1</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> / Espectroscopia na Região do Infravermelho Fourier
GDP	<i>Guanidine Diphosphate</i> / Difosfato de Guanidina
Gla	Ácido Gama-Carboxiglutâmico
GTP	<i>Guanidine Triphosphate</i> / Trifosfato de Guanidina
HCl	Ácido clorídrico
HMDs	Ácido Sulfúrico Saturado
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> / Células Tronco Hematopoiéticas
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tag</i> / Marcador de Afinidade Enriquecido Isotopicamente
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> / Focalização Isoelétrica
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i> / Gradiente Imobilizado de pH
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i> / Marcador Isobárico para Quantificação Relativa e Absoluta
JNK	<i>Jun N-Terminal Kinase</i>
L4	Quarta Vértebra Lombar
LC	<i>Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida
LC – MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i> / Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas Sequencial
LC/LC	Cromatografia Líquida Bidimensional
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i> / Dessorção/Ionização a Laser Auxiliada por Matriz – Tempo de voo
MAR	<i>Mineral Apposition Rate</i> / Taxa de Aposição Mineral
MCAT	Mass-Coded Abundance Tagging / Proteínas Codificadas com Marcadores Isotópicos
MDLC – MS/MS	<i>Multi-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass</i>

Spectrometry / Cromatografia Líquida Multidimensional Combinada
com Espectrometria de Massas Sequencial

MFP	monofluorofosfato de sódio
Mg	Magnésio
MGP	<i>Matrix Gla Protein</i>
micro-CT	Microtomografia Computadorizada
MMI	<i>Mean Polar Moment of Inertia</i> / Média do Momento Polar de Inércia
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
MS	<i>Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de Massas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de Massas Sequencial
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> / Tecnologia Multidimensional para Identificação de Proteínas
NaF	Fluoreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NEM	N-Etilmaleimida
NFkB	Fator Nuclear Kapa B
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
NHA	<i>Sodium/Hydrogen Exchanger 5</i>
NMJ	Junção Neuromuscular
Nox4	<i>NADPH oxidase 4</i>
NSAF	<i>Normalized Spectral Abundance Fator</i> / Fator de Abundância Espectral Normalizado
PBS	Tampão Fosfato Salina
PDHE1-A	<i>Pyruvate Dehydrogenase E1 Component Subunit Alpha</i>
PERK	<i>PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PGE2	Prostaglandina E2
pI	Ponto Isoelétrico
PI3-K	<i>Fosfatidilinositol 3-Quinase</i>
PMSF	Fluoreto e Fenil Metil Sulfonila
PN3	<i>Sodium Channel Protein Type 10 Subunit Alpha</i>
p-NP	P-Nitrofenol
ppm	Parte por Milhão
PPRL	Proteoglicanas Pequenas Ricas em Leucina
PTH	Paratormônio
PTP	<i>Phosphotyrosyl Phosphatase</i>
PVDF	Polivinil Fluorado

RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kapa B
RGD	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RLIM	<i>E3 Ubiquitin-Protein Ligase RLIM</i>
RNA _m	RNA (Ácido Ribonucléico) mensageiro
RPLC	<i>Reverse Phase Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida em Fase Reversa
SAF	<i>Spectral Abundance Factor</i> / Fator de Abundância Espectral
SAX	<i>Strong-Anion Exchange</i> / Troca Aniônica Forte
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> / Espalhamento de Raio-x a Baixo Ângulo
SCX	<i>Strong-Cation Exchange</i> / Troca Catiônica Forte
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em SDS
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i> / Cromatografia por Exclusão Molecular
SERMs	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators</i> / Moduladores Seletivos do Receptor De Estrógeno
SHIP1	<i>Phosphatidylinositol 3-4-5 Trisphosphate 5-Phosphatase 1</i>
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture / Análise da Razão de Isótopos Estáveis em Aminoácidos em Cultura de Células
SPARC	<i>Osteopontin</i>
SpC	Contagem Espectral
T.Ar	<i>Mean Total Crossectional Tissue Area</i> / Área Média de Tecido Total nas Seções Transversais da Amostra
T.Pm	<i>Mean total crossectional tissue perimeter</i> / Perímetro Médio do Tecido Total nas Seções Transversais da Amostra
Tb.N	<i>Trabecular Number Density</i> / Número e Densidade Trabecular
Tb.Pf	<i>Trabecular Bone Pattern Factor</i> / Fator de Forma do Osso Trabecular
Tb.Sp	<i>Trabecular Separation</i> / Separação Trabecular
Tb.Th	<i>Trabecular Thickness</i> / Espessura Trabecular
TBS-T	Solução <i>Tampão Tris</i> acrescida de <i>Tween-20</i>
TGF- β	Fator Beta de Crescimento tumoral
TMT	<i>Tandem Mass Tags</i> / Marcadores de Massa Sequencial
TNF α	Fator-Alfa de Necrose Tumoral
TRACP	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
USP31	<i>Ubiquitin Specific Protease 31</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	EFEITOS DO F NO TECIDO ÓSSEO	31
2.1.1	Efeitos físico-químicos do F na matriz mineral óssea.....	31
2.1.2	Efeito do F na matriz orgânica e células ósseas	34
2.2	INFLUÊNCIA GENÉTICA NA RESPOSTA DO TECIDO ÓSSEO AO F...	36
2.3	ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA	38
2.3.1	Análise proteômica quantitativa livre de marcadores (<i>Label-free</i>).....	42
2.3.1.1	Quantificação Relativa por Intensidade de Sinal dos Íons de Peptídeos	43
2.3.1.2	Quantificação Relativa por Contagem Espectral	46
2.3.1.3	Quantificação Absoluta Livre de Marcadores	48
2.4	ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA EM TECIDO ÓSSEO	49
3	PROPOSIÇÃO.....	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO COM FLÚOR	57
4.2	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS	58
4.3	DOSAGEM DE F NO PLASMA	58
4.4	DOSAGEM DE F NO FÊMUR.....	60
4.5	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) NO PLASMA	60
4.6	ANÁLISE DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)	61
4.7	TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR)	62
4.8	EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS ÓSSEAS DE CAMUNDONGOS	64
4.9	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE PROTEÍNAS DE FÊMUR	69
4.9.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	70
4.9.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida catiônico	79
4.9.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida aniônico	82

4.10	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	82
4.10.1	Preparo das amostras para espectrometria de massas – LC-ESI-MS/MS	82
4.10.2	Espectrometria de massas – LC-ESI-MS/MS.....	84
4.11	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	88
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
5	RESULTADOS.....	93
5.1	DOSAGEM DE F NO PLASMA E NO FÊMUR.....	93
5.2	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP) NO PLASMA.....	94
5.3	ANÁLISE DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT).....	97
5.4	TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR).....	102
5.5	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	115
5.5.1	Caracterização das proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J	115
5.5.2	Análise proteômica quantitativa	129
5.5.3	Análise da expressão proteica por <i>Western Blotting</i>.....	154
6	DISCUSSÃO	159
6.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	159
6.2	DOSAGEM DE F NO PLASMA E NO FÊMUR.....	159
6.3	ANÁLISE DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICR-CT).....	160
6.4	TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR).....	164
6.5	CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FÊMUR DE CAMUNDONGO DA LINHAGEM 129P3/J.....	165
6.6	ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA.....	172
7	CONCLUSÕES	189
	REFERÊNCIAS	193
	ANEXOS	215

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença do sistema esquelético que se caracteriza por uma baixa densidade mineral óssea (BMD) associada ao aumento do risco de fraturas ósseas, muitas vezes envolvendo a coluna, o quadril e o antebraço. A redução da BMD é consequência de um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, no qual a reabsorção é maior do que a formação óssea (BARON; HESSE 2012). De acordo com a patogênese, existem dois tipos distintos de osteoporose, a primária (70 - 80%) e a secundária (20 - 30%) (LEIDIG-BRUCKNER; RAUE; FRANK-RAUE 2012). A osteoporose primária afeta predominantemente mulheres na pós-menopausa, mas também pode ocorrer em homens idosos (BARON; HESSE 2012). A osteoporose secundária está associada a certas doenças endócrinas, gastrointestinais e hematológicas ou uso prolongado de medicamentos como glicocorticóide e terapia anti-hormonal (inibidor da aromatase em mulheres com câncer de mama e terapia de privação de andrógenos em homens com câncer de próstata) (LEIDIG-BRUCKNER; RAUE; FRANK-RAUE 2012). O uso prolongado de corticosteroides em alta dose pode levar a quadros severos de osteoporose em crianças (REJOU et al. 1986). A prevalência e morbidade associadas com osteoporose secundária e fraturas em pacientes com mielomeningocele (espinha bífida) enfatizam a importância da prevenção da osteoporose e o tratamento precoce na infância (MARREIROS; LOFF; CALADO 2012).

Diferentes agentes têm sido utilizados para o tratamento de osteoporose, incluindo antirreabsortivos (bifosfonato, ibandronato, calcitonina e para as mulheres os moduladores seletivos do receptor de estrógeno – SERMs), anabólicos (teriparatida, sais de cálcio, fluoreto de sódio – NaF) e outros agentes (inibidores de RANKL, ralenato de estrôncio, e nutrientes como cálcio e vitamina D) (AL-ANAZI et al. 2011). Atualmente, os agentes antirreabsortivos estão entre as principais opções terapêuticas para o tratamento da osteoporose. No entanto, esses agentes apresentam limitações, em especial o fato de levar a um baixo estado de neoformação óssea, no qual a formação óssea é reduzida com a supressão da atividade de remodelação óssea (BARON; HESSE 2012).

Ao contrário dos agentes antirreabsortivos, o fluoreto (F) é um agente anabólico ósseo potente, que age estimulando a atividade osteoblástica, resultando no aumento da massa óssea (RUBIN et al. 2001). O F tem sido utilizado clinicamente durante muitos anos, mas seu uso

permanece controverso e muitas questões permanecem sem respostas (CHACHRA et al. 1999). Embora o F aumente a BMD, evidências encontradas em estudos clínicos randomizados mostraram que o mesmo não reduz o risco de fratura de vértebra (HAGUENAUER et al. 2000). O tratamento com NaF, suplementado com cálcio e vitamina D, ajudou no controle de osteoporose secundária em um caso clínico de uma criança de 10 anos submetida a tratamento crônico com corticosteroide (REJOU et al. 1986). A avaliação da eficácia da terapia com F é complicada, uma vez que o osso apresenta uma resposta bifásica dose dependente, ou seja, o F pode ter uma ação mitogênica em baixas concentrações e tóxica em altas concentrações (CHENG; BADER; GRYNPAS 1995; EVERETT 2011). A eficácia do F para o tratamento da osteoporose depende da administração precoce e de regimes com baixas doses no qual os níveis tóxicos são evitados e a mineralização não é prejudicada (BALENA et al. 1998). Contudo, ainda existe uma dificuldade para determinar qual dosagem seria a mais apropriada (CHACHRA et al. 1999). Em adição, na última década, evidências de que existe uma interação do background genético do indivíduo levaram a uma nova percepção dos efeitos fisiológicos do F (CHOUBISA; CHOUBISA; CHOUBISA 2001; EVERETT 2011; GROBLER et al. 2009). O F pode ter um efeito positivo na densidade axial do osso, mas aproximadamente um terço dos pacientes não responde ao tratamento (DEQUEKER; DECLERCK 1993). Estudos para avaliar o efeito físico-químico do F nas propriedades mecânicas ósseas em diferentes linhagens de camundongos demonstraram que existe uma influência genética na susceptibilidade do osso ao F (MOUSNY et al. 2006; MOUSNY et al. 2008). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nos diferentes efeitos do F, influenciados pela genética, na qualidade óssea, ainda não são conhecidos.

Quando se deseja desvendar os mecanismos moleculares envolvidos em uma patologia ou no seu tratamento, a análise proteômica é uma importante ferramenta. A proteômica é um dos vários campos “ÔMICOS” que vem crescendo rapidamente na era pós-genômica. É uma área da Ciência, desenvolvida na última década, que analisa as proteínas em larga escala, contribuindo muito para o entendimento da função do gene (PANDEY; MANN 2000; ZHANG et al. 2010). O proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um dado momento, e é constantemente alterado pelas interações bioquímicas entre o genoma e o ambiente (COLUCCI-D'AMATO et al. 2011; PORTEUS et al. 2011). A análise proteômica fornece informações globais sobre a expressão de proteínas, suas concentrações relativas e

possíveis modificações pós-traducionais que elas possam sofrer (PANDEY; MANN 2000; SCHULZE; USADEL 2010).

Numa das abordagens mais comuns em proteômica quantitativa, emprega-se a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) para separar e comparar as proteínas presentes em amostras biológicas, seguida de identificação por espectrometria de massas (MS), em combinação com ferramentas de bioinformática (ISSAQ; VEENSTRA 2008). Devido às limitações do gel 2D para caracterização e comparação das proteínas, técnicas de cromatografia líquida (LC) livres de gel (*gel free*) em conjunto com a espectrometria de massas surgiram como uma alternativa para quantificar os níveis de proteínas, com maior sensibilidade e reprodutibilidade (AEBERSOLD; MANN 2003).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos livres de géis tem fornecido ferramentas poderosas para o estudo em larga escala da expressão de proteínas e caracterização de sistemas biológicos complexos (DOMON; AEBERSOLD 2006; MOTOYAMA; YATES 2008). Esse tipo de abordagem proteômica baseada em MS pode ser dividido em duas estratégias: a que utiliza marcadores isotópicos e a livre de marcador (*label-free*). Devido às propriedades físicas e químicas dos marcadores isotópicos serem idênticas às propriedades do seu homólogo, exceto pela massa, as moléculas marcadoras isotópicas foram incorporadas em MS como padrão interno ou referência relativa (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Entretanto, logo após a marcação com isótopos tornar-se popular e ser aceita como método de quantificação, abordagens livres de marcadores começaram a ser desenvolvidas. Estes métodos encontraram grande resistência por parte da comunidade científica, mas gradualmente foram amplamente aceitos e a sua validade na prática tem sido demonstrada constantemente. Um exemplo é um estudo publicado em 2007 pela ABRF (*The Association of Biomolecular Resource Facilities*), no qual foram comparadas várias abordagens com marcadores isotópicos e livre de marcador com géis 2D para análise cega de um conjunto de misturas de proteínas, e os resultados mostraram claramente que o método livre de marcador foi bem sucedido (BECKER; BERN 2011).

Portanto, o conhecimento do proteoma ósseo em resposta ao tratamento com F em linhagens de camundongos com diferente susceptibilidade ao F seria útil para compreender a influência genética na regulação dos processos de remodelação óssea pelo F. Trata-se de um estudo de grande relevância, pois, como foi relatado acima, nem todos os pacientes com osteoporose respondem ao tratamento com F (DEQUEKER; DECLERCK 1993), o que é um dos

maiores entraves do uso do F no tratamento e prevenção desta patologia. Deve ser destacado ainda que a osteoporose é uma patologia altamente prevalente, cujo tratamento demanda um dos maiores gastos em Saúde Pública (BORGSTROM et al. 2007). Nos EUA, o custo anual do tratamento de osteoporose e fraturas em 2008 foi estimado em 22 bilhões de dólares (BLUME; CURTIS 2011). O tratamento com F tem um custo significativamente mais baixo que as demais terapias hoje disponíveis para o tratamento/prevenção da osteoporose. Dessa maneira, a identificação de pacientes sensíveis aos efeitos anabólicos do F no tecido ósseo é de extrema importância para que esta terapia possa ser indicada com segurança para estes pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFEITOS DO F NO TECIDO ÓSSEO

2.1.1 Efeitos físico-químicos do F na matriz mineral óssea

Após a comprovação de que comunidades com água naturalmente fluoretada têm menor incidência de cárie, muitos países iniciaram programas de fluoretação artificial da água, nos quais aproximadamente 1 mg/L (ppm) de F é adicionado na água de beber (LUDLOW; LUXTON; MATHEW 2007).

A água fluoretada tem sido utilizada na prevenção da cárie dentária, mas também pode afetar o osso positiva ou negativamente. Uma redução no risco de fratura óssea tem sido relatado em populações consumindo água fluoretada a 1 mg/L (LI et al. 2001). Em adição, a análise de 33 estudos australianos forneceu evidências substanciais de que uma concentração de até 1 mgF/L não produz efeitos adversos na resistência óssea, densidade mineral óssea ou incidência de fratura, e com base em cinco estudos transversais concluiu-se que o uso de água fluoretada a 1 mgF/L teve um efeito favorável sobre a densidade óssea (DEMOS et al. 2001). A investigação dos efeitos de uma longa exposição ao F encontrou uma densidade óssea significativamente maior em mulheres que residiam em uma área com 1 mgF/L comparada com as que residiam em uma área com 0,1 mgF/L, indicando um efeito favorável da água fluoretada durante os anos de crescimento (ARNOLD et al. 1997). Por outro lado, outro estudo, no qual a água de beber tinha sido fluoretada (1 mg/L) por um período superior a 30 anos, não encontrou nenhuma influência na densidade óssea mas relatou a possibilidade de redução de fraturas de bacia em indivíduos idosos com osteoporose (LEHMANN et al. 1998). Crianças com 14-15 anos que residiam em área com alta concentração de F na água (3 mgF/L), apresentaram valores de densidade óssea maior do que as crianças com a mesma faixa etária residindo em áreas com baixa concentração de F (0,19 mgF/L) (GROBLER et al. 2009). Entretanto, uma concentração na água de beber maior que 4,32 mgF/L aumentou o risco de fratura (LI et al. 2001). Estudos utilizando altos níveis de sais fluoretados (> 50 mg/dia) têm encontrado resultados não conclusivos na prevenção de fraturas (MEUNIER et al. 1998; RIGGS et al. 1990).

Estudos em pacientes com osteoporose têm sugerido que baixas doses de F resultam em um aumento moderado na BMD, o que pode ser vantajoso em termos de redução do potencial de fratura óssea (RINGE et al. 1999). Terapias com baixas doses de monofluorofosfato de sódio (MFP) (10-20 mg/dia) associado ao cálcio parecem diminuir o risco de fratura nas vértebras e aumentar a BMD na espinha dorsal, lombar e fêmur (REGINSTER et al. 1998; RINGE et al. 1999). Ratos tratados com 80 mM/dia de NaF ou MFP por 30 dias produziram um aumento significativo na massa óssea (BRUN; PERA; RIGALLI 2010). O F pode ter um efeito positivo na densidade axial do osso, mas alterações similares não foram observadas no osso cortical (DEQUEKER; DECLERCK 1993). Existem indícios de que o aumento da BMD do osso trabecular ocorra às expensas do osso cortical (RIGGS et al. 1990).

Em relação às propriedades mecânicas, algumas evidências indicam que o F pode produzir um osso mais frágil do que um osso normal. Foi demonstrado que o tratamento tanto de ratos quanto de coelhos com F (com uma dose que não afeta a mineralização) levou a uma diminuição na resistência óssea, apesar do aumento na massa óssea e na fração do volume de osso (SOGAARD et al. 1995). O tratamento de ossos de camundongos *ex vivo*, os quais são histologicamente similares a ossos de ratos, produz efeitos similares nas propriedades mecânicas. A imersão do fêmur de camundongos em tampão com NaF 1,5 M por 12 h diminuiu a resistência à torção e dureza do osso total e aumentou o deslocamento da fratura (SILVA; ULRICH 2000). Efeitos similares foram observados para espécimes de osso cortical bovino que foram testados uniaxialmente. Os ossos imersos em NaF (0,145, 0,5 ou 2 M) apresentaram menor resistência e dureza, e uma maior deformação comparado ao osso não tratado, tanto na tensão (DEPAULA et al. 2002; KOTHA et al. 1998) quanto na compressão (WALSH; GUZELSU 1994). Com altas doses de F (2,0 M NaF), um aumento significativo foi também observado na dureza (DEPAULA et al. 2002). A concentração de F, pH e o tempo de imersão afetam a ultraestrutura e a resposta mecânica (NYMAN; REYES; WANG 2005). Em adição, o tratamento *in vivo* com diferentes concentrações de F (25, 50 e 100 mgF/L) alterou negativamente as propriedades mecânicas na linhagem de camundongos A/J, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada para a linhagem 129P3/J (MOUSNY et al. 2006).

Diferenças na estrutura cristalina, pela formação de cristais de fluorapatita, poderiam ser uma das explicações para a potencial associação entre exposição ao F e risco de fratura óssea. O F pode substituir os grupos hidroxila com efeitos controversos na resistência óssea (LI et al.

2001) e tamanho do cristal (MOUSNY et al. 2008). Muitos autores acreditam que o comprimento do cristal não é alterado pelo tratamento com F ((EANES; HAILER 1998). Por outro lado, a maioria dos autores relata um aumento na largura do cristal (CHACHRA et al. 1999; EANES; MEYER 1978; EANES; HAILER 1998; MOUSNY et al. 2008; TURNER et al. 1997). Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) de ossos de camundongos controle e tratados com F (*in vivo*) mostrou que os últimos apresentaram maior cristalinidade, menos carbonato tipo A (CO_3 substitui OH na apatita) e diferença no tamanho da célula unitária (GRYNPAS; REY 1992). A análise de difração de raio-X de osso de coelho tratado com F também mostrou aumento na largura do cristal (CHACHRA et al. 1999).

Em adição, evidências experimentais têm sugerido que o F altera a ligação interfacial entre o mineral e o colágeno (WALSH; GUZELSU 1994). O osso é um material anisotrópico não homogêneo composto por uma fase mineral (hidroxiapatita) embebida em uma matriz orgânica (colágeno tipo I e proteínas não colágenas). Assim como em outros compósitos, a resistência do osso depende de vários fatores como fração do volume, propriedade material, orientação das fibras e da interação interfacial (WALSH; GUZELSU 1994). Dentre esses fatores, a resistência mecânica do osso parece derivar principalmente da interface entre o colágeno e o mineral (CATANESE et al. 1999). A ligação interfacial entre o mineral e os constituintes orgânicos é baseada, em parte, nas interações eletrostáticas entre as cargas negativas da matriz orgânica e as cargas positivas na superfície do mineral. Tem sido demonstrado que o F altera a interação orgânico-mineral, influenciando nas propriedades mecânicas do osso sob tensão (WALSH; GUZELSU 1994). Um estudo utilizou espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS) para analisar biópsias de ossos de mulheres normais (controle) e com osteoporose (tratadas com 60 mg NaF/dia por 1-2 anos). Os resultados sugerem que, mediante tratamento com NaF, cristais mais largos são formados, os quais provavelmente não estão associados com fibras colágenas e, portanto não contribuem para a resistência mecânica, apesar de aumentar a BMD (FRATZL et al. 1994). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de ossos fluoretados *in vitro* que demonstraram que a adição de íons de F ao osso promoveu uma falha na ligação entre o colágeno e o mineral, alterando as propriedades mecânicas do osso à compressão e tensão (WALSH et al. 1994). Outro estudo com coelhos tratados com 16 mgF/dia na água de beber por 6 meses demonstrou que apesar de aumentar a massa óssea e a dureza, o tratamento com F alterou negativamente as propriedades mecânicas do osso. Essa diminuição na resistência óssea não

estava associada com uma mineralização anormal, mas sim com o aumento do tamanho do cristal que se mostrou inversamente proporcional à resistência à flexão do fêmur (TURNER et al. 1997). Esses resultados enfatizam o delicado equilíbrio entre o aumento da massa óssea e o enfraquecimento das propriedades óssea resultantes do efeito do F no osso (FRATZL et al. 1996).

2.1.2 Efeito do F na matriz orgânica e células ósseas

Embora muitas vezes seja considerado como uma estrutura estática e inerte, o osso é um tipo de tecido conjuntivo dinâmico e altamente especializado. Três tipos diferentes de células podem ser encontrados no tecido ósseo: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos se originam a partir de células-tronco mesenquimais multipotentes presentes na medula óssea (LONG 2001), e são responsáveis pela produção da matriz extracelular (ECM) óssea. Além disso, regulam a mineralização da matriz óssea recém-formada (osteóide) e a diferenciação e atividade dos osteoclastos (HOFBAUER et al. 2000). A fusão de células mononucleares hematopoiéticas origina os osteoclastos, células gigantes multinucleadas equipadas com um conjunto de enzimas proteolíticas. Os osteoclastos são responsáveis pela degradação e remodelação óssea, e são capazes de dissolver tanto o mineral como a matriz orgânica óssea (TEITELBAUM 2000). Os osteócitos são as células mais abundantes no osso, representando 90% de todas as células no esqueleto de um adulto. São formados a partir de osteoblastos maduros que criam uma rede de interligação através da matriz óssea, e essa comunicação com as células adjacentes é feita por meio de junções comunicantes (tipo *gap*) (KLEIN-NULEND; NIJWEIDE; BURGER 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o F pode agir tanto nos osteoblastos como nos osteoclastos (EVERETT 2011). A administração de F em cultura de osteoblastos de rato promoveu inibição da transformação da fase S para a fase G2/M, aumento da apoptose, diminuição no RNAm para o COL1A1, e menor expressão do colágeno tipo I (YAN et al. 2011). Lau e Baylink (2003) sugeriram que a inibição da TRACP tipo 5 osteoblástica estaria envolvida no mecanismo molecular da ação mitogênica do F, aumentando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea. Embora existam inúmeros estudos sobre a ação anabólica do F, sabe-se pouco em relação ao seu mecanismo de ação na osteoclastogênese (EVERETT 2011). Camundongos da linhagem C3H/HeJ tratados com 50 ppm F demonstraram um aumento na osteoclastogênese (YAN et al. 2007). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o F pode inibir a

função de osteoclastos em concentrações entre 0,5 a 1 mM (OKUDA; KANEHISA; HEERSCHÉ 1990) ou próximas aos níveis fisiológicos (15 ppm F, equivalendo aproximadamente a 0,8 mM) (TAYLOR; BOYDE; JONES 1989).

A matriz extracelular produzida pelas células ósseas é mineralizada, e contém cerca de 25% de matriz orgânica, incluindo as células ósseas, 5% de água e 70% de minerais inorgânicos (hidroxiapatita) (LAMMI; HAYRINEN; MAHONEN 2006). A matriz orgânica do osso ocupa 32% do volume e consiste principalmente de colágeno tipo I (90%), com pequena, mas importante concentração de proteínas não-colagênicas como osteocalcina e osteonectina, as quais participam do processo de mineralização (NYMAN; REYES; WANG 2005). A ligação cruzada do colágeno é uma importante característica do osso não apenas porque organiza as fibrilas, mas também porque contribui para o processo de mineralização, afetando o comportamento mecânico do osso (NYMAN; REYES; WANG 2005). Em um estudo *in vitro*, osteoblastos de calvária de ratos tratados com 221 mg/L NaF na água de beber por 2 meses secretaram uma menor quantidade de colágeno tipo I quando comparados com o controle (MIAO et al. 2002). Um estudo com cultura de células ósseas de rato incubadas em 10^{-5} e 10^{-7} M de F demonstrou que o F também pode influenciar as metaloproteinases da matriz (MMPs), afetando a composição da matriz remodelada e a subsequente mineralização (WADDINGTON; LANGLEY 2003).

As principais funções do osso são fornecer suporte para as partes moles e proteger órgãos vitais, proporcionar apoio mecânico para a atividade muscular e servir de depósito de cálcio, fosfato e outros íons, contribuindo para a homeostase mineral a nível sistêmico (LAMMI; HAYRINEN; MAHONEN 2006). Em relação ao F, em condições fisiológicas, alguns minutos após sua ingestão, ele é rapidamente absorvido, e um aumento nos seus níveis plasmáticos já são detectados. Depois que a maior parte da dose foi absorvida, os níveis no plasma e nos tecidos moles mostram um declínio rápido devido à incorporação contínua pelo osso e à excreção urinária (BUZALAF; WHITFORD 2011). Em recém-nascidos e crianças pequenas, a quantidade de F retida nos tecidos calcificados é maior que 50% da ingestão diária (LUDLOW; LUXTON; MATHEW 2007). Aproximadamente 99% do F presente no organismo está associado com tecidos calcificados. No entanto, o F nos tecidos calcificados não está ligado irreversivelmente, principalmente aquele recentemente adquirido, que está localizado nos cristalitos 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 (LEITE et al. 2008; WHITFORD 1996).

As apatitas biológicas, componentes mineral do osso normal, são caracterizadas pela presença de constituintes menores, como íons magnésio (Mg), cloro (Cl), ou F. Atualmente, os efeitos do F na migração celular e proliferação de células ósseas estão sendo explorados na medicina e odontologia, usando compostos que contenham F como material de enxerto ósseo (INOUE et al. 2011). A implantação de fluorapatita (FAP) com baixa concentração de F (0,48% por peso) em tíbia de ratos promoveu a migração de macrófagos, a ligação, proliferação e expressão fenotípica das células ósseas, levando a formação de osso novo diretamente sobre as partículas (INOUE et al. 2011). Entretanto, com uma alta porcentagem de F (2,23% por peso), o aumento de novo osso foi menor e mais lento (INOUE et al. 2005).

2.2 INFLUÊNCIA GENÉTICA NA RESPOSTA DO TECIDO ÓSSEO AO F

Embora seja de grande relevância, a concentração de F não parece ser o único fator que influencia o seu efeito no tecido ósseo (MOUSNY et al. 2006). Durante mais de quatro décadas, o F vem sendo estudado como um agente terapêutico em mulheres para o tratamento de osteoporose pós-menopausa (REGINSTER et al. 1998; RIGGS et al. 1990; RINGE et al. 1999). Um tratamento apropriado de F (25 mg por dia durante 1 ano, seguidas por um período de 2 meses sem o F) parece reduzir fratura no osso espinhal em mulheres que apresentaram pelo menos uma fratura prévia (RUBIN et al. 2001). Entretanto, aproximadamente um terço dos pacientes com osteoporose que recebem terapia de F não respondem ao tratamento (DEQUEKER; DECLERCK 1993). Existem evidências crescentes de que a sensibilidade do tecido trabecular tanto para estímulos catabólicos como anabólicos é influenciada pela genética e isto poderia em parte explicar porque vários tratamentos profiláticos para osteoporose óssea não são efetivos em todos os indivíduos (JUDEX; DONAHUE; RUBIN 2002).

Em adição, estudos epidemiológicos têm relatado dificuldades para determinar o efeito da exposição prolongada ao F em baixas concentrações devido à grande variabilidade em populações urbanas heterogêneas (CHACHRA et al. 2010). Cerca de 40% da população em áreas com água naturalmente fluoretada com altos níveis não são afetadas por fluorose esquelética (CHOUBISA; CHOUBISA; CHOUBISA 2001). Vários estudos têm demonstrado uma diferença

na prevalência de fluorose dentária e esquelética dependendo do sexo, idade e a origem da população estudada, apesar do fato de que todos os indivíduos tenham recebido a mesma concentração de F (BELTRAN-AGUILAR; GRIFFIN; LOCKWOOD 2002; BUTLER; SEGRETO; COLLINS 1985; GROBLER et al. 2009; VIEIRA et al. 2005; YODER et al. 1998). Estes achados sugerem que determinantes genéticos podem influenciar a susceptibilidade individual ou os efeitos de resistência ao F (MOUSNY et al. 2006). Para testar esta hipótese, Everett et al. (2002) estudaram 12 linhagens de camundongos e observaram variações no início e na severidade da fluorose dentária. Algumas linhagens desenvolveram fluorose dentária severa rapidamente, enquanto outras foram minimamente afetadas, com menor grau de fluorose dentária. As linhagens foram agrupadas em resistentes, intermediárias e sensíveis aos efeitos do F.

Para avaliar a influência genética nos efeitos do F no metabolismo ósseo, Mousny et al. (2006) utilizaram três linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades para desenvolver fluorose dentária (A/J, “susceptível”, 129P3/J, “resistente” e SWR/J, “intermediária”). Os camundongos da linhagem 129P3/J (“resistente”), expostos a baixas doses de F, apresentaram uma maior concentração de F no osso em relação à linhagem A/J “susceptível”, indicando uma influência genética no acúmulo de F no osso. Embora no estudo conduzido por Mousny et al. (2006) as linhagens tenham demonstrado um aumento significativo dose-dependente da concentração de F no fêmur e na vértebra, como o tratamento com F não afetou nem a macro arquitetura óssea, nem a BMD nas três linhagens, esses fatores não poderiam explicar as variações nas propriedades mecânicas ósseas observadas entre as linhagens avaliadas, ou seja, alterações significativas na “qualidade óssea” na linhagem A/J “susceptível”, moderadas na linhagem SWR/J “intermediária” e ausência de alterações na linhagem 129P3/J “resistente”. Em um estudo posterior (MOUSNY et al. 2008), verificou-se que o aumento da largura do cristal foi diretamente proporcional à dose de F para todas as linhagens, sendo que a linhagem 129P3/J (resistente) apresentou o menor cristal comparado com as outras duas linhagens independente da dose. O tamanho reduzido dos cristais sugere um crescimento mais lento, o que poderia ser devido à maior força de ligação na interface orgânica/inorgânica, reduzindo o fluxo de íons cálcio e fosfato para a superfície do cristal. Isto poderia explicar a ausência de alterações nas propriedades mecânicas ósseas na linhagem 129P3/J, mesmo sob exposição a altas doses de F (MOUSNY et al. 2008).

Outra possível explicação para as diferentes respostas mecânicas ao F das três linhagens estudadas seria um efeito do F nas células ósseas. Mousny et al. (2008) demonstraram que além dos efeitos físicos e químicos no cristal ósseo, o tratamento com 100 ppm F aumentou o volume e a superfície osteóide para as três linhagens. O aumento da formação de osteóide suporta a teoria de que o F estimula a atividade osteoblástica e atrasa a mineralização do osso recém-formado (MOUSNY et al. 2008). O emprego da proteômica quantitativa permitiria uma melhor investigação das proteínas alteradas nas diferentes linhagens e poderia ajudar a esclarecer melhor os mecanismos moleculares envolvidos na resposta do osso ao F.

2.3 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA

A análise proteômica, desenvolvida há pouco mais de uma década, surgiu como uma abordagem sistemática para o mapeamento qualitativo e quantitativo de todo o proteoma, diferindo das abordagens moleculares convencionais que são capazes de analisar um número limitado de proteínas (ZHANG et al. 2010). Além de estudos proteômicos sobre o perfil global de proteínas presentes em um sistema em um dado momento, o número de estudos trazendo informações sobre o nível de expressão protéica também vem crescendo nos últimos anos (ZHU; SMITH; HUANG 2010). A quantificação de diferenças entre dois ou mais estados fisiológicos de um sistema biológico é uma das tarefas mais importantes, assim como um dos maiores desafios das técnicas proteômicas (BANTSCHEFF et al. 2007).

A análise de uma mistura complexa de proteínas requer métodos para separar, identificar e quantificar proteínas, assim como ferramentas para integrar e analisar todos os dados (AEBERSOLD; MANN 2003). Dentre as múltiplas técnicas e instrumentos, algumas estratégias vêm sendo comumente utilizadas (Figura 1) (AEBERSOLD; MANN 2003; COLUCCI-D'AMATO et al. 2011; SCHULZE; USADEL 2010).

Figura 1 – Representação esquemática das estratégias baseadas em 2D-PAGE e LC/MS mais comumente empregadas em análise proteômica quantitativa. Adaptado de: (COLUCCI-D'AMATO et al. 2011).

A primeira estratégia consiste em um método clássico para análise quantitativa de misturas complexas de proteínas que combina 2D-PAGE e MS. A separação das proteínas é feita em duas dimensões. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu pI (ponto isoeletrico), utilizando a focalização isoeletrica. Posteriormente, na segunda dimensão, são separadas de acordo com seu volume molecular, empregando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, resultando em uma separação bidimensional contendo *spots* de proteínas que diferem em tamanho molecular e/ou pI (GRAVES; HAYSTEAD 2002; O'FARRELL 1975; PANDEY; MANN 2000). 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, autorradiografia ou detecção com imunológicos (CANDIANO et al. 2004; PANDEY; MANN 2000). Após coloração, os géis são escaneados, e

com o uso de um software especial, os *spots* em cada gel são alinhados e sua intensidade individual é mensurada (GRAVES; HAYSTEAD 2002; ISSAQ; VEENSTRA 2008; PANDEY; MANN 2000). As proteínas de interesse são excisadas do gel, digeridas, usualmente com tripsina, e identificadas por MS ou espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) (GRAVES; HAYSTEAD 2002; PENG; GYGI 2001). O desenvolvimento da eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE) trouxe maior acurácia e confiabilidade em relação à quantificação de proteínas, pois as amostras comparadas correm juntas no mesmo gel, eliminando a potencial variação dos géis em corridas distintas (LILLEY; FRIEDMAN 2004). Entretanto, com certa frequência *spots* no gel 2D podem conter mais do que uma proteína, tornando a quantificação ambígua, uma vez que não mostra qual dessas proteínas em um mesmo *spot* sofreu alteração na expressão. Além disso, o gel 2D está sujeito às limitações impostas pelo método, as quais incluem faixa dinâmica limitada, problema na reprodutibilidade, dificuldades para analisar proteínas de membrana devido a sua alta hidrofobicidade, identificar proteínas pouco abundantes e detectar proteínas com peso molecular e valores de pI extremos (HERBERT et al. 2001; ZHU; SMITH; HUANG 2010).

Na segunda estratégia estão as chamadas técnicas de proteômica “*shotgun*” que consistem na análise direta dos peptídeos provenientes de uma mistura complexa de proteínas, digeridas (proteômica do tipo *bottom-up*) ou não (proteômica do tipo *top-down*) (ENG; MCCORMACK; YATES 1994; MOTOYAMA; YATES 2008). Neste método a separação é realizada a nível de peptídeos ao invés de ser a nível de proteínas, como era feito para o gel 2D (LINK et al. 1999; WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001). Os fragmentos peptídicos são separados por LC – MS/MS (cromatografia líquida - espectrometria de massas *tandem*), e empregando algoritmos computacionais, como SEQUEST ou MASCOT, é realizada uma busca dos espectros que possuam sequências equivalentes àsquelas existentes nos bancos de dados para identificar as proteínas presentes na mistura (MOTOYAMA; YATES 2008; PERKINS et al. 1999). Um marco para esta abordagem ocorreu em 2001, quando 1484 proteínas do lisado celular de levedura foram identificadas utilizando cromatografia líquida multidimensional combinada com espectrometria de massas *tandem* (MDLC – MS/MS) (WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001). Atualmente, esta metodologia é conhecida como tecnologia multidimensional para identificação de proteínas (MudPIT), e combina duas ou mais formas de LC para melhorar o poder de resolução e a separação dos fragmentos peptídicos antes de submetê-los para análise no

espectrômetro de massas (MOTOYAMA; YATES 2008). Uma variedade de separações na primeira dimensão, nem todas baseadas em LC, têm sido utilizadas: cromatografia por exclusão molecular (SEC) (OPITECK; JORGENSEN 1997); troca catiônica forte (SCX) (JIANG et al. 2007; LINK et al. 1999; WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001); troca aniônica forte (SAX) (ZHOU et al. 2011); eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) (BALCERZAK et al. 2008) e técnicas de focalização isoeletrica (IEF) (CARGILE et al. 2005; CHEN et al. 2002).

Uma ampla variedade de combinações de técnicas cromatográficas em inúmeras dimensões é teoricamente possível, mas considerações práticas na interface dos métodos com o MS limita o uso de muitas delas. Importantes questões incluem a quantidade de tempo necessário para as análises, tipo de tampão usado para separação prévia ao MS, e uma integração efetiva entre as duas dimensões e ao MS (MOTOYAMA; YATES 2008). O último passo, o qual está geralmente acoplado diretamente ao MS, é frequentemente a cromatografia líquida em fase reversa (RPLC) por apresentar uma alta resolução na separação dos peptídeos, ser efetivo na remoção de sal das amostras, e compatível com a detecção por ESI (Ionização por eletrospray) e MS (CLAESSENS; VAN STRATEN 2004).

Vários métodos utilizando marcadores isotópicos estáveis têm sido desenvolvidos para análise proteômica quantitativa do tipo “*shotgun*” (Figura 1). Dentre esses métodos estão marcadores utilizados em cultura de células (*in vivo*) como SILAC - *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture* (análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células) e ^{15}N / ^{14}N marcadores metabólicos, além dos marcadores para estudos *in vitro*, como ICAT - *Isotope-Coded Affinity Tag* (marcador de afinidade enriquecido isotopicamente), MCAT - *Mass-Coded Abundance Tagging*, ICPL - *Isotope Coded Protein Labeling* (proteínas codificadas com marcadores isotópicos), ^{18}O / ^{16}O marcadores enzimáticos, TMT - *Tandem Mass Tags* (marcadores de massa sequencial), iTRAQ - *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (marcador isobárico para quantificação relativa e absoluta), além de outros marcadores químicos (BANTSCHIEFF et al. 2007; BECKER; BERN 2011; CHEN; YATES 2007; CHONG et al. 2010; COLUCCI-D'AMATO et al. 2011; SESHU 2006; UNWIN; GRIFFITHS; WHETTON 2010). Apesar da valiosa contribuição aos estudos das alterações proteicas em misturas complexas, muitas técnicas que utilizam marcadores isotópicos apresentam potenciais limitações como o aumento do tempo e complexidade no preparo das amostras,

necessidade de amostra altamente concentrada, alto custo dos reagentes, marcações incompletas, interferência do sinal devido à co-eluição de componente de massa similar, e a necessidade de um *software* específico para a quantificação (CHELIUS; BONDARENKO 2002; MATTHIESEN; CARVALHO 2010; MUELLER et al. 2008; SCHULZE; USADEL 2010; ZHU; SMITH; HUANG 2010). Além disso, dentre os métodos citados, apenas TMT e iTRAQ permitem a comparação de múltiplas (até 8) amostras ao mesmo tempo. Os outros métodos utilizando marcadores podem comparar somente a quantidade relativa de proteínas entre 2 ou 3 amostras diferentes (BANTSCHEFF et al. 2007; SCHULZE; USADEL 2010).

2.3.1 Análise proteômica quantitativa livre de marcadores (Label-free)

Com a finalidade de tentar resolver as questões existentes nos métodos utilizando marcadores, houve um aumento no interesse nas técnicas de análise proteômica quantitativa do tipo *shotgun* livre de marcadores (*label-free*) (CHEN; YATES 2007; COLUCCI-D'AMATO et al. 2011; PORTEUS et al. 2011).

De uma forma geral, todos os métodos de análise proteômica quantitativa livre de marcadores incluem os seguintes passos fundamentais: preparo da amostra (extração da proteína, redução, alquilação e digestão); separação dos peptídeos proteolíticos utilizando cromatografia líquida uni ou bidimensional (LC ou LC/LC) e análise por MS/MS; análises dos dados incluindo identificação peptídeo/proteína, quantificação, e análise estatística (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Nos métodos que utilizam marcadores, diferentes amostras de proteínas antes ou após a digestão são marcadas com os respectivos isótopos e combinadas em um único tubo e o *pool* é analisado em uma única corrida de LC-MS/MS ou LC/LC- MS/MS. Em contraste, nos métodos quantitativos livre de marcadores, cada amostra é preparada separadamente, e então submetida individualmente à corrida de LC-MS/MS ou LC/LC- MS/MS (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Os métodos para a quantificação de proteínas estão usualmente baseados nas alterações da intensidade dos íons (áreas ou alturas dos picos dos peptídeos na cromatografia), e/ou na contagem dos espectros das proteínas identificadas após análise de MS/MS (BANTSCHEFF et al. 2007; BECKER; BERN 2011). A intensidade do pico do peptídeo ou a contagem dos espectros são determinadas individualmente para cada corrida LC-MS/MS ou LC/LC-MS/MS e

alterações na abundância da proteína são calculadas por comparação direta entre as diferentes análises (ZHU; SMITH; HUANG 2010).

2.3.1.1 Quantificação Relativa por Intensidade de Sinal dos Íons de Peptídeos

A quantificação relativa por intensidade do pico de LC-MS baseia-se somente no MS (não usa dados do MS/MS) (BECKER; BERN 2011). Os valores de m/z obtidos no MS para todos os íons são detectados e suas intensidades de sinal são registradas em um tempo determinado (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Tem sido relatado que a intensidade do sinal de uma ionização por eletrospray (ESI) está altamente correlacionada à concentração do íon. Portanto, os níveis relativos dos peptídeos entre as amostras podem ser determinados diretamente pelas intensidades dos seus picos (VOYKSNER; LEE 1999).

Para avaliar a hipótese de que a área do pico de peptídeos de uma determinada proteína estaria relacionada com a sua concentração, Chelius e Bondarendko (2002) realizaram o primeiro estudo utilizando a quantificação livre de marcadores de peptídeo/proteína via intensidade do pico em LC-MS. Para tanto, 10 fmol-100 pmol de mioglobulina digerida foram aplicados no nano-LC e analisados por LC-MS/MS. Após calcular as áreas dos picos cromatográficos dos peptídeos identificados, observou-se que as áreas dos picos aumentavam com o aumento da concentração do peptídeo injetado. As áreas dos picos de todos os peptídeos identificados da mioglobulina foram combinadas e plotadas contra a quantidade de mioglobulina, e o resultado mostrou uma correlação linear entre a área do pico e a concentração de proteína ($r^2 = 0,991$). Em adição, uma forte correlação entre as áreas dos picos cromatográficos e a concentração peptídeo/proteína também foi observada quando mioglobulina de cavalo foi adicionada em soro humano e os fragmentos digeridos foram detectados por LC-MS/MS (CHELIUS; BONDARENKO 2002).

Embora tenha sido comprovado que a quantificação relativa dos peptídeos poderia ser obtida pela comparação direta da intensidade do pico de cada íon peptídico em múltiplos conjuntos de dados do LC-MS, a aplicação desse método para análise das alterações de expressão de proteínas presentes em amostras biológicas complexas apresenta algumas limitações (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Um dos maiores desafios está no preparo da amostra e no fracionamento quando múltiplas amostras são comparadas quantitativamente, exigindo que o

preparo e todos os passos subsequentes sejam rigorosamente idênticos para todas as amostras (COLUCCI-D'AMATO et al. 2011). A variação experimental decorrentes do preparo e injeção da amostra faz com que uma mesma amostra possa apresentar diferenças nas intensidades dos picos dos peptídeos em diferentes corridas (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Para corrigir esse tipo de variação, além de técnicas meticulosas e reproduzíveis para o preparo da amostra, é necessário fazer uma normalização (BECKER; BERN 2011). O erro experimental pode também ser minimizado pela adição de padrões na amostra (COLUCCI-D'AMATO et al. 2011). Outra limitação seria o fato de que qualquer desvio experimental no tempo de retenção e m/z irá significativamente prejudicar a acurácia na comparação dos múltiplos conjuntos de dados do LC-MS. Alterações cromatográficas podem ocorrer como resultado de múltiplas injeções da amostra em uma mesma coluna para cromatografia líquida em fase reversa. Consequentemente, comparações entre picos desalinhados resultarão em uma grande variabilidade e inacurácia na quantificação. Portanto, uma alta reprodutibilidade do LC-MS e um cuidadoso alinhamento nos picos cromatográficos são necessários e críticos para este método comparativo (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Além disso, devido à grande quantidade de dados coletados durante as análises de LC-MS/MS de misturas complexas de proteínas, algoritmos computacionais específicos são necessários para automatizar o alinhamento dos picos e fazer a comparação dos mesmos (HIGGS et al. 2005).

A fim de resolver essas questões, foram realizados estudos posteriores para automatizar o processamento dos dados em uma escala global (HIGGS et al. 2005; WANG et al. 2003; WIENER et al. 2004). O primeiro passo foi melhorar a detecção do pico, ou seja, distinguir o pico de um peptídeo do sinal de ruído e dos seus picos vizinhos (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Algumas análises automatizadas reduzem a complexidade dos dados através da extração e comparação de picos espectrais e cromatográficos. Isto pode produzir bons resultados, mas como qualquer tentativa de separar o sinal do ruído, corre-se o risco de perder características importantes dos dados (WIENER et al. 2004). Em adição, os tempos de retenção do LC-MS foram cuidadosamente ajustados para corrigir o alinhamento dos picos de massa com o seu correspondente entre as múltiplas corridas de LC-MS (ZHU; SMITH; HUANG 2010). O alinhamento dos picos pode ser feito através de peptídeos que funcionam como pontos de referência (*landmark*) entre duas ou mais amostras a serem comparadas (HIGGS et al. 2005). Foi necessária também a normalização da intensidade do pico cromatográfico (área do pico ou altura)

para permitir uma maior acurácia no alinhamento e quantificação (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Wang et al. (2003) desenvolveram o *MassView software*, que entre outras funções, executa a normalização comparando dois ou mais espectros para determinar a relação de intensidade constante entre analitos invariáveis. Outra alternativa seria a adição de compostos exógenos para normalizar o método de quantificação (WANG et al. 2003). Análises estatísticas foram empregadas para determinar a significância das alterações entre múltiplas amostras (BECKER; BERN 2011; ZHU; SMITH; HUANG 2010). Atualmente, vários softwares de código aberto (*MapQuant*, *MZmine*, *MsInspect*, *OpenMs*, *MSight*, *SuperHirn*, e *PEPPer*) ou comercial (Decyder MS – GE Healthcare, SIEVE – Thermo Electron, Elucidator – Rosetta e ProteinLinx - Waters) estão disponíveis (ZHU; SMITH; HUANG 2010).

No presente estudo foi utilizado o SIEVE software 1.3 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), que consiste em três grandes passos: alinhamento, *framing* e identificação. Para o alinhamento, emprega-se o algoritmo *ChromAlign* que minimiza os efeitos da variabilidade cromatográfica, tornando a análise diferencial mais confiável. Neste primeiro passo, pares de espectro de varredura completa são alinhados. No segundo passo, o SIEVE utiliza um processo exclusivo (*Recursive Base-Peak Framing*) para gerar um único “*frame*” para cada grupo de picos com valor de m/z e intervalo de tempo de retenção específicos. Todos os picos acima de um dado limite, de todos os dados brutos, são coletados de forma que nenhuma informação seja perdida. Utilizando todos os dados brutos LC/MS para enquadrar os picos no *frame* em um espaço tridimensional (m/z versus tempo de retenção versus intensidade do pico), o SIEVE fornece um resultado mais confiável comparado com abordagens que utilizam a manipulação dos picos (*peak-modeling*). Para cada *frame* é feita a reconstrução do cromatograma iônico. *Frame a frame*, o algoritmo determina se existe uma abundância diferencial estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratados. O programa fornece informações úteis como o valor de p , razão, o desvio padrão da razão, número de varreduras MS2, correlação MS/MS e razão normalizada do cromatograma iônico total. No último passo, os peptídeos que apresentam diferenças estatisticamente significativas são comparados contra um banco de dados para a identificação do peptídeo e da proteína. Essa função de pré-filtração reduz o número de componentes necessários a serem avaliados, reduzindo significativamente o tempo utilizado para identificação e tornando mais rápido o processamento para descoberta de biomarcadores (THERMOSCIENTIFIC1 ; THERMOSCIENTIFIC2 ; THERMOSCIENTIFIC3).

2.3.1.2 Quantificação Relativa por Contagem Espectral

No método da contagem espectral, a quantificação relativa de proteínas é obtida pela soma do número de espectros MS/MS identificados de uma mesma proteína em cada um dos múltiplos conjuntos de dados do LCMS/MS ou LC/LC-MS/MS. Isto é possível, pois um aumento da abundância da proteína resulta no aumento do número de seus peptídeos proteolíticos, e vice-versa. Geralmente, este aumento no número de fragmentos tripticos resulta em um aumento da cobertura da sequência proteica, do número de peptídeos únicos identificados, e do número total de espectros MS/MS identificados (contagem espectral) para cada proteína (ZHU; SMITH; HUANG 2010).

Adicionando proteínas marcadoras às amostras de lisados celulares, Liu et al. (2004) estudaram a correlação entre a abundância relativa da proteína e a cobertura da sequência, o número de peptídeos, e a contagem espectral. Foi demonstrado que entre todos os fatores de identificação, somente a contagem espectral mostrou uma forte correlação linear com a abundância relativa da proteína ($r^2 = 0,9997$), apresentando uma faixa dinâmica superior a 2 ordens de magnitude (LIU; SADYGOV; YATES 2004).

Portanto, a contagem espectral mostrou ser um simples, mas confiável índice para quantificação relativa de proteínas (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Entretanto, este método se torna pouco confiável quando o número de identificações por proteína é muito pequeno, menor ou igual a 5. Esse é um dos problemas do método, pois muitas proteínas em uma mistura complexa entram nessa categoria de identificações limitadas, com poucos ou apenas um peptídeo identificado, somado ao fato de que cada amostra precisa ser extensivamente submetida às análises MS/MS (BECKER; BERN 2011).

Ao contrário da quantificação baseada na intensidade do pico cromatográfico, a qual requer algoritmos computacionais para automatizar o alinhamento dos picos de LC-MS e sua comparação, a contagem espectral não necessita de uma ferramenta ou algoritmos específicos. Entretanto, a normalização e a análise estatística do conjunto de dados da contagem dos espectros são necessárias para alcançar uma detecção precisa e confiável das alterações proteicas em misturas complexas (ZHU; SMITH; HUANG 2010). A normalização é exigida, pois o ponto fraco no uso desse método baseado na contagem espectral diz respeito ao tamanho específico de cada proteína: quanto maior ela for, mais fragmentos têm probabilidade de serem identificados.

Uma vez que as proteínas maiores tendem a contribuir com número maior de peptídeo/espectros do que as menores, o fator de abundância espectral normalizado (NSAF) foi definido para corrigir o efeito do comprimento da proteína na contagem espectral (FLORENS et al. 2006; POWELL et al. 2004; ZYBAILOV et al. 2006). A correção dessa diferença é feita dividindo-se o número de espectros identificados por MS/MS (SpC - contagem espectral) para cada proteína ou peptídeo pelo comprimento de sua cadeia polipeptídica, dando origem ao fator de abundância espectral, SAF eq. (1). Para calcular o NSAF, divide-se cada SAF pela soma dos SAFs de todas as proteínas obtidos no mesmo experimento eq. (2) (ZYBAILOV et al. 2006).

$$(SAF)_k = \left(\frac{SpC}{L} \right)_k \quad (1)$$

$$(NSAF)_k = \frac{\left(\frac{SpC}{L} \right)_k}{\sum_{i=1}^N \left(\frac{SpC}{L} \right)_i} = \frac{(SAF)_k}{\sum_{i=1}^N (SAF)_i} \quad (2)$$

Na análise proteômica quantitativa, como um conjunto de contagens se resume a um único parâmetro, comparações entre amostras são feitas na forma de razões. O fato de usar somente razões para comparar as diferenças de expressão e a falta, em geral, de replicatas biológicas impossibilitam a análise estatística do conjunto de dados obtidos (ZYBAILOV et al. 2006). Embora as razões representem uma condição biológica, as análises estatísticas padrão não se aplicam às mesmas, uma vez que não representam populações no sentido estatístico (TOWNEND 2005). Se por um lado as diferenças na expressão obtidas pela razão têm importância biológica, por outro lado, é sem dúvida mais importante ainda determinar se essa alteração na expressão é ou não estatisticamente significativa (ZYBAILOV et al. 2006). A fim de resolver essa questão, Zybaïlov et al. (2006) demonstraram que a transformação algorítmica dos valores de NSAF resultaram em uma distribuição gaussiana/normal destes dados, permitindo a utilização de testes estatísticos. Zhang et al. (2006) realizaram um estudo no qual compararam 5 testes estatísticos

diferentes para avaliar a significância na expressão proteica diferencial utilizando a quantificação baseada em contagem espectral. O teste exato de Fisher, teste G, teste estatístico AC, teste t de *Student* e *Local-Pooled-Error* (LPE) foram aplicados para os dados de contagem espectral obtidos por análise MudPIT de proteínas digeridas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). O teste t de *Student* demonstrou ser o melhor quando 3 ou mais repetições estão disponíveis. Os testes exato de Fisher, G e AC estariam mais indicados quando o número de repetições é limitado (um ou dois). Em adição, o teste-G tem como vantagem a sua simplicidade computacional (ZHANG et al. 2006).

Proteínas extraídas de *S. cerevisiae* cultivadas em meio de cultura mínimo e rico utilizando ^{15}N e ^{14}N sulfato de amônio como a única fonte de nitrogênio, respectivamente, foram analisados por MudPIT e quantificados usando métodos de contagem espectral e cromatografia de íons. Os dois métodos quantitativos mostraram uma forte correlação quando foram utilizados na comparação os peptídeos que apresentaram razão sinal/ruído elevada no cromatograma iônico. Além disso, a quantificação baseada na contagem espectral mostrou-se mais reprodutível e com uma maior faixa dinâmica do que a quantificação baseada no cromatograma de íons peptídicos (ZYBAILOV et al. 2005).

2.3.1.3 Quantificação Absoluta Livre de Marcadores

Além da quantificação relativa, métodos livres de marcadores também podem ser usados para determinar a concentração absoluta de proteínas em uma amostra.

O emPAI (índice de abundância proteica exponencialmente modificado) calcula a abundância proteica dividindo o número de peptídeos detectados pelo número de peptídeos tripticos teóricos observados para cada proteína. Este índice vem sendo utilizado para estimar a abundância proteica em análise proteômica de larga escala (ISHIHAMA et al. 2005; RAPPILBER et al. 2002; ZHU; SMITH; HUANG 2010). Outro método, o APEX (expressão proteica absoluta), é baseado na contagem espectral e usa fatores de correção para tornar a abundância proteica proporcional ao número de peptídeos observados (LU et al. 2007; ZHU; SMITH; HUANG 2010).

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA EM TECIDO ÓSSEO

A proteômica quantitativa vem sendo aplicada para identificar e comparar perfis de proteínas e suas alterações no tecido ósseo e em diferentes tipos de células ósseas (LAMMI; HAYRINEN; MAHONEN 2006). Os principais objetivos desses trabalhos são descobrir proteínas específicas que poderiam funcionar como candidatas a biomarcadores de doenças e fornecer informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos (ZHANG et al. 2010). Na área das doenças ósseas, técnicas de análise proteômica quantitativa como 2D-PAGE juntamente com MS e mais recentemente a proteômica *shotgun* LC-MS/MS com marcadores ou livre de marcadores têm sido utilizadas para comparação de perfis de expressão proteica entre o estado normal e de doenças como a osteoporose (BIVI et al. 2011; DENG et al. 2011; FAN et al. 2005; HONG et al. 2011; KOH et al. 2009; PASTORELLI et al. 2005), osteossarcoma (FOLIO et al. 2009; KANG et al. 2006; KAWAI et al. 2008; LI et al. 2010), osteoartrite (GUO et al. 2008) e osteonecrose da cabeça femoral (TAN et al. 2006; ZHANG; WANG 2009).

As abordagens proteômicas também têm sido utilizadas para investigar os efeitos dos agentes terapêuticos. PASTORELLI et al. (2005) utilizaram 2D-PAGE e MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS para investigar os efeitos do estrógeno *in vivo* em um modelo animal osteoporótico, e encontraram 14 proteínas com alteração na expressão protéica, dentre elas tropomiosina, aconitase 2 e enolase beta, que estão relacionadas aos componentes do citoesqueleto e vias metabólicas. Em outro estudo, a análise proteômica *shotgun* livre de marcadores foi empregada para investigar em cultura de osteócitos MLO-Y4, o efeito do risedronato, um bifosfonato contendo nitrogênio utilizado para o tratamento de osteoporose. Foram identificadas 10 e 15 proteínas diferencialmente expressas após 1 h e 48 h de tratamento com 10^{-7} M de risedronato, respectivamente. Dentre elas, a PARK7/DJ-1 apresentou um nível de expressão 3 vezes maior e os autores sugerem que esse aumento está associado à ativação da via de sinalização AKT pró-sobrevivência em osteócitos (BIVI et al. 2011).

Apesar de ser um dos poucos agentes anabólicos conhecidos capaz de estimular a atividade osteoblástica, o uso clínico do F para o tratamento da osteoporose ainda permanece controverso. Considerando-se que o F pode alterar as propriedades ósseas, interferindo não apenas no processo de mineralização como também na secreção e degradação de proteínas da matriz orgânica, e fatores genéticos parecem influenciar na resposta óssea à exposição ao F, estudos que visem a

identificar a abundância proteica diferencial poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Xu et al. (2008) analisaram o efeito de 2 ppm de F por 72 horas em cultura de células osteoblásticas isoladas da calvária de camundongos neonatos, utilizando 2-PAGE e MALDI-TOF MS. Foram encontradas 28 proteínas com alterações de expressão significativa ($p < 0.05$) nos grupos tratados com F. Destas, 12 proteínas foram identificadas associadas com proliferação celular, metabolismo e dobramento proteico oxidativo. Embora estudos *in vitro* sejam capazes de revelar eventos celulares e vias de transdução de sinal em cultura de células, não é possível determinar se esses achados têm a mesma significância *in vivo*. Portanto, a utilização de camundongos susceptíveis ou resistentes aos efeitos do F nos tecidos mineralizados, expostos a diferentes doses de F, parece ser o modelo ideal para que estes eventos moleculares possam ser estudados *in vivo*, empregando análise proteômica quantitativa livre de marcador.

3. Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o mecanismo molecular envolvido na susceptibilidade genética aos efeitos do F no tecido ósseo, utilizando duas linhagens de camundongos que apresentam diferentes susceptibilidades dos tecidos mineralizados ao F (A/J “susceptível” e a 129P3/J “resistente”), após administração de água suplementada com 10 ou 50 ppm F por 8 semanas.

Os objetivos específicos foram:

- Quantificar a concentração de F no plasma e fêmur;
- Avaliar a atividade da fosfatase alcalina no plasma;
- Avaliar uma variedade de parâmetros histomorfométricos estáticos no fêmur, tíbia e vértebra lombar (L4), empregando análise de micro-CT;
- Avaliar a taxa de aposição mineral (MAR) no fêmur;
- Identificar e quantificar relativamente as proteínas com abundância diferencial no fêmur entre as linhagens para cada tratamento e entre os tratamentos para cada linhagem, empregando análise proteômica quantitativa livre de marcadores.

Em adição, objetivou-se caracterizar as proteínas ósseas de camundongos da linhagem 129P3/J empregando eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (catiônico, aniônico e SDS-PAGE) e análise proteômica (LC-ESI-MS/MS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO COM FLÚOR

Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da FOB-USP, Processo 006/2008 (Anexo A).

A linhagem de camundongos 129P3/J utilizada no presente estudo não existe no Brasil e, portanto, precisou ser importada. As linhagens de camundongos 129P3/J e A/J foram obtidas do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME).

Para o presente estudo foram utilizados 96 camundongos machos divididos em três grupos para cada linhagem (n=16 animais/grupo, totalizando 48 da linhagem A/J e 48 da linhagem 129P3/J). Os animais recém-desmamados (21 dias) foram mantidos em caixas plásticas padrão ou gaiolas metabólicas. O grupo 1 recebeu água deionizada, o grupo 2 recebeu água deionizada suplementada com 10 ppm F e o grupo 3 recebeu água deionizada suplementada com 50 ppm F, por 8 semanas. As amostras de água deionizada e preparada com F foram periodicamente analisadas para este elemento, com propósito de controle de qualidade. A dose de 10 ppm F foi selecionada por corresponder em humanos à dose de 1 ppm F, que é a concentração usualmente adicionada à água de abastecimento público (DUNIPACE et al. 1995). Selecionou-se a dose de 50 ppm F por ser a concentração de F na água de beber para se obter concentrações de F no soro dos camundongos ($\approx 8 \mu\text{mol/L}$ ou 0,167 ppm) correspondentes à concentração no soro de humanos submetidos ao tratamento de osteoporose com F (MOUSNY et al. 2006). Um estudo metabólico realizado por Carvalho et al. (CARVALHO et al. 2009) revelou que os camundongos da linhagem “susceptível” A/J ingerem um volume de água (independentemente da concentração de F nessa água) cerca de 30-40% maior que aquele ingerido pela linhagem “resistente” 129P3/J. Nesse estudo, as concentrações de F na água foram ajustadas semanalmente para se garantir que animais de ambas as linhagens tivessem exposições ao F similares. Portanto, no presente estudo, o consumo de água também foi avaliado semanalmente e as concentrações de F adicionadas à água foram ajustadas, a fim de se assegurar que os animais de ambas as linhagens tivessem exposição semelhante ao F. A ração fornecida aos animais foi a AIN-93, com baixo teor de F (menos que 3 $\mu\text{g/g}$), a fim de não mascarar o efeito da dose de 10 ppm de F administrada através da água. Isto é necessário, pois em estudos prévios realizados em nosso laboratório, as rações

comerciais têm demonstrado ter teores de F superiores a 20 $\mu\text{g/g}$ (BUZALAF et al. 2004; BUZALAF et al. 2005).

4.2 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Após o período experimental, os animais foram anestesiados. 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 μL foram estocadas a -80°C .

Foram coletados 48 fêmures direitos para análise proteômica ($n= 8$ fêmures/grupo) e 48 fêmures esquerdos para análise de F ($n=8$ fêmures/grupo), 24 fêmures direitos para análise de Western Blotting ($n=4$ fêmures/grupo), 48 fêmures esquerdos para análise da taxa de aposição mineral (MAR – Mineral apposition rate) e microtomografia computadorizada (micro-CT) ($n=8$ fêmures/grupo) e 48 tíbias esquerdas ($n=8$ tíbias/grupo) e 48 vértebras lombares ($n=8$ vértebras L4/grupo) para análise de micro-CT.

Os fêmures e as tíbias foram extraídos e o tecido muscular removido com auxílio de uma gaze. Os fêmures direitos foram lavados com PBS com inibidores de protease para remover contaminantes e armazenados em nitrogênio líquido, para posteriormente serem submetidos à análise proteômica e *Western Blotting*. Parte dos fêmures e tíbias esquerdos e vértebras lombares (L4) foram armazenados em 95% etanol a 4°C para análise de MAR e micro-CT. Os fêmures esquerdos foram secos e pesados para subsequente análise de F, como descrito abaixo.

4.3 DOSAGEM DE F 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 deverá 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 (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 possa contaminar a amostra.

Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a saída do CO₂, 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 (hexametil-disiloxano) (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 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 µmol/L (0,0095-0,019 µg/mL), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,0095-0,019 µg, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo

Para validação da análise de F, as soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma a serem analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tiver 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 (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para 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.

4.4 DOSAGEM DE F 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 de 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).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) NO PLASMA

A atividade da ALP é dada pela conversão do p-nitrofenilfosfato (pNPP), substrato da enzima, pelo p-nitrofenol (p-NP), produto de coloração amarela. A atividade da ALP foi quantificada no plasma dos animais. Para o ensaio, realizado em placas de 96 poços, foi adicionado 125 µL da solução contendo tampão glicina (25mM, pH 9,4), acrescido de 2 mM de MgCl₂ e 1 mM de pNPP). Após incubação por 30 minutos a 37°C (tempo necessário para a estabilização), foram adicionados 5 µl das amostras por poço. A placa foi mantida a 37° C durante o tempo necessário para a reação ocorrer. A reação foi paralisada com NaOH 1 M, seguida da leitura em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração total de proteínas foi

determinada pelo método Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay, Bio Rad). Para calcular a atividade da ALP, as absorbâncias obtidas foram transformadas em $\mu\text{mol/mL}$ utilizando-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) que para o p-NP equivale a $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A quantidade de p-NP final foi multiplicada pelo volume final da reação ($300 \mu\text{L}$) e dividida pelo tempo da reação (20 min). A atividade da ALP foi expressa como atividade enzimática específica pela quantidade em mg de proteína total dada em $\mu\text{mol p-NP min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

4.6 ANÁLISE DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

Os fêmures, tíbias e vértebras lombares (L4) fixados em etanol 95% foram escaneadas utilizando o *Skyscan 1074HR microCT* (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) com uma resolução de $20,5 \mu\text{m/pixel}$. O instrumento foi calibrado usando *Hydroxyapatite phantoms* (250 mg/cc e 750 mg/cc) (CIRS, Inc., Norfolk, VA). O *software* CT-analyser foi empregado para calcular uma variedade de parâmetros histomorfométricos estáticos a partir da reconstrução 2D das secções transversais da amostra (análise 2D) e da reconstrução do volume da amostra (análise 3D). A região de interesse (osso trabecular) para cada tíbia e vértebra lombar (L4) foi definida e analisada para determinar a densidade mineral óssea (BMD - *bone mineral density*), a razão entre o volume ósseo trabecular e o volume total da amostra (BV/TV - *bone volume fraction*), a razão entre a superfície óssea trabecular e o volume ósseo trabecular (BS/BV - *specific bone surface*), a razão entre a superfície óssea trabecular e o volume total da amostra (BS/TV - *bone surface density*), o fator de forma do osso trabecular (Tb.Pf - *trabecular bone pattern fator*), a espessura trabecular (Tb.Th - *trabecular thickness*), a separação trabecular (Tb.Sp - *trabecular separation*), e o número e densidade trabecular (Tb.N - *trabecular number density*).

A região cortical de interesse no fêmur foi definida em 1 mm acima e 1 mm abaixo do ponto médio da diáfise do fêmur e foi utilizada para determinar os seguintes parâmetros: área média do osso nas secções transversais da amostra (B.Ar - *mean total cross sectional bone area*), perímetro médio do osso nas secções transversais da amostra (B.Pm - *mean total cross sectional bone perimeter*), área média de tecido total nas secções transversais da amostra (T.Ar - *mean total crosssectional tissue area*), perímetro médio do tecido total nas secções transversais da amostra (T.Pm - *mean total crosssectional tissue perimeter*), média do momento polar de inércia (MMI -

mean polar moment of inertia) e densidade mineral óssea cortical (cortical BMD – *cortical bone mineral density*).

4.7 TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR)

Em 48 animais, previamente à eutanásia, foi realizada uma marcação óssea para análise da taxa de aposição mineral (MAR). Para tal, foram administrados 10 mg/Kg corporal de calceína em 2% de bicarbonato de sódio, (num volume de 0,1 mL/camundongo), por via intra-peritoneal, em dose única, 11 dias antes da eutanásia (Figura 2A). Em adição, 2 dias antes da eutanásia, foi administrada alizarina Complex one (Figura 2B) em uma dose de 30 mg/Kg peso corporal via intra-peritoneal, num volume de 0,1 mL por camundongo (Everett, comunicação pessoal). Dessa forma, o intervalo de tempo entre os marcadores de atividade óssea foi de 9 dias. Após o período experimental os animais foram eutanasiados e os fêmures coletados como descrito acima.

Figura 2 – Administração de 10 mg/Kg corporal de calceína em 2% de bicarbonato de sódio (A) e 30 mg/Kg corporal de alizarina *complex one* (B) por via intra-peritoneal, em dose única, 11 e 2 dias antes da eutanásia, respectivamente.

Os ossos fixados em 95% de etanol (v/v) e armazenados em 70% de etanol (v/v) foram secos com gaze e emblocados em resina epóxi, Pelco Eponate 12 (25,7 mL resina + 9,3 mL DDSA + 16,5 mL NMA + 1,6 mL BDMA) (Ted Pella, Inc., Redding, CA, EUA). Após 24 h de polimerização a 60°C, as amostras foram seccionadas utilizando a cortadeira Buehler Isomet com baixa velocidade (Buehler Inc., Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco diamantado dupla face. Os cortes com 200-300 µm de espessura foram cimentados em lâminas de vidro e posteriormente polidos com lixas de carbetto de silício com granulação de 600-C, umedecidas com água, (Mager Scientific Inc., Dexter, MI, EUA) para se obter uma espessura final de 100 µm. Os fluorocromos calceína (fluorescência verde) e alizarina complexona (fluorescência vermelha) foram visualizados em um aumento de 100X e 400X empregando um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) equipado com um conjunto de filtro de banda dupla XF52 (excitação em 490 e 550, dicroica 490-550 e emissor de 520-580) (Omega Optical, Brattleboro, VT, EUA). As imagens foram capturadas com a câmera digital Nikon DXM1200 e processadas no software ACT-1 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA). A taxa de aposição mineral por dia (MAR/dia) foi determinada pela média das distâncias entre as linhas correspondentes aos dois marcadores no endósteo e periósteo, dividida pelo intervalo de tempo entre a administração dos marcadores (9 dias). A figura 3 apresenta as etapas envolvidas na avaliação da taxa de aposição mineral do fêmur.

Figura 3 – Avaliação da taxa de aposição mineral (MAR) de fêmures de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J submetidos a tratamento com 0, 10 e 50 ppm F.

4.8 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS ÓSSEAS DE CAMUNDONGOS

Para avaliar a eficiência de métodos para extração de proteínas, foi realizado um estudo piloto, empregando 3 metodologias diferentes, baseados nos estudos de Jiang et al. (2007) e Domenicucci et al. (1988).

Foram realizados dois *pools* dos extratos ósseos obtidos a partir de 2 fêmures, obtendo-se duas amostras para cada método de extração testado. Os fêmures foram coletados de camundongos da linhagem A/J que receberam por 8 semanas água deionizada.

No primeiro método testado (JIANG et al. 2007) foi realizada a extração de proteína com o fêmur desmineralizado. O osso foi incubado (0,2 g de tecido ósseo/mL de solução) a 4°C, *overnight*, em 1,2 M HCl para desmineralização do tecido ósseo. Centrifugou-se a 8000 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato A. O osso desmineralizado foi lavado com PBS (pH 7,4) contendo inibidores de protease e incubado em tampão de lise (6 M de guanidina-HCl, 100mM Tris, pH 7,4) contendo inibidores de protease (PMSF 1 mM, fenantrolina 1 mM e NEM 1 mM) por 72 h a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato 1 após centrifugação a 8000xg por 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado com PBS contendo inibidores de protease e submetido a uma nova extração com o mesmo tampão de lise, acrescentando-se de EDTA tetrasódio 0,5 M. O sobrenadante foi coletado como extrato 2 após centrifugação a 8000xg por 10 min a 4°C. Finalmente, o precipitado foi incubado em HCl 6 M a 4°C. Centrifugou-se a 8000xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado como extrato 3. Foram obtidos os extratos A, 1, 2 e 3.

No segundo método de extração (DOMENICUCCI et al. 1988), os fêmures foram triturados em nitrogênio líquido utilizando grau e pistilo. O osso triturado foi lavado com PBS contendo inibidores de protease a 4°C. Centrifugou-se a 8000xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado em tampão de lise, o *G-buffer* (4 M de guanidina-HCl, 50 mM Tris, pH 7,4) contendo inibidores de protease (PMSF 1 mM, fenantrolina 1 mM e NEM 1 mM) por 96 h a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato 1 após centrifugação a 8000xg por 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado com PBS contendo inibidores de protease e submetido a uma nova extração com o tampão de lise *E-buffer* (EDTA tetrasódico 0,5 M, Tris 50 mM, pH 7,4) por 96 h a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato 2 após centrifugação a 8000xg por 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado com PBS contendo inibidores de protease e submetido à última extração com o tampão de lise *G-buffer* por 96 h a 4°C. Centrifugou-se a 8000xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado como extrato 3. Foram obtidos os extratos 1, 2 e 3.

No terceiro método de extração, adaptado do estudo de Domenicucci et al. (1988), os fêmures foram triturados em nitrogênio líquido utilizando grau e pistilo. O osso triturado foi lavado com PBS (pH 7,4) contendo inibidores de protease a 4°C. Centrifugou-se a 8000xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato A e o precipitado submetido ao mesmo processo de extração descrito para o segundo método (extração com o *G-buffer*, *E-buffer* e novamente o *G-buffer*). Foram obtidos os extratos A,1, 2 e 3.

Para cada método foi feito um *pool* de todos os extratos, seguido de precipitação com o *PlusOne 2D Clean-up kit* (GE Healthcare), para remover o excesso de sais, açúcar, ácido nucléico e lipídeos. O precipitado protéico foi solubilizado em um tampão de re-hidratação contendo Uréia 7 M, thiouréia 2 M, CHAPS 2%, IPG buffer 0,5 % pH 3-10, azul de bromofenol 0,5 % e DTT 0,25%. A concentração de proteína foi determinada com o método de Bradford (BioRad), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão foram aplicadas 335 µg de proteína para cada gel.

As fitas IPG de 24 cm com pH 3–10 linear (GE Healthcare) foram reidratadas durante 12 h a 20°C. As proteínas foram submetidas à focalização em Vh programada em 4 etapas (500 Vh, 800 Vh, 11300 Vh e 2900 Vh), com a voltagem total hora de 15.500 Vh.

As fitas submetidas à focalização isoeletrica foram equilibradas em duas etapas em uma solução tampão de equilíbrio com SDS. As fitas IPG foram colocadas individualmente em tubos contendo 10 mL da solução de equilíbrio com 100 mg de DTT por 30 min. E então, por 30 min adicionais, em tubos contendo 10 mL da solução de equilíbrio com 250 mg de Iodoacetamida.

A segunda dimensão foi conduzida no Ettan Dalt Six Large Vertical System (Amersham Biosciences, Upssala, Suécia) com géis SDS-PAGE 12,5% (255 mm X 200 mm X 1,5 mm). Foi utilizado como padrão de proteína o SDS- PAGE *Standards Broad Range Molecular Weight* (Bio-Rad). Foi feita uma pré-corrida com 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 hora, e então uma corrida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 120 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel.

Terminada a corrida, o gel foi colocado em solução de fixação (ácido ortofosfórico 1,3% e metanol 20 %), durante duas horas, para prevenir a mobilidade da proteína no gel e lavar os anfólitos. Para a visualização dos *spots*, os géis foram lavados com água deionizada e as proteínas foram coradas com a solução de Coomassie *Blue* coloidal (ácido fosfórico 10%, sulfato de

amônio 10%, Coomassie G-250 0,12% e metanol 20%) desenvolvida por Neuhoff et al. (1988) e modificada por Candiano et al.(2004), durante 24 h. Após esse período, foram lavados com água deionizada e corados com uma solução nova de Coomassie *Blue* coloidal, por mais 24 horas. Finalmente, foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 5%.

Os géis corados foram escaneados e digitalizados com resolução de 200 dpi, utilizando o programa LabScan 5.0 (GE Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences).

Para cada método de extração de proteínas ósseas testado foram obtidos 2 géis. Em cada gel foi aplicada uma amostra obtida a partir do *pool* de 2 fêmures. As figuras 4A, 4B e 4C apresentam o mapa bidimensional das proteínas de fêmures de camundongos A/J do grupo controle, que foram extraídas utilizando os métodos 1 (JIANG et al. 2007), 2 (DOMENICUCCI et al. 1988) e 3 (DOMENICUCCI et al. 1988 modificado), respectivamente.

Tabela 1 – Quantificação protéica utilizando Bradford para três diferentes métodos de extração de proteínas ósseas

Amostra	Método 1 (µg/mL)	Método 2 (µg/mL)	Método 3 (µg/mL)
Amostra 1 (Pool de 2 fêmures de camundongos da linhagem A/J controle)	896	738	1046
Amostra 2 (Pool de 2 fêmures de camundongos da linhagem A/J controle)	854	718	1028

A tabela 1 apresenta os resultados da quantificação protéica utilizando o método de Bradford. Dentre o três métodos testados, o método 3 apresentou os melhores resultados tanto em relação à quantidade de proteínas recuperadas como também ao número de *spots* detectados nos géis. No método 2, como a primeira lavagem com PBS é descartada, provavelmente ocorreu a perda das proteínas sanguíneas da medula óssea. Isso explicaria o menor número de *spots* detectados nos géis de proteínas ósseas extraídos com o método 2 (Figura 4B).

Figura 4 – Gel 2DE representativo de proteínas de fêmures de camundongos A/J controle extraídos com o método 1 (A), 2 (B) e 3 (C). As proteínas ósseas foram separadas em *strips* de 24 cm e pH 3-10 linear, seguido de SDS-PAGE e coradas com azul de coloidal CBB G250.

Considerando todos os resultados, para realizar o presente estudo foi escolhido o método 3 (DOMENICUCCI et al. 1988 modificado). Cada linhagem foi dividida em três grupos (controle, tratado com 10 ppm F e 50 ppm F) e para cada grupo foi realizado um *pool* com 8 fêmures para extração protéica utilizando o método 3, conforme descrito anteriormente e demonstrado na figura 5. Foram obtidos 4 extratos: PBS, G1, E e G2, sendo que o G1 e G2 foram reunidos em um único extrato (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma do método de extração sequencial para proteínas ósseas (DOMENICUCCI et al. 1988 modificado).

4.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE PROTEÍNAS DE FÊMUR

Com a finalidade de verificar a necessidade de uma separação prévia ao LC-ESI-MS/MS e estabelecer qual tipo de coluna cromatográfica estaria mais indicada, foi realizada a caracterização das proteínas. Para tanto, foram utilizados extratos das proteínas de fêmures de camundongos da linhagem 129P3/J.

4.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Para o extrato de PBS não foi realizado nenhum tratamento adicional, evitando passos desnecessários que aumentariam as chances de perda de proteínas. Para remover componentes insolúveis e melhorar a separação das bandas, as amostras foram clarificadas por centrifugação a $16000 \times g$ por 5 min, 4°C , o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A figura 6 compara 20 μg de proteína de extratos de PBS sem centrifugação prévia, do sobrenadante e do precipitado coletados após clarificação por centrifugação aplicados no SDS-PAGE 12%. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra SDS (com ou sem adição de EDTA 0,5 mM), aquecidas a 100°C , e aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 120V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel e as proteínas no gel foram coradas com *Coomassie Blue* (0.2% *Coomassie Brilliant Blue G*, 40% metanol e 10% ácido acético) *overnight*, e o *background* descorado com solução contendo 40% metanol e 10% ácido acético (Figura 6A). Posteriormente o gel foi corado com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) (Figura 6B).

Figura 6 – SDS-PAGE 12% de extratos PBS de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 20 μg dos extratos de PBS não submetidos à centrifugação prévia sem e com adição de 0,5 mM EDTA, do sobrenadante após centrifugação sem e com adição de 0,5 mM EDTA e do precipitado após centrifugação sem e com adição de EDTA 0,5 mM foram aplicadas nos poços 2, 3, 5, 6, 8 e 9, respectivamente. As proteínas foram coradas com *Coomassie Blue* (A) e prata (B).

Os extratos, G1 e G2, obtidos com o tampão de guanidina HCl, foram reunidos em um único extrato G1G2. Inicialmente, os extratos G1G2 foram submetidos à filtração centrífuga, utilizando o Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Unit* com membrana Ultracel-3 (Millipore, Billerica, MA, EUA). Um volume de 4 mL de amostra foi concentrado para cerca de 500 μ L. Entretanto, com a redução da concentração da guanidina HCl, formou-se um agregado proteico não solúvel em água. Esse agregado de proteínas foi resolubilizado em tampão de guanidina HCl 1 M, pH 7,4. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit*, (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Para cada extrato, um volume correspondente a 10 μ g foi concentrado no *speed vac*, ressuspensão no tampão contendo SDS, aquecido a 100°C por 5 min e aplicado no SDS-PAGE 12%. Entretanto, a guanidina HCl, presente nos extratos G1G2, mesmo em baixa concentração (1 M), formou um precipitado quando entrou em contato com o SDS presente no tampão de amostra, dificultando a aplicação da amostra no gel. Durante a corrida, a força iônica das amostras tratadas com a guanidina HCl fez com o que uma parte da amostra não entrasse no gel, além de aumentar a condutividade da corrida. Para compensar este aumento, a voltagem foi reduzida de 130 V para 30 V, elevando o tempo total da corrida para cerca de 5 h. O gel foi corado com *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue G 0,2%*, metanol 40% e ácido acético 10%) *overnight*, e descorado com solução contendo metanol 40% e ácido acético 10% (Figura 7).

Figura 7 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmures de camundongos AJ grupo controle (AJC). Foram aplicados 10 μ g do extrato G1G2. As proteínas foram coradas com *Coomassie Blue*.

Para determinar qual concentração de guanidina HCl seria compatível com SDS, 20 µg de saliva da parótida sem ou com guanidina HCl 1 M, 2 M ou 4 M foram ressuspensas em tampão de amostra contendo SDS, aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas no SDS-PAGE 12%. Todas as amostras com guanidina HCl apresentaram um precipitado, sendo maior a medida que aumentou-se a concentração de guanidina HCl (Figura 8). A força iônica das amostras tratadas com a guanidina HCl aumentou a condutividade, diminuindo o campo eletroforético, mesmo em baixas concentrações (Figura 9 e 10).

Figura 8 – SDS-PAGE de saliva da parótida (PS). Alíquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. Apenas as amostras contendo guanidina HCl apresentaram o precipitado, cujo aumento foi diretamente proporcional à concentração de guanidina HCl.

Figura 9 – SDS-PAGE 12% de saliva da parótida (PS). Alíquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. Durante a corrida, a guanidina HCl aumentou a condutividade do gel, diminuindo o campo eletroforético, mesmo em baixas concentrações.

Figura 10 – SDS-PAGE 12% de saliva da parótida (PS). Aliquotas correspondentes a 20 µg de PS contendo guanidina HCl 4 M, 2 M, 1 M ou não foram aplicadas nos poços 3, 5, 7 e 9, respectivamente. As proteínas foram coradas com *Coomassie Blue*.

Para remover o excesso de guanidina HCl das amostras, os extratos G1G2 foram submetidos à precipitação com etanol 90%, conforme Pepinsky (1991). Volumes correspondentes a 10 e 20 µg do extrato G1G2 de fêmur de camundongo 129P3/J controle foram concentrados no *speed vac*. Para cada amostra, foram adicionados 1200 µL de etanol 90%. A amostra foi agitada no vórtex até dissolver completamente o precipitado e incubada por 10 min a - 40°C. Centrifugou-se a 16000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente pipetado e descartado. O precipitado foi ressuspensão em 1200 µL de etanol 90% e, após agitação no vórtex, centrifugou-se novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em tampão de amostra contendo SDS. As amostras foram aquecidas a 100° C por 5 min e aplicadas no SDS-PAGE 12%. A corrida foi realizada a 120 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. O gel foi corado com *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue G 0,2%*, metanol 40% e ácido acético 10%) *overnight*, e descorado com solução contendo metanol 40% e ácido acético 10% (Figura 11A). Posteriormente, as proteínas no gel foram coradas com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (*Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*) (Figura 11B).

Figura 11 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmur de camundongo 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 10 e 20 µg do extrato G1G2 foram precipitadas com etanol 90% e aplicadas nos poços 3 e 5, respectivamente. As proteínas foram coradas com *Coomassie Blue* (A) e prata (B).

O extrato E foi obtido com o tampão contendo EDTA 0,5M, o qual é um agente quelante de cobre. O ensaio do ácido bicinonínico (BCA) combina a redução do cobre pela proteína em um meio alcalino com a alta sensibilidade e seletividade da detecção colorimétrica do cátion de cobre utilizando um reagente único contendo ácido bicinonínico. De acordo com informações do fabricante, o *Pierce BCA Protein Assay Kit* é compatível com até 10 mM EDTA. Em adição, o extrato E contém grandes quantidades de cálcio e fosfato. Assim, com a finalidade de remover o excesso de EDTA e outras substâncias interferentes foi realizada a filtração centrífuga utilizando o *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit* com membrana *Ultracel-3* (Millipore, Billerica, MA). O processo de “washing out” foi repetido 3 vezes para cada amostra, utilizando água deionizada como solvente. A concentração de proteínas foi determinada utilizando *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Para testar esse método de limpeza, alíquotas correspondentes a 20 µg foram ressuspensas em tampão de amostra SDS, aquecidas a 100°C, e aplicadas no SDS-PAGE 12%. A corrida foi realizada a 120 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. O gel foi corado com *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue G* 0,2%, metanol 40% e ácido acético 10%) *overnight*, e descorado com solução contendo metanol 40% e ácido acético 10% (Figura 12A).

Posteriormente, o gel foi corado com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) (Figura 12B).

Figura 12 – SDS-PAGE 12% de 20 µg do extrato E de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, após filtração centrífuga com *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit* (membrana de 3KDa). As proteínas foram coradas com *Coomassie Blue* (A) e prata (B).

Para a SDS-PAGE, os extratos foram submetidos aos tratamentos de limpeza testados nos estudos piloto e descritos acima. Após determinar a concentração de proteínas utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), volumes correspondentes a 20 µg dos extratos PBS, G1G2 e E do grupo 129P3/J controle foram concentrados no *speed vac*. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris base 12 mM pH 6,8 ajustado com HCl, glicerol 5%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,2%, DTT 20 mM e EDTA 0,5 mM), aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas em triplicata no SDS-PAGE 12%. A corrida foi realizada a 120 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. As proteínas nos géis foram coradas com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

4.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida catiônico

Para avaliar a separação das proteínas de acordo com a carga positiva e o peso molecular foram realizados géis catiônicos, no qual a polaridade encontra-se invertida (migração em direção ao ânodo). O preparo dos extratos para o gel catiônico seguiu o protocolo definido para SDS-

PAGE. Inicialmente, volumes correspondentes a 10 μg para os extratos PBS e E, e 20 μg para o extrato G1G2 foram aplicados em gel de poliacrilamida catiônico. A corrida foi realizada a 120 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. As proteínas no gel foram coradas com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Após corar com prata, apenas poucas bandas do extrato PBS foram visualizadas no gel. O extrato G1G2 e E não apresentaram nenhuma banda (Figura 13).

Figura 13 – Gel de poliacrilamida catiônico dos extratos PBS, G1G2 e E da linhagem de camundongos 129P3/J grupo controle. Alíquotas correspondentes a 10 μg do extrato PBS, 20 μg do extrato G1G2 e 10 μg do extrato E foram aplicadas nos poços 1, 2 e 3, respectivamente. As proteínas foram coradas com prata.

Repetiu-se o experimento anterior, aumentando as concentrações de proteína para 20 μg para os extratos PBS e E, e 30 μg para o extrato G1G2. Os géis foram corados com Coomassie *Blue* (Coomassie *Brilliant Blue G* 0,2%, metanol 40% e ácido acético 10%) *overnight*, e descorado com solução contendo metanol 40% e ácido acético 10% (Figura 14A). Posteriormente, o gel foi corado com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Figura 14B).

Figura 14 - Gel de poliacrilamida catiônico dos extratos PBS, G1G2 e E da linhagem de camundongos 129P3/J grupo controle. Aliquotas correspondentes a 20 µg do extrato PBS, 50 µg do extrato G1G2 e 20 µg do extrato E foram aplicadas nos poços 1, 2 e 3, respectivamente. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue (A) e prata (B).

Novamente foram observadas poucas bandas apenas para o extrato PBS. Como as concentrações de proteína empregadas nos testes piloto não foram suficientes para visualizar bandas no gel, optou-se por aumentar a concentração dos extratos PBS, G1G2 e E para 50 µg.

Para a eletroforese em gel catiônico, os extratos foram submetidos aos mesmos tratamentos de limpeza descritos acima para SDS-PAGE e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Volumes correspondentes a 50 µg dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo 129P3/J foram concentrados no *speed vac*. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (sacarose 1,7M, corante verde de metil 0,19 M e EDTA 0,5 mM), e aplicadas em triplicata em gel de poliacrilamida catiônico (pH 2,74) imerso em uma cuba contendo diferentes tampões de corrida para câmara superior (glicina 0,37 M, pH 4, ajustado com ácido acético glacial) e câmara inferior (ácido acético glacial 4%, pH 4,3 ajustado com KOH 45%). A corrida foi realizada a 120 V com polaridade reversa (migração em direção ao ânodo), até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. As proteínas nos géis foram coradas com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

4.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida aniônico

Para avaliar a separação das proteínas de acordo com a carga negativa e o peso molecular foram realizados géis aniônicos, conforme descrito por Ornstein (1964) e Davis (1964). Para a eletroforese em gel aniônico, os extratos foram submetidos aos mesmos tratamentos de limpeza descritos acima para SDS-PAGE e a concentração de proteínas foi determinada utilizando *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Volumes correspondentes a 20 e 50 µg dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo 129P3/J foram concentrados no *speed vac*. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra contendo uma 1 parte da solução B (5,98 g de Tris e 480 µL de Temed para 100 mL, pH 6,7 ajustado com HCl), 3 partes de água deionizada, 4 partes da solução F (sacarose 1,7 M) e 2 partes de azul de bromofenol (0,005% w/v), e aplicadas em triplicata no gel aniônico. Os géis foram colocados em uma cuba contendo tampão de corrida a base de tris-glicina, pH 8,3 (Tris 25 mM e glicina 0,2 M). A corrida foi realizada a 120 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel. As proteínas nos géis foram coradas com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* ((Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

4.10 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.10.1 Preparo das amostras para espectrometria de massas – LC-ESI-MS/MS

Para a análise proteômica, após extração das proteínas de fêmur, os extratos PBS e E foram submetidos aos mesmos métodos de limpeza definidos para SDS-PAGE. Entretanto, para remover o excesso de guanidina HCl das amostras, foi utilizado o PD Mini Trap G-10 (GE Healthcare, EUA), que se baseia na cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) separando as substâncias com base no seu tamanho. Consiste em uma coluna contendo *Sephadex G-10* que permite separar substâncias de alto peso molecular das de baixo peso molecular. Para determinar o perfil de eluição da amostra, foi realizado um experimento no qual foram adicionadas alíquotas de 100 µL do tampão de equilíbrio (água Milli Q) na coluna e 25 frações foram coletadas separadamente em tubos (F1-F25). Para cada fração a quantidade de proteína foi determinada por BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) (Figura 15) e a quantidade de

guanidina HCl foi mensurada visualmente utilizando uma escala com as seguintes concentrações: guanidina HCl 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 M (Figura 16).

Figura 15 – Concentração de proteína (µg/mL) para cada fração eluída no PD Mini Trap G-10 determinada pelo método BCA.

Figura 16 – Quantificação da concentração de guanidina HCl utilizando uma escala com diferentes concentrações de guanidina HCl (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 M) para cada fração eluída no PD Mini Trap G-10.

Baseado neste experimento, verificou-se que a maior quantidade de proteína da amostra foi eluída nas frações F8-F12 (0,8-1,2 mL). A partir da fração 13 (F13) começou um declínio na concentração de proteína como pode ser observado na figura 15, acompanhado de um aumento na concentração de guanidina HCl (Figura 16). Portanto, estabeleceu-se um volume de 0,5 mL de tampão de equilíbrio como ideal para eluição da amostra.

Após equilibrar cada coluna PD Mini Trap G-10 três vezes com tampão de equilíbrio (água MilliQ), um volume correspondente a 0,3 mL de amostra foi aplicado na coluna. Foram adicionados 0,4 mL do tampão de equilíbrio para completar o volume total da coluna e em seguida, as amostras foram eluídas com 0,5 mL de água MilliQ. As frações foram coletadas e a concentração de proteínas foi determinada utilizando *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

Para análise proteômica em fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, volumes correspondentes a 20 µg do extrato PBS, 50 µg do extrato G1G2 e 50 µg do extrato E foram individualmente concentrados no *speed vac*. Para análise proteômica quantitativa, volumes correspondentes a 100 µg para cada extrato, totalizando 300 µg de proteína (PBS, G1+G2, EDTA), foram reunidos em um único tubo para cada grupo e concentrados no *speed vac*. Para cada amostra, foram adicionados 100 µL do tampão contendo uréia 4M, DTT 10 mM e NH_4HCO_3 50 mM, pH 7,8. Incubou-se 1 hora em temperatura ambiente e adicionaram-se 300 µL do tampão NH_4HCO_3 50 mM pH 7,8 (diluição 1:3, reduzindo a concentração de uréia para 1 M). Em seguida, foi adicionada tripsina 5% w/w (Promega, EUA) e as amostras foram incubadas *overnight* (18 horas) a 37°C. O pH inicial e final foi medido com fita indicadora de pH. As amostras foram concentradas em um *speed vac*. Os peptídicos tripticos foram desalinizados utilizando a ponteira PerfectPure C-18 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e submetidos para análise no LC-ESI-MS/MS.

4.10.2 Espectrometria de massas – LC-ESI-MS/MS

Para o estudo de caracterização de proteínas de fêmur da linhagem 129P3/J, foi utilizado o sistema Nanoflow HPLC/MS/MS que consiste em um *Proxeon EasyNano-LC®* (ThermoFisher, USA) acoplado a um equipamento híbrido quadrupolo – tempo de voo (*QStar Elite QqTOF*, AB Sciex, USA). O sistema nano-LC possui uma coluna de fase reversa C18 *Trap Zorbax 300SB*

beads (Agilent, USA), com 5 mm de comprimento x 0,3 mm de diâmetro interno e uma coluna analítica fluxo nano (150 mm de comprimento x 0,075 mm de diâmetro interno com abertura de 0,015 mm), empacotada com os mesmos grãos (*beads*) C18 da coluna de fase reversa *Trap*. Os peptídeos foram eluídos da coluna utilizando gradiente linear do solvente B em A de 6% a 65% por 30 min, seguido por 3 min de lavagem com solvente B 95 % (solvente A: acetonitrila 2% com ácido fórmico 0,1%; solvente B: acetonitrila 98% com ácido fórmico 0,1%), com fluxo de 300 nL/min.

O *QStar Elite MS* é equipado com fonte de ionização nanospray (AB Sciex, USA). A voltagem do íon spray e a temperatura foram fixadas em 2000 V a 150°C. Cada ciclo consistiu em uma varredura com 400 a 1200 m/z seguidos de 3 íons *scan* produtos para os três picos MS mais intensos. A faixa da massa MS/MS foi de 100-1500 m/z. As análises foram realizadas em triplicata para cada grupo.

Para as proteínas de fêmur de camundongo das linhagens A/J e 129P3/J foi realizada a análise proteômica semi-quantitativa de diferença de expressão protéica sem marcadores (label-free semi-quantitative differential expression analysis), utilizando LTQ-VELOS-Ion Trap (ThermoFisher, USA). A separação dos peptídeos foi feita seguindo os mesmo padrões para cromatografia descritos acima, empregando o mesmo sistema nanoHPLC PROXEON. As análises em triplicata dos dados foram feitas com PROTEOME DISCOVERER 1.2 e SIEVE *software* 1.3 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). O *workflow* do SIEVE *software* é constituído por três etapas: alinhamento, *framing* e identificação. A figura 17 apresenta o alinhamento cromatográfico utilizando o algoritmo *ChromAlign*.

Figura 17 – Alinhamento cromatográfico das amostras 129P3/J e A/J grupo controle realizado no SIEVE *software* 1.3, utilizando o algoritmo *ChromAlign*.

Para análise proteômica em fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, a busca dos dados MS/MS foi feita contra a base de dados de proteínas de camundongos (*Mus musculus*) do *Swissprot* (Versão Outubro/2010) utilizando *Proteinpilot* versão 4.0 (ABSciex) para identificação da proteína. Para a análise proteômica quantitativa comparando as linhagens A/J e 129P3/J, a busca dos dados MS/MS foi feita contra a base de dados de proteínas de camundongos (*Mus musculus*) do NCBI (Versão Dezembro/2010) utilizando para identificação de proteínas SEQUEST algorítmico calculados através de PROTEOME DISCOVERER 1.2. Os parâmetros de busca empregados foram: tripsina como enzima de digestão; oxidação de metionina e carbamidometilação pela iodoacetamida; e cargas dos peptídeos de +2 e +3. Para considerar uma identificação como válida exigiu-se a identificação de 2 ou mais peptídeos. A taxa de falso positivo foi estabelecida em 0,01. A figura 18 apresenta o *Workflow* resumindo os passos e as ferramentas empregadas para análise proteômica quantitativa livre de marcadores em fêmures de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com F.

Figura 18 – *Workflow* da análise proteômica semi-quantitativa livre de marcadores utilizada no presente estudo para avaliar diferenças na abundância de proteínas ósseas de fêmures de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com F.

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR *WESTERN BLOTTING*

Por ser a principal proteína presente na matriz óssea, selecionou-se o colágeno tipo I para análise por *Western Blotting*. As proteínas foram extraídas de fêmures de camundongos utilizando o método descrito acima para análise proteômica quantitativa (4.10.1). Foram utilizados 4 animais/grupo, mas diferente da análise proteômica, não foi feito o *pool* dos animais. Para cada grupo, foram realizados 4 experimentos com animais diferentes. Amostras correspondentes a 40 µg de proteína foram submetidas à eletroforese unidimensional SDS-PAGE 12%, conforme descrito acima (4.9.1), seguida de transferência para membrana de PVDF. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite 10% por 1 h em temperatura ambiente e em seguida incubadas *overnight* com anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo I (1:5000) (Millipore) e anti-β-tubulina (1:200) (Santa Cruz) em BSA 3% e TBS-Tween (TBS-T) 0,1%. Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com anticorpos anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (GE Healthcare) e após lavagens com TBS-T, as membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa Image J. Foi atribuído para o grupo A/J controle um valor arbitrário = 1, sendo que os valores para os demais grupos foram calculados considerando o A/J como referência.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os *softwares* Graph Pad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), Graph Pad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) e Statistica versão 7.0 para Windows (Stat Soft Inc., Tulsa, USA). Todos os dados passaram no teste de normalidade (teste de Kolmogorov & Smirnov) e nos casos em que não houve homogeneidade (teste de Bartlett), os mesmos foram transformados (logaritmo ou quadrado) antes da análise. Os dados da concentração de F no fêmur e no plasma, atividade da fosfatase alcalina no plasma, análise com micro-CT da tíbia, vértebra e fêmur, análise da taxa de aposição minearal no fêmur e *Western Blotting* foram analisados por ANOVA a dois critérios (linhagem e tratamento) e pelo teste Bonferroni para comparações individuais. Quando os dados não passaram pelo critério de homocedasticidade, mesmo após transformação, foram realizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney

entre as linhagens para cada tratamento e de Kruskal-Wallis entre os tratamentos para cada linhagem. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM DE F NO PLASMA E NO FÊMUR

A tabela 2 mostra a concentração de F presente no plasma e no fêmur dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J após 8 semanas de tratamento com F. Com relação ao F no plasma ($\mu\text{g/L}$), 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 2, 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 50 ppm F na água. Embora tenha sido observado um efeito dose-resposta na concentração de F presente no plasma em função dos tratamentos, apenas o grupo que recebeu 50 ppm F na água teve valores de F no plasma significativamente maiores em relação aos demais.

Tabela 2 – Concentração de F no plasma ($\mu\text{g/L}$) e no fêmur (mg/Kg) de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J em função do tratamento com F (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas

	TRATAMENTO		
	Controle	10 ppm F	50 ppm 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}

*Média $\pm$ EP. n = 3-6/grupo. 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, $p<0,05$).

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 ($F= 4,384$, $p= 0,021$). Comparando-se as linhagens, as concentrações de F 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 50 ppm F na água. Comparando-se os tratamentos, para a linhagem A/J, embora tenha sido observado um efeito dose-resposta na concentração de F presente no fêmur em função dos tratamentos, apenas o grupo que recebeu 50 ppm F na água teve valores de F no fêmur 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 2).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP) NO PLASMA

Foi encontrado um aumento significativo na atividade de fosfatase alcalina no plasma dos animais da linhagem 129P3/J quando comparados aos da linhagem A/J ($F = 6,59$, $p=0,014$), mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F=0,235$, $p=0,791$) e nem interação ($F=0,264$, $p=0,769$) (Figura 19).

Figura 19 – Quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) no plasma de camundongos da linhagem A/J e 129P3/J em função do tratamento com F (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 8$ /grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p<0,05$).

5.3 ANÁLISE DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

Com relação à BMD da tíbia, a ANOVA a dois critérios após transformação logarítmica dos dados revelou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F=37,95$, $p<0,0001$), mas não entre os tratamentos ($F=1,538$, $p=0,227$), embora para a linhagem 129P3/J tenha havido um ligeiro aumento na BMD nos tratamentos com 10 e 50 ppm F em relação ao controle, e para a linhagem A/J no tratamento com 50 ppm F em relação ao controle. Não houve interação significativa entre estes critérios ($F=0,969$, $p=0,388$). Conforme se observa na figura 20, os valores para BMD dos animais da linhagem 129P3/J foram maiores que aqueles encontrados para os animais da linhagem A/J, e esta diferença foi significativa para todos os tratamentos, embora mais acentuada para o tratamento com 10 ppm F ($p<0,01$, $p<0,001$ e $p<0,05$ para os tratamentos controle, 10 ppm F e 50 ppm F, respectivamente). Entretanto, para a BMD da vértebra, a ANOVA a dois critérios após transformação logarítmica dos dados não encontrou diferença significativa nem entre as linhagens ($F=3,314$, $p=0,076$), nem entre os tratamentos ($F=0,465$, $p=0,631$). A interação entre os critérios também não foi significativa ($F=1,251$, $p=0,297$) (Figura 21).

Para a razão entre o volume ósseo trabecular e o volume total da amostra (BV/TV) e a razão entre a superfície óssea trabecular e o volume total da amostra (BS/TV) da tíbia, a ANOVA a dois critérios após transformação logarítmica dos dados revelou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F=11,12$, $p=0,0018$ e $F=18,50$, $p<0,0001$, respectivamente), mas não entre os tratamentos ($F=0,077$, $p=0,9264$ e $F=0,5181$, $p=0,6680$, respectivamente). A interação entre os critérios não foi significativa ($F=0,7353$, $p=0,4854$ e $F=0,5570$, $p=0,5934$, respectivamente). A tendência observada foi a mesma vista para a BMD. No entanto, apesar dos valores BV/TV e BS/TV terem sido maiores nos animais da linhagem 129P3/J quando comparados aos da linhagem A/J, a diferença foi significativa apenas para o grupo tratado com 10 ppm F ($p<0,01$) (Figura 20).

Para a razão entre a superfície óssea trabecular e o volume ósseo trabecular (BS/BV), o fator padrão de osso trabecular (Tb.Pf), e a espessura trabecular (Tb.Th) da tíbia, a ANOVA a dois critérios não encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=1,067$, $p=0,307$; $F=2,859$, $p=0,098$; e $F=0,014$, $p=0,905$, respectivamente) e nem entre os tratamentos ($F=0,635$, $p=0,535$; $F=1,728$, $p=0,190$; e $F=1,191$, $p=0,314$, respectivamente). A interação entre os critérios também não foi significativa ($F=0,562$, $p=0,575$; $F=1,663$, $p=0,202$; e $F=1,675$, $p=0,199$, respectivamente) (Figura 20).

Para a separação trabecular (Tb.Sp) da tíbia e vértebra, a ANOVA a dois critérios não encontrou diferença significativa entre os tratamentos ($F=0,387$, $p=0,681$ e $F=0,527$, $p=0,594$, respectivamente) e a interação entre os critérios também não foi significativa ($F=0,011$, $p=0,989$ e $F=0,475$, $p=0,625$, respectivamente). Entretanto, foi encontrada uma diferença significativa entre as linhagens ($F=34,64$, $p<0,0001$ e $F=22,12$, $p<0,0001$, respectivamente). A linhagem A/J apresentou valores de Tb.Sp maiores do que a linhagem 129P3/J, e essa diferença foi significativa para todos os grupos na tíbia ($p<0,01$ para os tratamentos controle, 10 ppm F e 50 ppm F) e apenas para o grupo controle e 10 ppm F na vértebra ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente) (Figura 20 e 21).

Para o fator padrão de osso trabecular (Tb.Pf) da vértebra, a ANOVA a dois critérios, após transformação dos dados ($Y=Y^2$), não revelou diferença significativa entre os tratamentos ($F=2,071$, $p=0,139$) e não mostrou interação significativa entre os critérios ($F=1,468$, $p=0,242$), mas encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=40,19$, $p<0,0001$). A linhagem A/J apresentou valores de Tb.Pf maiores do que a linhagem 129P3/J mas essa diferença foi significativa apenas para os grupos tratados com 10 ppm F e 50 ppm F ($p<0,001$) (Figura 21).

Para o número e densidade trabecular (Tb.N) da tíbia e Tb.N, BV/TV, BS/BV e Tb.Th da vértebra, como os dados não passaram pelo critério de homocedasticidade, mesmo após transformação, foram realizados o teste de Mann-Whitney entre as linhagens para cada tratamento e o teste de Kruskal-Wallis entre os tratamentos para cada linhagem. Para todos os parâmetros não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,821$; $p=0,949$; $p=0,983$; $p=0,970$ e $p=0,935$, respectivamente). Como pode ser observado na figura 20 e 21, os valores de Tb.N da tíbia e Tb.N, BV/TV e Tb.Th da vértebra foram maiores na linhagem 129P3/J em comparação com a linhagem A/J em todos os tratamentos, enquanto que os valores de BS/BV foram maiores na linhagem A/J em comparação com a 129P3/J para todos os tratamentos. Entretanto, essa diferença foi significativa apenas nos grupos controle para os parâmetros Tb.N da tíbia ($p=0,0006$) e Tb.N e BV/TV da vértebra (ambos com $p=0,0019$), tratado com 10 ppm F para Tb.N da tíbia ($p=0,01$) e Tb.N, BV/TV, BS/BV e Tb.Th da vértebra ($p=0,0011$, $p=0,0002$, $p=0,0148$ e $p=0,0047$, respectivamente), e tratado com 50 ppm F para Tb.N, BV/TV, BS/BV e Tb.Th da vértebra ($p=0,0006$, $p=0,0006$, $p=0,0019$ e $p=0,0019$, respectivamente) (Figura 20 e 21).

Para a razão entre a superfície óssea trabecular e o volume total da amostra (BS/TV) da vértebra, a ANOVA a dois critérios após transformação logarítmica dos dados mostrou diferença significativa apenas entre as linhagens ($F=59,33$, $p<0,0001$), sendo que os valores

da linhagem 129P3/J foram significativamente maiores quando comparados com a linhagem A/J para todos os grupos controle, 10 ppm F e 50 ppm F ($p < 0,001$) (Figura 21). Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($F=0,152$, $p=0,860$), e a interação entre os critérios também não foi significativa ($F=0,041$, $p=0,960$) (Figura 21).

Com relação à BMD do fêmur, a ANOVA a dois critérios revelou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F=6,555$, $p=0,0141$), mas não entre os tratamentos ($F=2,298$, $p=0,113$). Não houve interação significativa entre estes critérios ($F=1,333$, $p=0,275$). Como demonstrado na figura 22, os valores para BMD do fêmur dos animais da linhagem 129P3/J ($1,307 \pm 0,043$, $1,315 \pm 0,046$, e $1,312 \pm 0,028$ g/cm³ para os grupos controle, 10 e 50 ppm F, respectivamente) foram maiores que aqueles encontrados para os animais da linhagem A/J ($1,248 \pm 0,056$, $1,303 \pm 0,051$ e $1,287 \pm 0,024$ g/cm³ para os grupos controle, 10 e 50 ppm F, respectivamente), e esta diferença foi significativa apenas para o controle ($p < 0,05$).

Para os parâmetros B.Ar (área média de tecido ósseo nas seções transversais da amostra), B.Pm (perímetro médio de tecido ósseo nas seções transversais da amostra), T.Pm (perímetro médio de tecido total nas seções transversais da amostra) de fêmur, a ANOVA a dois critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=40,11$, $p < 0,0001$; $F=60,59$, $p < 0,0001$ e $F=63,69$, $p < 0,0001$, respectivamente), mas não entre os tratamentos ($F=2,058$, $p=0,140$; $F=1,812$, $p=0,176$ e $F=2,311$, $p=0,112$, respectivamente). Não houve interação significativa entre estes critérios ($F=3,856$, $p=0,029$; $F=0,307$, $p=0,737$ e $F=1,448$, $p=0,247$, respectivamente). Os valores B.Ar, B.Pm, T.Pm de fêmur dos animais da linhagem 129P3/J foram maiores que aqueles encontrados para os animais da linhagem A/J. Para o B.Ar essa diferença foi significativa apenas nos grupos tratados com 10 e 50 ppm F ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente), enquanto que foi significativa em todos os grupos para B.Pm ($p < 0,01$ para o controle, $p < 0,001$ para os tratamentos 10 e 50 ppm F) e para T.Pm ($p < 0,001$ para os tratamentos controle, 10 e 50 ppm F) (Figura 22).

Para a média do momento polar de inércia (MMI) e área média de tecido total nas seções transversais da amostra (T.Ar), a ANOVA a dois critérios após transformação logarítmica dos dados revelou diferença significativa apenas entre as linhagens ($F=63,72$, $p < 0,0001$ e $F=79,43$, $p < 0,0001$, respectivamente), sendo que a linhagem 129P3/J apresentou valores significativamente maiores comparada com a A/J em todos os grupos para os parâmetros de MMI ($p < 0,01$ para o controle e $p < 0,001$ para os tratamentos 10 e 50 ppm F) e T.Ar ($p < 0,001$ para os tratamentos controle, 10 e 50 ppm F) (Figura 22). Para ambos os parâmetros, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($F=2,240$,

$p=0,119$ e $F=2,535$, $p=0,091$, respectivamente), e a interação entre os critérios também não foi significativa ($F=2,370$, $p=0,106$ e $F=1,447$, $p=0,247$, respectivamente) (Figura 22).

Figura 20 – Média dos valores de BMD e de parâmetros histomorfométricos da região trabecular de tíbia nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8/grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento (p<0,05).

Figura 21 – Média dos valores de BMD e de parâmetros histomorfométricos da região trabecular da quarta vértebra lombar (L4) nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 8/\text{grupo}$. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p < 0,05$).

Figura 22 – Média da BMD e de parâmetros histomorfométricos da região cortical de fêmur nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8/grupo. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento (p<0,05).

5.4 TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR)

Com relação à taxa de aposição mineral (MAR) do fêmur, a ANOVA a dois critérios revelou que houve diferença significativa entre as linhagens ($F=8,426$, $p=0,006$) e entre os tratamentos ($F=7,092$, $p=0,003$), mas não houve interação significativa entre estes critérios ($F=0,884$, $p=0,422$). Como demonstrado na figura 23, os valores para MAR do fêmur dos animais da linhagem 129P3/J ($0,617 \pm 0,061$, $0,626 \pm 0,055$, e $0,792 \pm 0,076$ $\mu\text{m}/\text{dia}$ para os grupos controle, 10 e 50 ppm F, respectivamente) foram maiores que aqueles encontrados para os animais da linhagem A/J ($0,540 \pm 0,133$, $0,575 \pm 0,120$, e $0,641 \pm 0,142$ $\mu\text{m}/\text{dia}$ para os grupos controle, 10 e 50 ppm F, respectivamente), para todos os tratamentos, mas esta diferença foi significativa apenas para grupo tratado com 50 ppm F ($p<0,05$). Entre os tratamentos, foi observada diferença significativa apenas na linhagem 129P3/J, quando se comparou o grupo tratado com 50 ppm F com o controle e 10 ppm F ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 23). As figuras 24 -29 apresentam imagens da análise de MAR de fêmur nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J controle e tratados com 10 e 50 ppm F.

Figura 23 – Média da taxa de aposição mineral de fêmur nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 8/\text{grupo}$. As barras indicam o desvio-padrão. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento, e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada linhagem ($p<0,05$).

Figura 24 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J controle. RC = Região cortical e RM = Região medular.

Figura 25 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J tratados com 10 ppm F. RC = Região cortical e RM = Região medular.

Figura 26 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J tratados com 50 ppm F. RC = Região cortical e RM = Região medular.

Figura 27 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J controle. RC = Região cortical e RM = Região medular.

Figura 28 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J tratados com 10 ppm F. RC = Região cortical e RM = Região medular.

Figura 29 – Imagem representativa da taxa de aposição mineral de fêmur de camundongo da linhagem A/J tratados com 50 ppm F. RC = Região cortical e RM = Região medular.

5.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

5.5.1 Caracterização das proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J

Foram realizados géis de poliacrilamida SDS 12% em triplicata dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur da linhagem 129P3/J. Os géis foram corados com prata utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) (Figura 30). Foram visualizadas bandas com peso molecular variando de 250 a 10 kDa, para todos os extratos. O extrato PBS apresentou o número maior de bandas quando comparado com os extratos G1G2 e E.

Figura 30 – SDS-PAGE 12% representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Alíquotas correspondentes a 20 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com prata.

Para a separação proteica de acordo com as cargas positivas e peso molecular foram realizados géis catiônicos em triplicata, aplicando para cada gel 50 µg dos extratos PBS e G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Na figura 31 pode-se observar a imagem do gel catiônico corado com prata, utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A eletroforese em gel de poliacrilamida catiônico não apresentou uma separação satisfatória para todos os extratos.

Figura 31 – Gel catiônico representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Aliquotas correspondentes a 50 µg dos extratos PBS e E foram aplicadas no gel A e 50 µg do extrato G1G2 no gel B, e submetidas à eletroforese com polaridade reversa. Histatina 1, 3 e 5 (2 µg) foram utilizadas como padrão. As proteínas foram coradas com prata.

Figura 32 – Gel aniônico representativo de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Aliquotas correspondentes a 20 µg e 50 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas nos géis aniônico A e B, respectivamente. As proteínas foram coradas com prata.

Para a separação proteica de acordo com as cargas negativas e peso molecular foram aplicados em triplicata 20 µg e 50 µg dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J no gel aniônico. As proteínas no gel foram coradas com prata, utilizando o *Pierce Silver Stain Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) (Figura 32). Foi observada uma pobre separação eletroforética em gel de poliacrilamida aniônico para os extratos de proteínas de fêmur obtidos com as soluções de PBS, guanidina HCl e EDTA.

Para análise proteômica em fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, os extratos digeridos com tripsina foram individualmente submetidos ao LC-ESI-MS/MS. Foram identificadas 73, 131 e 75 proteínas nos extratos PBS, G1G2 e E, respectivamente (Tabela 3).

A tabela 3 apresenta o resultado da quantificação proteica empregando o método do ácido bicinconínico (BCA). Baseado no resultado dos géis SDS e na quantificação proteica esperava-se um pequeno número de proteínas identificadas para o extrato G1G2, mas ao contrário do esperado, foi o que apresentou o maior número de identificações. Embora o extrato PBS tenha apresentado a concentração de proteína mais alta e o maior número de bandas no gel SDS, foi identificado apenas um número razoável de proteínas para esse extrato.

Tabela 3 – Concentração de proteína (µg/mL) pelo método BCA e número proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS para cada extrato proteico obtidos de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J

Extrato	Concentração de proteína (µg/mL)	Número de proteínas identificadas
PBS	657,81	73
G1G2	63,24	131
E	150,57	75

Na figura 33 pode-se observar a sobreposição das proteínas de fêmur identificadas nos três extratos obtidos neste estudo. No total, considerando todos os extratos, foram identificadas 208 proteínas, sendo que apenas 12 (4,1%) estavam presentes em todos os extratos, enquanto que 42 (14,2%), 74 (25,0%) e 33 (11,1%) proteínas únicas foram identificadas exclusivamente nos extratos PBS, G1G2 e E, respectivamente (Figura 33). Os extratos PBS e G1G2, PBS e E, G1G2 e E apresentaram 19 (6,4%), 2 (0,7%), 26 (8,8%) proteínas em comum, respectivamente. Entre as proteínas presentes em todos os extratos

estavam diversos tipos de histonas e a *serum albumin*. Além da *serum albumin*, outra proteína derivada do soro com habilidade para se ligar aos cristais de hidroxiapatita em tecidos mineralizados foi identificada nos extratos G1G2 e EDTA, a *alpha-2-HS-glycoprotein*. (MBUYI et al. 1982; OWEN; TRIFFITT 1976; SCHINKE et al. 1996; TRIFFITT 1976). Proteínas específicas do tecido ósseo também foram identificadas sendo que a maioria foi encontrada nos extratos G1G2 e/ou E.

Figura 33 – Diagrama de Venn representando a sobreposição dos extratos PBS, G1G2 e E de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J.

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam as proteínas identificadas, o número de peptídeos pareados e a porcentagem de cobertura da sequência para cada proteína nos extratos PBS, G1G2 e EDTA, respectivamente. A classificação das proteínas de fêmur identificadas por LC-ESI-MS/MS de acordo com processo biológico, função molecular e localização celular foi realizada empregando o Uniprot (<http://www.informatics.jax.org/>), programa de bioinformática Web-based Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/index.html>), e MGI Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>) (Figura 34).

A grande maioria das proteínas identificadas estava localizada no compartimento intracelular (53%), seguido da localização extracelular (25%) (Figura 34A). Além dos diversos tipos de colágeno, foram identificadas várias proteínas não colagênicas presentes na matriz óssea, como proteoglicanas (*decorin*, *biglycan* e *aggrecan core protein*), *bone sialoprotein 2*, *tartrate-resistant acid phosphatase type 5*, *osteonectin* (SPARC), *osteopontin*,

mimcan (osteoglycin), dentin matrix acidic phosphoprotein 1, asporin, fibromodulin, fibronectin, matrix gla protein, vitamin K-dependent protein, insulin-like growth factor binding protein 5, collagenase 3 e cathepsin G. Em adição, foram identificadas proteínas de membrana (13%), fração celular (6%) e superfície celular (3%) (Figura 34A). Em relação aos processos biológicos, as proteínas identificadas estão envolvidas com organização dos componentes celulares e biogênese (18%), processos celulares (16%), regulação de processos biológicos (14%), metabolismo (13%), resposta a estímulos (10%), processos em organismos multicelulares (9%), desenvolvimento (8%), transporte (6%) e localização (Figura 34B). A classificação de acordo com a função molecular revelou proteínas com atividade de ligação (55%), catalítica (18%), estrutural (10%), transporte (6%), regulação de atividade enzimática (5%), transdução de sinal (2%), transcrição (2%), tradução (1%) e antioxidante (1%) (Figura 34C).

Tabela 4 – Lista de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão PBS (extrato PBS) identificadas por LC-ESI-MS/MS

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	22	51,02
P01942	Hemoglobin subunit alpha	15	84,51
O35744	Chitinase-3-like protein 3	14	31,91
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	9	45,58
P63260	Actin, cytoplasmic 2	6	20,53
P60710	Actin, cytoplasmic 1	6	20,53
P08071	Lactotransferrin	6	6,93
P32848	Parvalbumin alpha	5	49,09
P68134	Actin, alpha skeletal muscle	4	12,73
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1	4	12,73
P63268	Actin, gamma-enteric smooth muscle	4	12,77
P62737	Actin, aortic smooth muscle	4	12,73
P62204	Calmodulin	4	22,15
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	25,32
Q921I1	Serotransferrin	3	3,30
O88569	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	3	6,23
P30681	High mobility group protein B2	3	7,14
P07724	Serum albumin	2	3,78
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	2	4,33
P10107	Annexin A1	2	8,38
P29391	Ferritin light chain 1	2	8,74
P49945	Ferritin light chain 2	2	8,74
P00920	Carbonic anhydrase 2	2	11,54

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
P09528	Ferritin heavy chain	2	7,14
P04117	Fatty acid-binding protein, adipocyte	2	10,61
P05977	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	2	12,23
P62897	Cytochrome c, somatic	2	18,10
Q61207	Sulfated glycoprotein 1	2	3,77
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	2	21,09
P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	2	17,31
P0CG50	Polyubiquitin-C	2	33,11
P0CG49	Polyubiquitin-B	2	35,41
O89053	Coronin-1A	2	5,86
P20152	Vimentin	2	4,94
P27005	Protein S100-A8	2	26,97
Q99L88	Beta-1-syntrophin	1	1,30
P51437	Cathelin-related antimicrobial peptide	1	9,25
Q3V1H3	Hephaestin-like protein 1	1	1,21
P31725	Protein S100-A9	1	12,39
P17182	Alpha-enolase	1	4,15
P21550	Beta-enolase	1	4,15
P17183	Gamma-enolase	1	4,15
P10518	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	1	5,76
Q00623	Apolipoprotein A-I	1	4,92
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	1	4,90
Q61233	Plastin-2	1	1,43
Q99K51	Plastin-3	1	1,43
Q3V0K9	Plastin-1	1	1,43
P48678	Prelamin-A/C	1	1,50
P70696	Histone H2B type 1-A	1	7,09
Q64525	Histone H2B type 2-B	1	7,14
Q64475	Histone H2B type 1-B	1	7,14
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	1	7,14
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	1	7,14
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	1	7,14
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	1	7,14
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	1	7,14
Q64524	Histone H2B type 2-E	1	7,14
Q64478	Histone H2B type 1-H	1	7,14
P10854	Histone H2B type 1-M	1	7,14
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	1	7,14
P11247	Myeloperoxidase	1	1,67
Q61245	Collagen alpha-1(XI) chain	1	0,67
P99029	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	1	3,81
P58774	Tropomyosin beta chain	1	3,52
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	1	3,52
P21107	Tropomyosin alpha-3 chain	1	3,52

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
O08997	Copper transport protein AT	1	20,59
Q9WVA4	Transgelin-2	1	6,03
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	1	2,05
P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	1	5,92
P46662	Merlin	1	1,17
P26043	Radixin	1	1,20
P26040	Ezrin	1	1,20
P26041	Moesin	1	1,21

Tabela 5 – Lista de proteína de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão 4 M Guanidina HCl (extrato G1G2) identificadas por LC-ESI-MS/MS

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
P13542	Myosin-8	50	22,56
P62806	Histone H4	39	65,05
P22752	Histone H2A type 1	38	76,15
Q8BFU2	Histone H2A type 3	38	76,15
Q5SX39	Myosin-4	37	25,32
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	34	74,62
Q64523	Histone H2A type 2-C	33	68,22
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	31	74,60
Q64478	Histone H2B type 1-H	31	74,60
P10854	Histone H2B type 1-M	31	74,60
Q64525	Histone H2B type 2-B	31	74,60
P27661	Histone H2A.x	30	65,03
Q64475	Histone H2B type 1-B	30	74,60
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	30	74,60
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	30	74,60
Q5SX40	Myosin-1	30	21,01
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	28	74,60
Q64524	Histone H2B type 2-E	25	47,62
Q91Z83	Myosin-7	19	8,06
P43276	Histone H1.5	17	35,43
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	13	57,69
Q8R1M2	Histone H2A.J	13	58,14
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	13	57,69
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	13	58,59
P84228	Histone H3.2	12	67,65
P68134	Actin, alpha skeletal muscle	11	40,32
P68433	Histone H3.1	11	48,53
Q9QZQ8	Core histone macro-H2A.1	11	15,59
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1	10	34,48

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
P62737	Actin, aortic smooth muscle	10	34,48
P60710	Actin, cytoplasmic 1	10	34,67
P63260	Actin, cytoplasmic 2	10	34,67
P63268	Actin, gamma-enteric smooth muscle	10	34,57
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	9	10,46
P28481	Collagen alpha-1(II) chain	9	9,75
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	7	61,22
Q3THW5	Histone H2A.V	7	51,56
P0C0S6	Histone H2A.Z	7	51,56
P05977	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	7	54,26
Q3U962	Collagen alpha-2(V) chain	7	9,15
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	6	37,41
Q9JK53	Prolargin	6	24,34
P31725	Protein S100-A9	6	38,94
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	6	25,35
Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain	6	7,12
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	6	20,63
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	6	20,63
P01942	Hemoglobin subunit alpha	5	44,37
P43275	Histone H1.1	5	26,29
P58774	Tropomyosin beta chain	5	23,94
P48678	Lamin-A/C	5	8,57
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	4	17,29
Q62000	Mimecan	4	16,44
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3	8,32
P28653	Biglycan	3	20,33
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	3	1,51
P50608	Fibromodulin	3	14,10
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	3	6,44
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	3	6,49
P49290	Eosinophil peroxidase	3	4,61
Q61879	Myosin-10	3	1,62
P02301	Histone H3.3C	3	8,15
P62082	40S ribosomal protein S7	2	18,04
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	2	1,97
P28654	Decorin	2	8,76
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	10,21
O35701	Matrilin-3	2	6,86
Q8VDD5	Myosin-9	2	2,14
P09602	Non-histone chromosomal protein HMG-17	2	32,22
Q9QZ47	Troponin T, fast skeletal muscle	2	11,03
A2ASS6	Titin	2	0,09
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	2	3,18

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	2	7,77
P43277	Histone H1.3	1	9,05
P43274	Histone H1.4	1	8,68
P15864	Histone H1.2	1	8,96
Q5HZG4	Transcription initiation factor TFIID subunit 3	1	1,18
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform	1	7,22
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	1	6,09
P10107	Annexin A1	1	4,33
P09813	Apolipoprotein A-II	1	14,71
P08226	Apolipoprotein E	1	4,50
Q99MQ4	Asporin	1	4,83
Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1	6,15
Q9DB20	ATP synthase subunit	1	6,57
O35744	Chitinase-3-like protein 3	1	3,77
Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain	1	2,22
P07310	Creatine kinase M-type	1	4,20
O88200	C-type lectin domain family 11 member A	1	4,27
P60843	Eukaryotic initiation factor 4A-I	1	2,46
P10630	Eukaryotic initiation factor 4A-II	1	2,46
P11276	Fibronectin	1	0,69
P10922	Histone H1.0	1	6,19
P11247	Myeloperoxidase	1	1,67
Q3UP87	Neutrophil elastase	1	4,53
P67778	Prohibitin	1	4,41
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	1	2,11
Q64518	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	1	2,02
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	1	3,15
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	1	3,15
P68372	Tubulin beta-2C chain	1	3,15
Q9D6F9	Tubulin beta-4 chain	1	3,15
P99024	Tubulin beta-5 chain	1	3,15
P29788	Vitronectin	1	3,35
P21956	Lactadherin	1	3,02
P07356	Annexin A2	1	4,72
P07214	SPARC	1	4,30
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	1	0,43
P48036	Annexin A5	1	5,02
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	1	7,22
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	1	5,81
P28293	Cathepsin G	1	4,21

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
Q61282	Aggrecan core protein	1	0,47
P07724	Serum albumin	1	2,14
O88990	Alpha-actinin-3	1	1,33
P35441	Thrombospondin-1	1	1,03
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	1	1,86
P84244	Histone H3.3	1	6,62
P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	1	7,69
P47911	60S ribosomal protein L6	1	3,04
P68373	Tubulin alpha-1C chain	1	3,12
P05213	Tubulin alpha-1B chain	1	3,10
P68368	Tubulin alpha-4A chain	1	3,13
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	1	3,12
P33435	Collagenase 3	1	2,12
Q5XKE0	Myosin-binding protein C, fast-type	1	0,97
Q7TPR4	Alpha-actinin-1	1	1,35
P57780	Alpha-actinin-4	1	1,32
O08638	Myosin-11	1	0,91
P58252	Elongation factor 2	1	1,52
Q91Z98	Chitinase-3-like protein 4	1	2,24

Tabela 6 – Lista de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J obtidas pelo método de extração sequencial com tampão 0,5 M EDTA (extrato E) identificadas por LC-ESI-MS/MS

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	26	17,83
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	22	35,94
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	16	15,01
P29788	Vitronectin	12	17,57
P97298	Pigment epithelium-derived factor	10	28,78
P11589	Major urinary protein 2	9	22,78
Q00623	Apolipoprotein A-I	8	28,79
P11588	Major urinary protein 1	8	25,56
P02762	Major urinary protein 6	8	25,56
P04938	Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	8	30,46
P28653	Biglycan	7	20,60
P07214	SPARC	6	22,19
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	5	4,36
Q00896	Alpha-1-antitrypsin 1-3	5	4,37
Q61711	Bone sialoprotein 2	5	3,09
P19221	Prothrombin	5	8,58
P07724	Serum albumin	5	10,69
P08226	Apolipoprotein E	4	13,50

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
Q64739	Collagen alpha-2(XI) chain	4	2,07
P33435	Collagenase 3	4	10,81
P35441	Thrombospondin-1	4	3,67
P10923	Osteopontin	3	8,16
P19788	Matrix Gla protein	3	23,08
P06728	Apolipoprotein A-IV	3	4,81
O55226	Chondroadherin	3	13,97
P28654	Decorin	3	3,95
P12023	Amyloid beta A4 protein	3	2,60
O88947	Coagulation factor X	2	5,82
Q61245	Collagen alpha-1(XI) chain	2	1,39
O55188	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	2	4,57
P09103	Protein disulfide-isomerase	2	4,13
Q08761	Vitamin K-dependent protein S	2	4,15
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	2	0,59
O88200	C-type lectin domain family 11 member A	2	4,27
P28481	Collagen alpha-1(II) chain	1	1,01
Q61647	Hyaluronan synthase 1	1	2,23
P09813	Apolipoprotein A-II	1	9,80
P70375	Coagulation factor VII	1	2,24
P04186	Complement factor B	1	1,58
P22752	Histone H2A type 1	1	6,92
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	1	6,92
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	1	7,03
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	1	6,92
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	1	6,92
Q64522	Histone H2A type 2-B	1	6,92
Q64523	Histone H2A type 2-C	1	6,98
Q8BFU2	Histone H2A type 3	1	6,92
Q8R1M2	Histone H2A.J	1	6,98
Q3THW5	Histone H2A.V	1	7,03
P27661	Histone H2A.x	1	6,29
P0C0S6	Histone H2A.Z	1	7,03
Q07079	Insulin-like growth factor-binding protein 5	1	5,17
P70663	SPARC-like protein 1	1	2,15
P43025	Tetranectin	1	5,94
P62806	Histone H4	1	12,62
Q9QZM9	F-box only protein 16	1	3,59
P49182	Heparin cofactor 2	1	1,46
Q64524	Histone H2B type 2-E	1	11,90
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	1	11,90
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	1	11,90
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	1	11,90

Nº Acesso	Proteína	Nº Peptídeos Identificados	Seq Cov (%)
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	1	11,90
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	1	11,90
Q64525	Histone H2B type 2-B	1	11,90
Q64478	Histone H2B type 1-H	1	11,90
Q64475	Histone H2B type 1-B	1	11,90
P10854	Histone H2B type 1-M	1	11,90
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	1	11,90
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	1	1,94
Q6R0H7	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	1	0,62
P63094	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	1	1,78
Q99LU8	REVERSED Uncharacterized protein C6orf62 homolog	1	3,06
P33587	Vitamin K-dependent protein C	1	1,74

A -Localização Celular

B - Processos Biológicos

C - Função Molecular

Figura 34 – Distribuição das proteínas identificadas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J, de acordo com a localização celular (A), processos biológicos (B) e função molecular (C).

5.5.2 Análise proteômica quantitativa

Os resultados da quantificação proteica foram avaliados aplicando em triplicata 10 µg de amostras obtidas com tampão PBS e EDTA e 20 µg de amostra obtida com tampão de guanidina HCl em gel unidimensional SDS-PAGE 12% (Figura 35).

Figura 35 – SDS-PAGE 12% representativo de proteínas de fêmur de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com 0, 10 e 50 ppm F. Aliquotas correspondentes a 10 µg dos extratos PBSe E e 20 µg do extrato G1G2 foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com prata.

As amostras foram individualmente analisadas no LC-ESI MS/MS e os arquivos com os dados brutos dos espectros de massas foram submetidos à análise semi-quantitativa de diferença de expressão proteica livre de marcadores (*label-free semi-quantitative differential expression analysis*), utilizando o SIEVE software 1.3 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Foram realizadas 9 análises comparativas, sendo 6 entre os tratamentos e 3 entre as linhagens. Foram consideradas com abundância diferencial as proteínas que apresentaram razão maior ou igual a 1,5 e/ou menor ou igual a 0,5. No total, foram identificadas com diferença de abundância 46, 164, 6, 42, 25 e 18 proteínas para as comparações entre os tratamentos 129P3/J 0 ppm F X 129P3/J 10 ppm F; 129P3/J 0 ppm F X 129P3/J 50 ppm F; 129P3/J 10 ppm F X 129P3/J 50 ppm F; A/J 0 ppm F X A/J 10 ppm F; A/J 0 ppm F X A/J 50 ppm F; e A/J 10 ppm F X A/J 50 ppm F, e 217, 23 e 6 entre as linhagens 129P3/J 0 ppm F X A/J 0 ppm F; A/J 10 ppm F X 129P3/J 10 ppm F; e 129P3/J 50 ppm F X A/J 50 ppm F, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Quantidade total de proteínas identificadas com diferença de abundância para as comparações entre os tratamentos e linhagens de camundongos A/J e 129P3/J utilizando o SIEVE software

Grupos A X B	Nº total de proteínas identificadas	Nº total de proteínas com diferença de abundância	Nº total de proteínas com razão $\geq$ 1,5*	Nº total de proteínas com razão $\leq 0,5^*$
129P3/J 0 ppm F X 129P3/J 10 ppm F	1316	46	0	46
129P3/J 0 ppm F X 129P3/J 50 ppm F	1391	164	1	163
129P3/J 10 ppm F X 129P3/J 50 ppm F	1196	6	2	4
A/J 0 ppm F X A/J 10 ppm F	1455	42	1	41
A/J 0 ppm F X A/J 50 ppm F	1369	25	22	3
A/J 10 ppm F X A/J 50 ppm F	1437	18	18	0
129P3/J 0 ppm F X A/J 0 ppm F	1449	217	217	0
A/J 10 ppm F X 129P3/J 10 ppm F	1321	23	13	10
129P3/J 50 ppm F X A/J 50 ppm F	644	6	5	1

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

As tabelas 8–16 apresentam as proteínas alteradas entre os tratamentos com F e entre as linhagens para cada tratamento, os números de peptídeos pareados e os valores da razão A/B.

A classificação das proteínas ósseas identificadas com abundância diferencial foi feita através das bases de dados Uniprot (<http://www.informatics.jax.org/>), MGI-Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>), AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>) e Web-based Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/index.html>) com a finalidade de fornecer uma visão geral da função biológica (Figuras 36 e 37) e da localização celular (Figuras 38 e 39) das mesmas.

Em relação à localização celular (Figuras 37 e 39), foram identificadas proteínas presentes em uma variedade de compartimentos celulares. A grande maioria das proteínas apresentou localização intracelular, distribuídas no citoplasma, citoesqueleto, núcleo e em organelas como mitocôndria e retículo endoplasmático. Foram identificadas também proteínas da matriz extracelular, destacando-se o colágeno tipo I, que apresentou-se mais abundante no grupo 129P3/J controle quando comparado com o A/J controle (Razão 129P3/J X A/J = 1,5). Foram identificadas proteínas de membrana relacionadas com atividade de transporte, receptor, transdução de sinal, e outras atividades fundamentais para o processo celular, como a *transmembrane protein 214* (A/J controle / A/J 50 ppm F = 1,8), *G_α protein coupled receptor 98 precursor* (129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4), *insulin*

receptor_related protein precursor (129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,3), *fibroblast growth factor receptor_like 1 isoform 1* (129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5), *thyroid hormone receptor_associated protein 3* (129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,2), entre outras.

As figuras 36 e 38 apresentam a classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas com diferença de abundância nas comparações entre os tratamentos e as linhagens, respectivamente. A grande maioria das proteínas identificadas participa de processos celulares, como ciclo celular (p. ex. *cohesin subunit SA1*, razão A/J controle / 10 ppm F = 0,3; A/J 10 ppm F / 50 ppm F = 3,5; 129P3/J / A/J controle = 3,8 e 129P3/J controle / 50 ppm F = 0,2), adesão celular (p. ex. *integrin alpha_1 precursor*, razão 129P3/J / A/J controle = 1,5), apoptose (*apoptosis_inducing factor 3*, (razão 129P3/J controle / 50 ppm F = 0,5; 129P3/J / A/J controle = 1,6), comunicação celular (*deltex 4*, razão A/J controle / 50 ppm F = 1,5 e razão 129P3/J / A/J controle = 1,5), proliferação celular (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*, razão 129P3/J / A/J controle = 1,9), tradução (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 precursor*, razão A/J controle / 50 ppm F = 1,5), transcrição (*histone lysine N methyltransferase MLL4*, razão A/J 10 ppm F / 50 ppm F = 2,8; 129P3/J / A/J controle = 1,6) e replicação do DNA (*phosphatidylinositol 3 4 5 trisphosphate 5 phosphatase 2*, razão 129P3/J controle / 50 ppm F = 0,4; 129P3/J / A/J 10 ppm F = 2,0 e A/J 10 ppm F / 50 ppm F = 3,3).

Foram encontradas também proteínas alteradas pelo tratamento com F ou entre as linhagens envolvidas com processos em organismos multicelulares e desenvolvimento. A *chromodomain helicase DNA binding protein 7* é uma hidrolase que atua no desenvolvimento do sistema esquelético e foi encontrada super expressa nos grupos 129P3/J tratados com 50 ppm F em relação ao controle (Razão controle/50 ppm F = 0,5), A/J 10 ppm F em relação ao controle (Razão controle/10 ppm F = 0,4) e sub expressa na linhagem 129P3/J controle comparada com a A/J controle (Razão AJ/129 = 1,6).

Em relação aos processos metabólicos, foi observada com abundância diferencial uma variedade de enzimas com atividades proteolítica e catabólica. A *sentrin specific protease 7 isoform 1* foi encontrada super expressa no grupo A/J tratado com 10 ppm F em relação ao A/J controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) e entre as linhagens no grupo 129P3/J controle (razão 129P3/J / A/J controle = 1,6). Foram identificadas com alteração na abundância algumas enzimas que participam da biossíntese de glicoproteínas, como a *beta 1 4 mannosyl glycoprotein 4 beta N acetylglucosaminyltransferase* (GNT-III) (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,3; 129P3/J controle / A/J controle = 1,8; A/J controle / A/J 10 ppm F =

1,6), *beta_1_4_galactosyltransferase 7* (Beta-1,4-GalTase 7) (razão A/J controle / A/J 10 ppm F = 0,5) e *alpha_(1_6)_fucosyltransferase* (alpha1-6FucT) (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5). Enzimas de desintoxicação como a *aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* e a *carbonyl reductase NADPH 2* apresentaram uma maior abundância no grupo 129P3/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5).

No presente estudo, foram identificadas algumas enzimas envolvidas na via glicolítica, como a *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha* e a *phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha_liver isoform isoform b* que estavam super expressas no grupo 129P3/J 50 ppm F comparado com o controle (Razão controle/50 ppm F = 0,4 para ambas) . A primeira enzima também se apresentou super expressa no grupo A/J 10 ppm F em relação ao controle (Razão controle/10 ppm F = 0,3) e a segunda sub expressa na linhagem 129P3/J controle em relação à A/J controle (Razão AJ/129 = 1,8). Como pode ser observado, o tratamento com 50 ppm F aumentou a abundância destas enzimas.

Em relação à sinalização, no presente estudo, o F alterou a abundância de algumas fosfatases, como a *Phosphatidate phosphatase LPIN2* (Lipin-2) (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4; A/J 10 ppm F / 129P3/J 10 ppm F = 0,4 e 129P3/J controle / A/J controle = 2,4) e *phosphatidylinositol 3 4 5 trisphosphate 5 phosphatase 1* (SHIP1) (razão A/J controle / A/J 50 ppm F = 0,4) e quinases, como a *A kinase (PRKA) anchor protein 11* (Protein Akap11) (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,5 e razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4), *A_kinase anchor protein 17B* (AKAP-17B) (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5), *phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha liver isoform isoform b* e *a* (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,8 e razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4), *serine/threonine protein kinase PAK 2* (razão 129P3/J controle / 129P3/J 10 ppm F = 0,4 e razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4), *serine/threonine protein kinase MARK2 isoform 2 e 3* (EMK-1) (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,5), *weel like protein kinase 2* (mWee1B) (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,6), *serine/threonine_protein kinase ATR* (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5), *connector enhancer of kinase suppressor of ras 3* (CNRK3), (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,4), *dual serine/threonine and tyrosine protein kinase* (Dusty PK) (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,9), *leucine_rich repeat serine/threonine_protein kinase 1*, (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5) e *hormonally up_regulated neu tumor associated kinase* (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,9) e *eukaryotic translation initiation factor 2_alpha kinase 3 precursor* (razão A/J controle / A/J 50 ppm F = 1,4) e de

uma GTPase ligada à proteína G, *elongation factor G mitochondrial* (EF-Gmt) (razão A/J controle / A/J 10 ppm F = 0,5e 129P3/J controle / A/J controle = 1,5).

Muitas proteínas também encontradas foram classificadas na categoria regulação de processos biológicos, incluindo a homeostasia e a regulação de vários processos celulares. Algumas proteínas identificadas participam na regulação da diferenciação de osteoblastos (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 precursor*) e osteoclastos (*phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase* e a *NADPH oxidase 4*).

O restante das proteínas foram distribuídas nas categorias organização dos componentes celulares ou biogênese, resposta a estímulos, transporte e localização como se observa nas figuras 36 e 38. Como exemplo de proteínas relacionadas com atividade de transporte estão a *transmembrane channel_like protein 2* (razão 129P3/J controle / 129P3/J 50 ppm F = 0,5; 129P3/J controle / A/J controle = 1,5 e A/J controle / A/J 10 ppm F = 1,5), *Sodium/hydrogen exchanger 5* e *sodium channel protein type 10 subunit alpha* (razão 129P3/J controle / 10 ppm F ou 50 ppm F = 0,5 para ambas as proteínas).

Tabela 8 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo A/J controle (A) comparado ao A/J 10 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi22122527	beta_1_4_galactosyltransferase 7	1,6	2
gi20149734	transmembrane channel_like protein 2	0,5	2
gi42734351	sentrin_specific protease 7 isoform 1	0,5	2
gi51593105	sentrin_specific protease 7 isoform 2	0,5	2
gi257153350	signal_induced proliferation_associated protein 1	0,5	2
gi12963737	exportin_2	0,5	2
gi42490751	agrin	0,5	2
gi170650599	elongation factor G_ mitochondrial precursor	0,5	2
gi237513007	kelch domain containing 7B	0,5	2
gi33695150	beta_1_4_mannosyl_glycoprotein	0,5	2
	4_beta_N_acetylglucosaminyltransferase		
gi51571541	death_inducer obliterator 1 isoform 2	0,5	2
gi76096375	death_inducer obliterator 1 isoform 3	0,5	2
gi218505735	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 3	0,5	2
gi218505739	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 1	0,5	2
gi218505741	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 2	0,5	2
gi9055304	cGMP_inhibited 3__5__cyclic phosphodiesterase A	0,5	2
gi124486799	hypothetical protein LOC625286	0,5	2
gi309271218	PREDICTED: zinc finger protein 420_like	0,5	2
gi118197274	autophagy_related protein 2 homolog B	0,5	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi226958516	RAS protein activator like 2	0,5	3
gi27370376	kin of IRRE_like protein 2 precursor	0,5	2
gi148368976	centaurin_alpha 1	0,5	2
gi254692911	SEC23_interacting protein	0,5	2
gi283135118	monofunctional C1_tetrahydrofolate synthase_mitochondrial precursor	0,5	2
gi198278482	rho GTPase_activating protein 42	0,5	2
gi313661493	protein unc_79 homolog	0,4	2
gi71143102	ATPase family AAA domain_containing protein 5	0,4	4
gi153792273	dynein heavy chain 8_ axonemal	0,4	2
gi31543476	PHD finger protein 2	0,4	3
gi124487249	chromodomain_helicase_DNA_binding protein 7	0,4	2
gi114052809	inverted formin_2	0,4	2
gi145699091	nesprin_2	0,4	2
gi7657389	NADPH oxidase 4	0,4	2
gi126157504	serine/arginine repetitive matrix protein 2	0,4	4
gi40254610	cohesin subunit SA_1	0,3	2
gi6679263	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha_testis_specific form_mitochondrial precursor	0,3	2
gi62526118	cytoskeleton_associated protein 4	0,3	2
gi140969817	bromodomain PHD finger transcription factor	0,3	2
gi260593706	HEAT repeat_containing protein 7B2	0,2	2
gi94536725	La ribonucleoprotein domain family_member 1B	0,2	2
gi126362979	protein DGCR14 isoform 1	0,2	2
gi126362981	protein DGCR14 isoform 2	0,2	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 9 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo A/J controle (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi257196144	hect domain and RCC1_like domain 1	1,9	2
gi86198316	protein disulfide_isomerase A4	1,8	2
gi6679421	NADPH__cytochrome P450 reductase	1,7	2
gi28316750	histone H2B type 1_A	1,7	2
gi309268583	PREDICTED: zinc finger protein 845_like	1,6	2
gi244790127	Rho GTPase activating protein 4 isoform 1	1,5	2
gi244790130	Rho GTPase activating protein 4 isoform 2	1,5	2
gi244790133	Rho GTPase activating protein 4 isoform 3	1,5	2
gi226529982	MORC family CW_type zinc finger protein 2A isoform 1	1,5	2
gi37718976	MORC family CW_type zinc finger protein 2A isoform 2	1,5	2
gi126352572	pecanex_like protein 2 isoform 2	1,5	2
gi31559970	transmembrane protein 214	1,5	2
gi31542097	GTPase_activating Rap/Ran_GAP domain_like protein 3	1,5	2
gi219555651	hypothetical protein LOC71721 isoform 1	1,5	2
gi219555653	hypothetical protein LOC71721 isoform 2	1,5	2
gi219555655	hypothetical protein LOC71721 isoform 3	1,5	2
gi188219611	protein deltex_4	1,5	2
gi124001564	eukaryotic translation initiation factor 2_alpha kinase 3 precursor	1,5	2
gi12963737	exportin_2	1,5	2
gi71979930	cytospin_B	1,5	2
gi226437613	symplekin	1,5	2
gi47059015	CCR4_NOT transcription complex subunit 6	1,5	2
gi158853999	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 1 isoform 1	0,4	2
gi158854001	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 1 isoform 2	0,4	2
gi158854003	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 1 isoform 3	0,4	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 10 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo A/J 10 ppm F (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi309264826	PREDICTED: zinc finger protein 845_like	3,5	2
gi309269952	PREDICTED: zinc finger protein 845_like	3,5	2
gi40254610	cohesin subunit SA_1	3,5	2
gi56118256	zinc finger protein 324	3,4	2
gi29336062	E3 ubiquitin_protein ligase Topors	3,4	2
gi170172575	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 2	3,3	2
gi7657389	NADPH oxidase 4	3,3	2
gi31543476	PHD finger protein 2	2,8	2
gi115495457	histone_lysine N_methyltransferase MLL4	2,8	3
gi254939651	putative ATP_dependent RNA helicase DHX57 isoform 2	2,5	2
gi254939654	putative ATP_dependent RNA helicase DHX57 isoform 1	2,5	2
gi133778947	desmocollin_3	2,2	2
gi257153350	signal_induced proliferation_associated protein 1	2,1	2
gi124487095	LINE_1 type transposase domain_containing protein 1	1,6	2
gi124430553	codanin_1	1,5	2
gi114052809	inverted formin_2	1,5	2
gi189181692	SEC14_like protein 5	1,5	2
gi29244026	somitovasculin	1,5	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 11 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo 129P3/J controle (A) comparado ao 129P3/J 10 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi194688157	olfactory guanylyl cyclase GC_D	0,5	2
gi226443061	ubiquitin specific protease 31	0,5	3
gi29336062	E3 ubiquitin_protein ligase Topors	0,5	2
gi218505735	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 3	0,5	2
gi218505739	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 1	0,5	2
gi218505741	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 2	0,5	2
gi126032319	membrane_associated phosphatidylinositol transfer protein 3 isoform 2	0,5	2
gi67972419	membrane_associated phosphatidylinositol transfer protein 3 isoform 1	0,5	2
gi9055304	cGMP_inhibited 3__5__cyclic phosphodiesterase A	0,5	2
gi254675115	plectin isoform 12alpha	0,5	2

gi254675117	plectin isoform 1c2alpha3alpha	0,5	2
gi254675119	plectin isoform 1b2alpha	0,5	2
gi254675195	plectin isoform 1c	0,5	2
gi254675201	plectin isoform 1f	0,5	2
gi254675244	plectin isoform 1	0,5	2
gi254675251	plectin isoform 1d	0,5	2
gi254675253	plectin isoform 1b	0,5	2
gi254675259	plectin isoform 1g	0,5	2
gi254675265	plectin isoform 1a	0,5	2
gi256367522	plectin isoform 1hij	0,5	2
gi256418964	plectin isoform 1e	0,5	2
gi22122367	WD repeat domain phosphoinositide_interacting protein 1	0,5	2
gi222831636	glycine N_acyltransferase_like protein 3	0,5	2
gi295424164	probable histone_lysine N_methyltransferase NSD2 isoform 1	0,5	2
gi295424166	probable histone_lysine N_methyltransferase NSD2 isoform 2	0,5	2
gi52350563	probable G_protein coupled receptor 158 precursor	0,5	2
gi27370332	G patch domain_containing protein 3	0,5	2
gi161016824	cysteine desulfurase_ mitochondrial	0,5	2
gi124486739	sodium/hydrogen exchanger 5	0,5	2
gi254039743	fidgetin_like protein 1	0,5	2
gi91718886	synaptotagmin_like protein 2 isoform 3	0,5	2
gi91718889	synaptotagmin_like protein 2 isoform 2	0,5	2
gi120537241	leucyl_tRNA synthetase_ cytoplasmic	0,5	2
gi157042778	corepressor interacting with RBPJ 1	0,5	2
gi218156289	complement factor B isoform 1	0,5	2
gi218156291	complement factor B isoform 2	0,5	2
gi166197700	poly	0,5	2
gi75677454	hypothetical protein LOC381201	0,5	2
gi131889984	sodium channel protein type 10 subunit alpha	0,5	2
gi70906455	BTB/POZ domain_containing protein 3 isoform 1	0,5	2
gi7657389	NADPH oxidase 4	0,5	2
gi113931644	hypothetical protein LOC208994	0,5	2
gi27229036	signal recognition particle receptor subunit alpha	0,4	2
gi46559406	serine/threonine_protein kinase PAK 2	0,4	2
gi42490751	agrin	0,4	2
gi68533246	thyroid hormone receptor_associated protein 3	0,4	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 12 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo 129P3/J controle (A) comparado ao 129P3/J 50 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi74315902	zinc finger B_box domain_containing protein 1	1,8	2
gi70778909	apoptosis_inducing factor 3	0,5	4
gi189339266	serine/threonine_protein kinase ATR	0,5	2
gi162329564	caprin_1 isoform a	0,5	2
gi162329566	caprin_1 isoform b	0,5	2
gi162329570	caprin_1 isoform c	0,5	2
gi31560444	alpha_(1_6)_fucosyltransferase	0,5	2
gi131889984	sodium channel protein type 10 subunit alpha	0,5	3
gi156713423	26S proteasome non_ATPase regulatory subunit 8	0,5	2
gi157041244	myosin_XV isoform 1	0,5	5
gi157041248	myosin_XV isoform 3	0,5	5
gi158508674	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component isoform b	0,5	2
gi6755594	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component isoform a	0,5	2
gi124486779	lethal(3)malignant brain tumor_like protein	0,5	2
gi160333077	tumor suppressor p53_binding protein 1	0,5	3
gi240120054	aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	0,5	2
gi294997241	hypothetical protein LOC545886	0,5	2
gi19527130	EMILIN_1 precursor	0,5	4
gi84875520	ski_like protein isoform b	0,5	2
gi6679461	DNA primase large subunit	0,5	2
gi109689713	synaptonemal complex protein 2	0,5	4
gi118403328	sex comb on midleg_like protein 2	0,5	3
gi20149734	transmembrane channel_like protein 2	0,5	2
gi163310767	partitioning defective 3 homolog B	0,5	2
gi167234372	eukaryotic translation initiation factor 4B	0,5	2
gi124486739	sodium/hydrogen exchanger 5	0,5	2
gi124286823	ataxin_1_like	0,5	2
gi194328769	protein Jade_1	0,5	2
gi113866011	protocadherin beta 9	0,5	2
gi13384710	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	0,5	3
gi16905101	fibroblast growth factor receptor_like 1 isoform 1	0,5	2
gi170763504	Werner syndrome ATP_dependent helicase homolog	0,5	2
gi114796654	cytosolic carboxypeptidase 6 isoform 1	0,5	2
gi115292427	cytosolic carboxypeptidase 6 isoform 2	0,5	2
gi157951641	FAT tumor suppressor homolog 1	0,5	2
gi170932490	protein MICAL_3	0,5	2
gi126432546	A_kinase anchor protein 17B	0,5	2
gi194688157	olfactory guanylyl cyclase GC_D	0,5	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi254588110	histone H1,3	0,5	2
gi9845257	histone H1,2	0,5	2
gi56699427	leucine_rich repeat serine/threonine_protein kinase 1	0,5	2
gi114155137	dynein heavy chain 5_ axonemal	0,5	2
gi164698462	semaphorin_5B precursor	0,5	2
gi47078289	E3 ubiquitin_protein ligase RLIM	0,5	2
gi254675115	plectin isoform 12alpha	0,5	2
gi254675117	plectin isoform 1c2alpha3alpha	0,5	2
gi254675119	plectin isoform 1b2alpha	0,5	2
gi254675195	plectin isoform 1c	0,5	2
gi254675201	plectin isoform 1f	0,5	2
gi254675244	plectin isoform 1	0,5	2
gi254675251	plectin isoform 1d	0,5	2
gi254675253	plectin isoform 1b	0,5	2
gi254675259	plectin isoform 1g	0,5	2
gi254675265	plectin isoform 1a	0,5	2
gi256367522	plectin isoform 1hij	0,5	2
gi256418964	plectin isoform 1e	0,5	2
gi262231769	RNA binding motif protein_ X_linked	0,5	3
gi83699420	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	0,5	3
gi26006471	zinc finger CCCH domain_containing protein 3	0,5	2
gi116686118	GTPase IMAP family member 8	0,5	3
gi124487265	biorientation of chromosomes in cell division 1_like	0,5	2
gi253970442	Niemann_Pick C1_like protein 1 precursor	0,5	2
gi269973846	ephrin type_B receptor 1 isoform 1	0,5	3
gi269973848	ephrin type_B receptor 1 isoform 2	0,5	3
gi300069034	PDZ and LIM domain protein 5 isoform ENH4	0,5	2
gi21362307	zinc finger protein 622	0,5	2
gi30425148	coiled_coil domain_containing protein 40	0,5	2
gi6671688	carbonyl reductase	0,5	2
gi254692919	hypothetical protein LOC78258	0,5	2
gi124517734	phosphatidylinositol 3_4_5_trisphosphate_dependent Rac exchanger 1 protein	0,5	2
gi255003837	neuroblastoma_amplified protein	0,5	2
gi253970480	zinc finger and BTB domain_containing protein 5	0,5	2
gi51890207	tumor suppressor candidate gene 1 protein homolog	0,5	3
gi51036613	fragile X mental retardation protein 1 homolog	0,5	3
gi31044455	ras_GEF domain_containing family member 1B isoform 2	0,5	2
gi39930599	WD repeat and FYVE domain_containing protein 3	0,5	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi124487249	chromodomain_helicase_DNA_binding protein 7	0,5	2
gi242332574	probable ribonuclease ZC3H12C	0,5	2
gi91206400	B_cell CLL/lymphoma 9_like protein	0,5	2
gi160333600	F_box only protein 38	0,5	3
gi103472019	general receptor for phosphoinositides 1_associated scaffold protein	0,5	2
gi206597551	coiled_coil domain_containing protein 36	0,5	2
gi13878233	synaptotagmin_like protein 3 isoform a	0,5	2
gi210147489	synaptotagmin_like protein 3 isoform b	0,5	2
gi210147520	synaptotagmin_like protein 3 isoform 3SIII	0,5	2
gi242247109	cyclicin_basic protein of sperm head cytoskeleton 2	0,5	2
gi124487493	signal_induced proliferation_associated 1_like protein 2	0,5	2
gi20127150	Golgin subfamily A member 4	0,5	2
gi13507644	carboxypeptidase N catalytic chain precursor	0,5	2
gi6680193	histone deacetylase 1	0,5	2
gi87162464	histone deacetylase 2	0,5	2
gi158966676	inactive serine protease 35 precursor	0,5	2
gi57164407	protein TANC1	0,4	3
gi27370332	G patch domain_containing protein 3	0,4	2
gi26986603	1_phosphatidylinositol_4_5_bisphosphate phosphodiesterase gamma_2	0,4	3
gi260166719	cytoskeleton_associated protein 5 isoform 2	0,4	2
gi260166721	cytoskeleton_associated protein 5 isoform 1	0,4	2
gi9055304	cGMP_inhibited 3__5__cyclic phosphodiesterase A	0,4	2
gi30424788	ataxin_7_like protein 2	0,4	2
gi188528897	pleckstrin homology_like domain family B member 2	0,4	2
gi27369772	connector enhancer of kinase suppressor of ras 3	0,4	2
gi257900510	MAGE_like protein 2	0,4	3
gi62000656	family with sequence similarity 71_ member B	0,4	2
gi209447068	zinc finger protein 609	0,4	2
gi309267739	PREDICTED: hypothetical protein LOC668802	0,4	2
gi256773195	cardiomyopathy_associated protein 5	0,4	3
gi161702988	apolipoprotein B precursor	0,4	3
gi153792273	dynein heavy chain 8_ axonemal	0,4	3
gi197927225	SET domain containing 2	0,4	3
gi256818808	A kinase (PRKA) anchor protein 11	0,4	2
gi170172575	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 2	0,4	3
gi309264554	PREDICTED: spectrin beta chain_ brain 4	0,4	2
gi309267762	PREDICTED: spectrin beta chain_ brain 4	0,4	2
gi7305075	ras GTPase_activating protein_binding protein 1	0,4	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi295424152	phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha_liver isoform isoform b	0,4	2
gi295424154	phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha_liver isoform isoform a	0,4	2
gi163965357	nascent polypeptide_associated complex subunit alpha isoform a	0,4	3
gi66792790	filensin	0,4	2
gi82881056	PREDICTED: 60S ribosomal protein L6_like	0,4	2
gi84662736	60S ribosomal protein L6	0,4	2
gi46559406	serine/threonine_protein kinase PAK 2	0,4	3
gi218505735	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 3	0,4	2
gi218505739	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 1	0,4	2
gi218505741	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 2	0,4	2
gi42490751	agrin	0,4	2
gi6679263	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha_testis_specific form_mitochondrial precursor	0,4	2
gi39204553	chromodomain_helicase_DNA_binding protein 4	0,4	4
gi309263722	PREDICTED: hypothetical protein LOC76651	0,4	2
gi253795498	protein DEK	0,4	2
gi240255626	serine/arginine_rich splicing factor 12	0,4	2
gi309266673	PREDICTED: uncharacterized protein C2orf78 homolog	0,4	2
gi91718886	synaptotagmin_like protein 2 isoform 3	0,4	2
gi91718889	synaptotagmin_like protein 2 isoform 2	0,4	2
gi114158683	cytosolic carboxypeptidase 1 isoform 2	0,4	2
gi114158695	cytosolic carboxypeptidase 1 isoform 1	0,4	2
gi153791474	G_protein coupled receptor 98 precursor	0,4	3
gi259089106	phosphatidate phosphatase LPIN2 isoform 1	0,4	2
gi31543129	phosphatidate phosphatase LPIN2 isoform 2	0,4	2
gi31543476	PHD finger protein 2	0,4	3
gi157042778	corepressor interacting with RBPJ 1	0,3	2
gi164519041	acetylcholinesterase collagenic tail peptide precursor	0,3	2
gi157909774	peripheral_type benzodiazepine receptor_associated protein 1	0,3	2
gi70906455	BTB/POZ domain_containing protein 3 isoform 1	0,3	2
gi37059803	microcephalin	0,3	2
gi56550069	cyclin T2	0,3	2
gi160333073	insulin receptor_related protein precursor	0,3	2
gi114052809	inverted formin_2	0,3	2
gi75677454	hypothetical protein LOC381201	0,3	2
gi113931644	hypothetical protein LOC208994	0,3	2
gi158966725	protein C16orf88 homolog isoform 1	0,3	3
gi111955152	phospholipase DDHD1 isoform 1	0,3	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi111955212	phospholipase DDHD1 isoform 3	0,3	2
gi111955224	phospholipase DDHD1 isoform 2	0,3	2
gi33695150	beta_1_4_mannosyl_glycoprotein 4_beta_N_acetylglucosaminyltransferase	0,3	2
gi120537241	leucyl_tRNA synthetase_ cytoplasmic	0,3	2
gi124486839	coiled_coil domain_containing protein 88B	0,3	2
gi226443061	ubiquitin specific protease 31	0,3	3
gi124249226	hypothetical protein LOC73582	0,3	2
gi40254610	cohesin subunit SA_1	0,2	2
gi157951727	catenin alpha_2 isoform 1	0,2	2
gi157951729	catenin alpha_2 isoform 2	0,2	2
gi7657389	NADPH oxidase 4	0,2	2
gi226342967	inactive phospholipase C_like protein 2	0,2	2
gi68533246	thyroid hormone receptor_associated protein 3	0,2	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela13 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial no grupo 129P3/J 10 ppm F (A) comparado ao 129P3/J 50 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi46358380	zinc finger protein 646	2,6	2
gi33468923	oxygen_regulated protein 1 isoform 1	1,7	2
gi33468923	GTPase IMAP family member 8	0,5	3
gi170932490	protein MICAL_3	0,5	2
gi39204553	chromodomain_helicase_DNA_binding protein 4	0,5	2
gi226443061	ubiquitin specific protease 31	0,5	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 14 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial entre as linhagens 129P3/J controle (A) comparado ao A/J controle (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi40254610	cohesin subunit SA_1	3,8	2
gi164698454	semaphorin_4F isoform a	3,8	2
gi164698456	semaphorin_4F isoform b	3,8	2
gi188219611	protein deltex_4	3,7	2
gi114158701	nucleolar protein 14	2,8	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi7657389	NADPH oxidase 4	2,7	2
gi31543476	PHD finger protein 2	2,6	3
gi259089106	phosphatidate phosphatase LPIN2 isoform 1	2,4	2
gi31543129	phosphatidate phosphatase LPIN2 isoform 2	2,4	2
gi66792790	filensin	2,3	2
gi7710094	secreted frizzled_related sequence protein 4 precursor	2,3	2
gi71037397	regulatory factor X_ 5	2,3	2
gi157909774	peripheral_type benzodiazepine receptor_associated protein 1	2,3	2
gi113866011	protocadherin beta 9	2,1	2
gi164519041	acetylcholinesterase collagenic tail peptide precursor	2,1	2
gi294979216	sickle tail protein isoform d	2,1	2
gi46358399	sickle tail protein isoform a	2,1	2
gi46358401	sickle tail protein isoform b	2,1	2
gi240848573	probable ATP_dependent RNA helicase DHX36	2,1	2
gi84794629	zinc finger and BTB domain_containing protein 16	2,1	2
gi309267739	PREDICTED: hypothetical protein LOC668802	2,1	2
gi226437676	nucleoporin 205	2,1	2
gi124486588	sickle tail protein isoform c	2,0	3
gi294979218	sickle tail protein isoform e	2,0	3
gi31711997	neurabin_1	2,0	2
gi9055304	cGMP_inhibited 3__5__cyclic phosphodiesterase A	2,0	2
gi145864461	inner nuclear membrane protein Man1	2,0	2
gi40556610	dual serine/threonine and tyrosine protein kinase	1,9	2
gi218505735	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 3	1,9	2
gi218505739	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 1	1,9	2
gi218505741	alpha_tubulin N_acetyltransferase isoform 2	1,9	2
gi257153350	signal_induced proliferation_associated protein 1	1,9	2
gi158186616	abhydrolase domain_containing protein FAM108C1	1,9	2
gi114052809	inverted formin_2	1,9	2
gi19527168	PC4 and SFRS1_interacting protein	1,9	2
gi29336062	E3 ubiquitin_protein ligase Topors	1,9	3
gi309263722	PREDICTED: hypothetical protein LOC76651	1,9	2
gi70778792	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	1,9	2
gi124517714	zinc finger protein 335	1,8	2
gi295148204	1_phosphatidylinositol_4_5_bisphosphate phosphodiesterase eta_1 isoform 2	1,8	2
gi33695150	beta_1_4_mannosyl_glycoprotein 4_beta_N_acetylglucosaminyltransferase	1,8	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi69885032	myelin basic protein isoform 1	1,8	2
gi69885040	myelin basic protein isoform 2	1,8	2
gi69885049	myelin basic protein isoform 3	1,8	2
gi69885065	myelin basic protein isoform 5	1,8	2
gi75677454	hypothetical protein LOC381201	1,8	2
gi295424152	phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha_liver isoform isoform b	1,8	2
gi295424154	phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha_liver isoform isoform a	1,8	2
gi31559970	transmembrane protein 214	1,8	2
gi22094119	myosin_XVIIIa	1,8	2
gi131889984	sodium channel protein type 10 subunit alpha	1,8	2
gi126157466	polyductin	1,8	2
gi31543026	potassium voltage_gated channel subfamily A member 4	1,7	2
gi30424788	ataxin_7_like protein 2	1,7	2
gi124486793	rhotekin_2	1,7	2
gi153792273	dynein heavy chain 8_ axonemal	1,7	2
gi126506294	pre_rRNA_processing protein TSR1 homolog	1,7	2
gi6753316	cyclin_T1	1,7	2
gi309268904	PREDICTED: hemoglobin subunit beta_1_like isoform 6	1,7	4
gi124487093	armadillo repeat_containing protein 4	1,7	2
gi187960049	heat_stable enterotoxin receptor isoform 2	1,7	2
gi187960051	heat_stable enterotoxin receptor isoform 1	1,7	2
gi23956078	ATP_binding cassette sub_family F member 2 isoform 1	1,7	2
gi299473734	ATP_binding cassette sub_family F member 2 isoform 2	1,7	2
gi31982300	hemoglobin subunit beta_1	1,7	5
gi17647499	hemoglobin subunit beta_2	1,7	6
gi295148098	actin_binding LIM protein 2 isoform 1	1,7	2
gi295148100	actin_binding LIM protein 2 isoform 2	1,7	2
gi295148102	actin_binding LIM protein 2 isoform 4	1,7	2
gi295148104	actin_binding LIM protein 2 isoform 5	1,7	2
gi295148106	actin_binding LIM protein 2 isoform 6	1,7	2
gi66773171	actin_binding LIM protein 2 isoform 3	1,7	2
gi33598964	myosin_10	1,7	3
gi144922653	fas_binding factor 1	1,7	2
gi295444874	zinc finger protein 518B	1,7	2
gi86990454	kinesin_like protein KIF21B	1,7	2
gi281182704	intraflagellar transport protein 172 homolog	1,7	3
gi257467625	Fc fragment of IgG binding protein_like	1,7	2
gi309266018	PREDICTED: hemoglobin subunit beta_1_like isoform 6	1,6	6

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi26006471	zinc finger CCCH domain_containing protein 3	1,6	2
gi154689979	hemicentin 1	1,6	2
gi309266016	PREDICTED: hemoglobin subunit beta_1_like isoform 3	1,6	7
gi116812883	DC_STAMP domain_containing protein 1	1,6	3
gi194328769	protein Jade_1	1,6	2
gi145301578	hemoglobin subunit alpha	1,6	6
gi34328400	serine/arginine_rich splicing factor 1 isoform 1	1,6	2
gi112421060	repetin	1,6	2
gi70778909	apoptosis_inducing factor 3	1,6	2
gi110625837	pyridine nucleotide_disulfide oxidoreductase domain_containing protein 1	1,6	2
gi300863061	MAM domain_containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2 isoform A	1,6	2
gi300863063	MAM domain_containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2 isoform B	1,6	2
gi268370257	zinc finger protein 764 isoform 1	1,6	2
gi12963737	exportin_2	1,6	2
gi18087781	protocadherin beta 6	1,6	2
gi158187505	ral GTPase_activating protein subunit alpha_2	1,6	2
gi161333831	activin receptor type_1C isoform 1	1,6	2
gi85701866	activin receptor type_1C isoform 2	1,6	2
gi161484610	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	1,6	2
gi241982716	myosin_11 isoform 1	1,6	2
gi241982718	myosin_11 isoform 2	1,6	2
gi171542815	ephrin type_A receptor 7 isoform 2	1,6	2
gi309266008	PREDICTED: hemoglobin subunit beta_1_like isoform 5	1,6	4
gi309268894	PREDICTED: hemoglobin subunit beta_1_like isoform 5	1,6	4
gi33469055	EMILIN_3	1,6	2
gi29336026	myosin_14	1,6	2
gi19527130	EMILIN_1 precursor	1,6	2
gi158749547	syntaxin_binding protein 5	1,6	2
gi124487249	chromodomain_helicase_DNA_binding protein 7	1,6	2
gi29243956	zinc finger protein 947	1,6	2
gi157384965	vomer nasal 2_ receptor 78	1,6	2
gi148368976	centaurin_ alpha 1	1,6	2
gi125347764	BCL_6 corepressor_like protein 1	1,6	2
gi149261913	PREDICTED: hypothetical protein LOC73216	1,6	2
gi61742810	RIKEN cDNA 3110050K21	1,6	2
gi7657216	hormonally up_regulated neu tumor_associated	1,6	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
	kinase		
gi21362371	rab effector MyRIP	1,6	2
gi42734351	sentrin_specific protease 7 isoform 1	1,6	2
gi51593105	sentrin_specific protease 7 isoform 2	1,6	2
gi84875520	ski_like protein isoform b	1,6	2
gi257900510	MAGE_like protein 2	1,6	2
gi62526130	NK_tumor recognition protein	1,6	2
gi7305075	ras GTPase_activating protein_binding protein 1	1,6	2
gi160707919	major facilitator superfamily domain_containing protein 6 isoform 1	1,6	2
gi31981530	caskin_2	1,6	2
gi169234624	antigen KI_67	1,6	3
gi130490961	lysM and putative peptidoglycan_binding domain_containing protein 2	1,6	2
gi225543339	claspin	1,6	2
gi171846235	wee1_like protein kinase 2	1,6	2
gi158749615	peripheral benzodiazepine receptor associated protein	1,5	2
gi124486739	sodium/hydrogen exchanger 5	1,5	2
gi225703035	integrin alpha_11 precursor	1,5	2
gi160333600	F_box only protein 38	1,5	3
gi170650599	elongation factor G_mitochondrial precursor	1,5	2
gi189181692	SEC14_like protein 5	1,5	2
gi46519149	BAP28 protein	1,5	2
gi157951604	adenylyl cyclase_associated protein 1	1,5	2
gi117414180	tolloid_like protein 1 precursor	1,5	2
gi6755610	transcription factor SOX_6 isoform 1	1,5	2
gi70980557	transcription factor SOX_6 isoform 3	1,5	2
gi70980559	transcription factor SOX_6 isoform 2	1,5	2
gi9789975	signal transducing adapter molecule 2	1,5	2
gi225007615	patatin_like phospholipase domain_containing protein 7	1,5	2
gi309271218	PREDICTED: zinc finger protein 420_like	1,5	3
gi122937355	serine/threonine_protein kinase MARK2 isoform 2	1,5	2
gi122937363	serine/threonine_protein kinase MARK2 isoform 3	1,5	2
gi309266733	PREDICTED: zinc finger protein 420_like	1,5	2
gi31980962	WW domain_containing oxidoreductase	1,5	2
gi6756041	14_3_3 protein zeta/delta	1,5	3
gi307574641	predicted gene 4975	1,5	2
gi227430340	kinesin_like protein KIF2C	1,5	2
gi262231769	RNA binding motif protein_X_linked	1,5	3
gi83699420	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	1,5	3
gi113722131	probable helicase senataxin	1,5	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi309262686	PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 6_like	1,5	2
gi309269806	PREDICTED: hypothetical protein LOC100503562	1,5	2
gi21312922	coiled_coil domain_containing protein 39	1,5	2
gi145699091	nesprin_2	1,5	2
gi66955886	sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	1,5	2
gi124487251	tigger transposable element_derived protein 2	1,5	3
gi166063959	hypothetical protein LOC77644	1,5	2
gi309271534	PREDICTED: melanoma antigen preferentially expressed in tumors_like	1,5	2
gi124487225	fibronectin type III domain_containing protein 1	1,5	4
gi309272950	PREDICTED: fibronectin type III domain_containing protein 1_like	1,5	4
gi122114644	roundabout homolog 1 precursor	1,5	2
gi153791933	dynein heavy chain 9_ axonemal	1,5	2
gi112807186	GCN1 general control of amino_acid synthesis 1_like 1	1,5	4
gi148762976	zinc finger protein basonuclin_1	1,5	2
gi225637538	dystrophia myotonica WD repeat_containing protein	1,5	2
gi256818808	A kinase (PRKA) anchor protein 11	1,5	2
gi254692911	SEC23_interacting protein	1,5	2
gi161169020	zinc finger CCCH domain_containing protein 4	1,5	3
gi6680834	calmodulin	1,5	2
gi309263233	PREDICTED: 60S ribosomal protein L23a_like	1,5	2
gi117956381	proteasome activator complex subunit 4	1,5	2
gi54312135	microtubule_associated tumor suppressor 1 homolog isoform 3	1,5	2
gi160358833	bone sialoprotein 2 precursor	1,5	2
gi157823761	kinesin_like protein KIF21A isoform 2	1,5	2
gi269914091	mdm2_binding protein isoform 1	1,5	2
gi21426893	histone H1,5	1,5	2
gi112363082	neogenin isoform 1	1,5	2
gi112363084	neogenin isoform 2	1,5	2
gi125347376	filamin_A	1,5	2
gi120537241	leucyl_tRNA synthetase_ cytoplasmic	1,5	3
gi21312576	claudin_23	1,5	2
gi262050633	methenyltetrahydrofolate synthase domain_containing protein isoform 1	1,5	2
gi27370130	methenyltetrahydrofolate synthase domain_containing protein isoform 2	1,5	2
gi20149734	transmembrane channel_like protein 2	1,5	3
gi148539957	alpha_internexin	1,5	2
gi300069034	PDZ and LIM domain protein 5 isoform ENH4	1,5	2

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi10048442	leukotriene B4 receptor 2	1,5	2
gi124486923	182 kDa tankyrase_1_binding protein	1,5	2
gi157838001	ATP_dependent RNA helicase DDX42	1,5	2
gi254692843	dynein heavy chain 10_ axonemal	1,5	2
gi124301198	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2_like	1,5	2
gi139948413	hypothetical protein LOC207921	1,5	2
gi8567340	coatamer subunit gamma_2	1,5	2
gi309272373	PREDICTED: hypothetical protein LOC100504384	1,5	2
gi309273074	PREDICTED: hypothetical protein LOC100502692	1,5	2
gi309273251	PREDICTED: hypothetical protein LOC621831	1,5	2
gi111120329	collagen alpha_2(I) chain precursor	1,5	3
gi30794468	hypothetical protein LOC66404	1,5	2
gi42734447	bone morphogenetic protein 1 precursor	1,5	3
gi31982755	vimentin	1,5	8
gi157823982	zinc finger protein 318 isoform 2	1,5	2
gi18087793	protocadherin beta 15	1,5	2
gi6754694	probable E3 ubiquitin_protein ligase MID2	1,5	2
gi134032032	upstream_binding protein 1 isoform a	1,5	2
gi269973895	rho GTPase_activating protein 39 isoform 2	1,5	2
gi269973897	rho GTPase_activating protein 39 isoform 1	1,5	2
gi160708005	FYVE_ RhoGEF and PH domain_containing protein 6	1,5	3
gi198278549	RIKEN cDNA 4930443G12	1,5	2
gi13386132	hypothetical protein LOC107373	1,5	2
gi160948601	steroid 17_alpha_hydroxylase/17_20 lyase	1,5	2
gi153791389	integrin alpha_1 precursor	1,5	2
gi166706889	transcription factor 20 isoform b	1,5	3
gi166706891	transcription factor 20 isoform a	1,5	3
gi34328108	collagen alpha_1(I) chain precursor	1,5	6

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 15 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial entre as linhagens A/J 10 ppm F (A) comparado ao 129P3/J 10 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi170172575	phosphatidylinositol_3_4_5_trisphosphate 5_phosphatase 2	2,0	2
gi124486747	glycogen debranching enzyme	1,7	2
gi172088099	DNA (cytosine_5)_methyltransferase 3B isoform 1	1,7	2

gi172088101	DNA (cytosine_5)_methyltransferase 3B isoform 2	1,7	2
gi172088103	DNA (cytosine_5)_methyltransferase 3B isoform 3	1,7	2
gi172088105	DNA (cytosine_5)_methyltransferase 3B isoform 4	1,7	2
gi172088108	DNA (cytosine_5)_methyltransferase 3B isoform 5	1,7	2
gi222831636	glycine N_acyltransferase_like protein 3	1,7	2
gi29336062	E3 ubiquitin_protein ligase Topors	1,6	2
gi115495457	histone_lysine N_methyltransferase MLL4	1,6	2
gi114052809	inverted formin_2	1,5	2
gi7657389	NADPH oxidase 4	1,5	2
gi52350563	probable G_protein coupled receptor 158 precursor	1,5	2
gi118918400	histone_lysine N_methyltransferase_ H3 lysine_36 and H4 lysine_20 specific	0,5	2
gi309266853	PREDICTED: probable G_protein coupled receptor 112_ partial	0,5	2
gi309271400	PREDICTED: probable G_protein coupled receptor 112_ partial	0,5	2
gi170763496	pericentriolar material 1 protein	0,5	2
gi169808416	spermatogenesis associated glutamate (E)_rich protein 4e	0,5	2
gi46559430	hypothetical protein LOC381714	0,5	2
gi148368992	putative transporter SVOPL	0,4	2
gi6680834	calmodulin	0,4	2
gi254281218	tetratricopeptide repeat protein 23_like	0,4	2
gi154689823	kinesin_like protein KIF24	0,4	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Tabela 16 – Lista de proteínas identificadas com abundância diferencial entre as linhagens 129P3/J 50 ppm F (A) comparado ao A/J 50 ppm F (B)

Nº GI	Proteína	Razão*	Nº Peptídeos Identificados
gi40538842	2__5__phosphodiesterase 12	1,8	2
gi167466274	ankyrin repeat domain_containing protein 32	1,6	2
gi295148098	actin_binding LIM protein 2 isoform 1	1,6	2
gi295148102	actin_binding LIM protein 2 isoform 4	1,6	2
gi117938312	zinc finger protein 40	1,5	2
gi133922586	cell cycle regulator Mat89Bb homolog	0,4	2

* Razão A/B maior ou igual a 0,5 considerou-se a proteína mais abundante no grupo B em relação ao grupo A e menor ou igual a 1,5 considerou-se a proteína menos abundante no grupo B em relação ao grupo A.

Figura 36 – Distribuição de acordo com o processo biológico das proteínas de fêmur com abundância diferencial quando se compararam os grupos controle e tratados com 10 e 50 ppm F para cada linhagem (A/J ou 129 P3/J). n = 8 por grupo.

Figura 37 – Distribuição de acordo com a localização celular das proteínas de fêmur com abundância diferencial quando se compararam os grupos controle e tratados com 10 e 50 ppm F para cada linhagem (A/J ou 129 P3/J). n = 8 por grupo.

Figura 38 – Distribuição de acordo com o processo biológico das proteínas de fêmur identificadas com abundância diferencial quando se compararam as linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8 por grupo.

Figura 39 – Distribuição de acordo com a localização celular das proteínas de fêmur com abundância diferencial quando se compararam as linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. n = 8 por grupo.

5.5.3 Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

O colágeno tipo I foi selecionado para confirmação por Western Blotting do resultado obtido pela análise proteômica quantitativa. Neste experimento foram utilizadas 4 amostras de animais diferentes para cada grupo (figura 40). Foi encontrado um aumento significativo na abundância de colágeno tipo I na linhagem 129P3/J quando comparada à A/J ($F = 9,54$, $p=0.006$), mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F=1,45$, $p=0,262$) e nem interação ($F=0,196$, $p=0,823$) (figura 41 e 42). Vale destacar que a análise proteômica quantitativa identificou diferenças significativas entre as linhagens apenas para o grupo controle.

Figura 40 – SDS-PAGE 12% de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem A/J e 129P3/J utilizadas nos experimentos de Western Blotting. Alíquotas correspondentes a 30 µg dos extratos PBS, G1G2 e E foram aplicadas no gel SDS e as proteínas foram coradas com Coomassie *Blue*. N= 4 animais/grupo

Figura 41 – Imagem representativa de 4 experimentos para validação da diferença de expressão do colágeno tipo I (140 kDa) por Western Blotting, realizados com diferentes amostras de fêmures de camundongos (n=4 animais/grupo).

Figura 42 – Análise de Western Blotting do colágeno tipo I (140 kDa) nas linhagens de camundongos A/J e 129 P3/J em função da concentração de F administrada na água de beber (0, 10 e 50 ppm) por 8 semanas. $n = 4$ animais/grupo. Na análise de densitometria foi atribuído para o grupo A/J controle um valor arbitrário = 1, sendo que os valores para os demais grupos foram calculados considerando o A/J como referência. As barras indicam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as linhagens, para cada tratamento ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

A razão da seleção das duas linhagens utilizadas no presente estudo foi baseada no fato de que a linhagem de camundongos A/J é altamente susceptível à fluorose dentária, apresentando um rápido e severo desenvolvimento da doença quando o animal é exposto ao F, enquanto a linhagem 129P3/J é menos afetada, com baixo índice de fluorose dentária (EVERETT et al. 2002). Em adição, as diferenças fenotípicas e genéticas entre os animais (grau de diferença entre ambos), bem como sua disponibilidade geral como cepas de laboratório normais, também contribuíram para a sua seleção.

6.2 DOSAGEM DE F NO PLASMA E NO FÊMUR

As concentrações de F presentes no plasma e no fêmur na linhagem 129P3/J foram maiores que aquelas presentes nos animais da linhagem A/J para todos os tratamentos, embora essa diferença tenha sido significativa apenas nos grupos tratados com 50 ppm F (tabela 2). Os dados de F encontrados no plasma e no fêmur no presente estudo são consistentes com os dados de excreção e retenção de F encontrados no estudo de Carvalho et al. (2009) onde foi observado que os animais da linhagem 129P3/J tendem a excretar menos F através da urina, o que leva a uma maior retenção deste íon no organismo, consequentemente elevando os níveis encontrados no plasma e no fêmur. Em concordância com o presente estudo, tem sido demonstrado que 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 (EVERETT et al. 2002; MOUSNY et al. 2006). Entretanto, ao contrário do presente estudo, esses estudos não encontraram uma diferença significativa entre as linhagens expostas a altas doses de F (EVERETT et al. 2002; MOUSNY et al. 2006). Carvalho et al. (2009) realizaram um estudo metabólico e demonstraram que os camundongos da linhagem A/J ingerem um volume de cerca de 30-40% maior de água que aquele ingerido pela linhagem 129P3/J. Portanto, nos estudos de Everett et al. (2002) e Mousny et al. (2006), a ausência de diferença significativa na concentração de F presente no osso das duas linhagens quando expostas a altas doses de F pode ter sido devida à ingestão de um maior volume de água, e, consequentemente, de F, pelos animais A/J. Os mecanismos que estariam envolvidos na incorporação diferencial de F entre as linhagens não são conhecidos, mas provavelmente

envolveriam alterações na função renal ou na remodelação óssea da linhagem resistente (MOUSNY et al. 2006).

Ambas as linhagens demonstraram um aumento dose-dependente na concentração de F no plasma em função do tratamento, embora apenas o grupo que recebeu 50 ppm F na água apresentou diferença significativa em relação ao controle e 10 ppm F. Em relação à concentração de F no fêmur, também foi observado um efeito dose-resposta para as duas linhagens em função dos tratamentos. Enquanto essa diferença foi significativa entre todos os grupos de tratamento na linhagem 129P3/J, para a linhagem A/J, apenas o grupo que recebeu 50 ppm F na água mostrou diferença significativa na concentração de F no fêmur em relação aos demais (tabela 2). À semelhança dos resultados no presente estudo, o aumento dose-dependente da concentração de F no fêmur (EVERETT et al. 2002; MOUSNY et al. 2006) e na vértebra lombar (MOUSNY et al. 2006) foi observado em camundongos da linhagem A/J e 129P3/J.

6.3 ANÁLISE DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

A microtomografia computadorizada, técnica não invasiva e não destrutiva, foi empregada para análise da microestrutura óssea.

A densidade mineral óssea (BMD) é definida como a densidade volumétrica da hidroxiapatita (grama de hidroxiapatita/cm³). A BMD pode se referir a duas medidas ligeiramente diferentes: densidade do volume de osso mais o tecido mole, como no osso esponjoso, ou densidade do volume do tecido ósseo calcificado, como no osso cortical (CTANALYSER 2008). Existem evidências na literatura de que o tratamento com F pode aumentar a densidade mineral no osso esponjoso, mas diminuir a BMD no osso cortical (DEQUEKER; DECLERCK 1993; RIGGS et al. 1990). Apesar de vários estudos relatarem um aumento da BMD após exposição ao F (BRUN; PERA; RIGALLI 2010; GROBLER et al. 2009), no presente estudo, os valores da BMD tanto a para região trabecular da tíbia e da vértebra lombar (L4), como para a cortical do fêmur não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos para ambas as linhagens. Por outro lado, foi encontrado um aumento significativo nos valores da densidade mineral do osso na região trabecular da tíbia na linhagem 129P3/J, quando comparada com a linhagem A/J, para todos os tratamentos. Embora os valores para BMD trabecular da vértebra lombar (L4) e BMD cortical do fêmur tenham apresentado a mesma tendência, foi observada uma diferença significativa na BMD cortical do fêmur apenas no grupo controle (Figura 22). À semelhança

destes resultados, foram relatados valores maiores de BMD cortical (fêmur) e trabecular (quarta vértebra lombar) na linhagem 129P3/J em comparação com a linhagem A/J, independente da concentração de F, além da ausência de diferença significativa entre os tratamentos para cada linhagem (MOUSNY et al. 2006). Esses dados indicam que existe uma diferença na BMD trabecular e cortical inerente às linhagens estudadas.

Além da análise da densidade mineral óssea, foi realizada também a análise morfométrica por micro-CT, utilizando a reconstrução 2D das seções transversais da amostra (análise 2D) ou a reconstrução 3D do volume da amostra (análise 3D) (HILDEBRAND et al. 1999).

Na análise morfométrica 2D da região cortical do fêmur foram medidos os seguintes parâmetros: B.Ar (área média do osso nas seções transversais da amostra), B.Pm (perímetro médio do osso nas seções transversais da amostra), T.Pm (perímetro médio do tecido total nas seções transversais da amostra) e o MMI (média do momento polar de inércia). No presente estudo, a linhagem 129P3/J apresentou maior área óssea cortical em comparação com a linhagem A/J, uma vez que os valores de B.Ar, B.Pm, T.Ar, T.Pm mostraram uma diferença significativa entre as linhagens independente do tratamento, exceto para os valores do grupo controle do índice B.Ar (Figura 22). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa em função do tratamento para cada linhagem.

Em adição, foram encontrados valores significativamente maiores de MMI no fêmur da linhagem 129P3/J em relação à linhagem A/J para todos os tratamentos (Figura 22). O momento de inércia polar é a quantidade estimada de dois fatores, a área e o comprimento do osso, na carga torsional. Sabendo-se que a área e o comprimento ósseo também afetam na dureza e na força de torção, quanto mais amplo é o momento de inércia polar, mais forte e mais rígido é o osso (GONÇALVES 2000). Portanto, baseado nos valores de MMI encontrados neste estudo, a linhagem 129P3/J provavelmente apresentaria uma maior resistência à torção no fêmur em relação à linhagem A/J. Em concordância, fêmures da linhagem 129P3/J submetidos a testes mecânicos mostraram uma maior rigidez quando comparados com a linhagem A/J (MOUSNY et al. 2006).

Para a análise 3D, a medida de todos os parâmetros, incluindo os índices primários, é realizada diretamente no volume reconstruído da amostra óssea. Os índices primários, como a área da superfície óssea da amostra (BS), volume ósseo da amostra (BV) e volume total da amostra (TV), são utilizados para quantificar a microestrutura óssea trabecular. Entretanto, para comparação entre amostras com diferentes dimensões utilizam-se índices normalizados, como BV/TV (razão entre o volume ósseo trabecular e o volume total da amostra), BS/TV

(razão entre a superfície óssea trabecular e o volume total da amostra) e BS/BV (razão entre a superfície óssea trabecular e o volume ósseo trabecular) (HILDEBRAND et al. 1999).

O BV/TV é um índice útil para avaliar se existe diferença relativa na densidade de volume ósseo entre as linhagens para cada tratamento ou entre os tratamentos em cada linhagem. No presente estudo, os valores de BV/TV e BS/TV foram maiores na linhagem 129P3/J quando comparada com a linhagem A/J, tanto para a tíbia como para a vértebra (Figuras 20 e 21), sugerindo uma diferença na densidade de volume ósseo entre as linhagens. Enquanto na vértebra essa diferença foi significativa em todos os grupos tratados, na tíbia foi significativa apenas no grupo tratado com 10 ppm F (Figuras 20 e 21). Resultado semelhante foi encontrado na vértebra torácica no estudo de Mousny et al. (2008), no qual a linhagem 129P3/J apresentou valores de BV/TV maiores em relação à linhagem A/J, para todos os tratamentos (0, 25, 50 e 100 ppm F). Entretanto, assim como no presente estudo, não foi encontrada uma diferença significativa entre os tratamentos para ambas as linhagens.

O volume e a superfície do osso são considerados medidas básicas para a caracterização de objetos tridimensionais, como o osso trabecular. Enquanto a superfície delineia o limite entre o osso e o espaço medular (BS), o volume delimitado pela superfície corresponde ao volume do osso (BV). A partir dessas medidas, é possível determinar a superfície óssea específica (BS/BV), uma medida da superfície óssea por unidade de volume ósseo em uma determinada amostra. Em biologia óssea, este índice pode ser usado para fornecer uma medida da quantidade de células ósseas de revestimento que estão cobrindo um dado volume ósseo (MICROCTWORLD 2011). No presente estudo, a linhagem A/J apresentou uma maior superfície óssea específica (BS/BV) na vértebra quando comparada com a linhagem 129P3/J para todos os tratamentos, sendo que essa diferença foi significativa apenas nos grupos tratados com 10 e 50 ppm F (Figura 21). Entretanto, os valores de BS/BV na tíbia não apresentaram diferenças significativas nem entre as linhagens e nem entre os tratamentos (Figura 20).

Além dos indicadores relacionados à quantidade óssea, há os indicadores estruturais que servem para avaliar a estrutura trabecular. O número trabecular (Tb.N) é o inverso da distância entre os eixos médios das trabéculas ósseas e também expressa a densidade trabecular. A espessura média das trabéculas (Tb.Th) é determinada utilizando-se esferas cujo diâmetro deve preencher a estrutura da trabécula (figura 43A) e o espaço trabecular (Tb.Sp) é a espessura média das cavidades que contém a medula óssea (Figura 43B) (BOUXSEIN et al. 2010).

Figura 43 – Representação esquemática do algoritmo usado na análise 3D para calcular a espessura (A) e separação trabecular (B) (BOUXSEIN et al. 2010).

No presente estudo, não houve diferença significativa nos valores de Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N na tíbia e na vértebra entre os tratamentos, tanto para linhagem A/J como 129P3/J. Análise histomorfométrica em cortes histológicos de vértebra lombar (L3) de ratos que receberam 0, 5, 10 ou 50 ppm F na água de beber, também não apresentaram diferenças significativas nos valores de Tb.N ou Tb.Sp em função do tratamento com F (TURNER et al. 1995). Entre as linhagens, enquanto os valores de Tb.N da tíbia e da vértebra lombar (L4) e Tb.Th da vértebra lombar (L4) foram maiores na linhagem 129P3/J em comparação com a A/J, um resultado oposto foi encontrado para os valores de Tb.Sp (Figuras 20 e 21). Em concordância com estes resultados, uma influência genética na resposta do tecido ósseo esponjoso também foi observada em um estudo que comparou tíbias obtidas de três diferentes linhagens de camundongos (C57BL/6J, BALB/cByJ e C3H/HeJ) submetidos a estímulos mecânicos catabólicos e anabólicos (JUDEX; DONAHUE; RUBIN 2002).

Além dos indicadores relacionados à quantidade óssea e os estruturais, existem aqueles que são relacionados às características do arranjo espacial do osso esponjoso, ou à conectividade trabecular, como o Tb.Pf (fator padrão de osso trabecular). É um índice relativo da convexidade e concavidade da superfície óssea considerando que convexidade representa estruturas desconectadas isoladas e concavidade representa conectividade das estruturas (HAHN et al. 1992). Portanto, um valor mais alto de Tb.Pf implica em um baixo grau de conectividade superficial da estrutura trabecular, enquanto que um baixo valor de Tb.Pf indica uma estrutura com alto grau de conectividade superficial das trabéculas. No presente estudo, não foi observada diferença significativa nos valores de Tb.Pf entre os tratamentos para a tíbia e vértebra lombar (L4) e nem entre as linhagens para a tíbia. A

terapia com F tem demonstrado aumentar a espessura trabecular, sem aumentar o número de trabéculas e nem alterar a conectividade (AARON; DE VERNEJOUL; KANIS 1991). Para a vértebra lombar (L4), os valores de Tb.Pf foram maiores na linhagem A/J comparada com a 129P3/J para todos os tratamentos, sendo que essa diferença foi significativa apenas para os grupos tratados com 10 e 50 ppm F.

Analizados conjuntamente, esses resultados sugerem que a análise histomorfométrica da região trabecular da vértebra lombar (L4) da linhagem A/J apresentou um menor número de trabéculas, com menor espessura, maior espaçamento e menor conectividade trabecular quando comparada com a linhagem 129P3/J, independente do tratamento (figura 21). Em concordância, tem sido demonstrado que vértebras lombares da linhagem A/J submetidas a testes mecânicos mostraram-se menos resistentes quando comparados com a linhagem 129P3/J (MOUSNY et al. 2006).

6.4 TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MINERAL APPPOSITION RATE – MAR)

Em adição aos achados obtidos a partir de parâmetros histomorfométricos estáticos, foram utilizados marcadores ósseos fluorescentes para investigar o processo dinâmico de formação óssea. Para avaliar a taxa de aposição mineral no fêmur de camundongo, foram administrados dois diferentes fluorocromos, calceína e alizarina complexona, com um intervalo de 9 dias.

Comparando-se as linhagens, baseado nos valores obtidos para MAR, observou-se que a linhagem 129P3/J apresentou uma maior neoformação óssea do que a linhagem A/J para todos os tratamentos, embora essa diferença na taxa de aposição mineral tenha sido significativa apenas no grupo tratado com 50 ppm F (Figura 23). Embora a diferença entre as linhagens não tenha sido significativa para os grupos tratados com F, os valores para BMD de fêmur apresentaram a mesma tendência observada para MAR (Figuras 22 e 23). Em concordância como os achados obtidos para MAR, foram encontrados valores significativamente maiores para área do osso cortical (B.Ar) na linhagem 129P/3 em relação à linhagem A/J nos grupos tratados com 10 e 50 ppm F (Figura 22).

Entre os tratamentos, foi observado um efeito dose-resposta na taxa de mineralização óssea para ambas as linhagens, entretanto apenas a linhagem 129P3/J apresentou uma diferença significativa, quando se comparou o grupo tratado com 50 ppm F com os demais grupos (Figura 23). Sabendo-se que o F geralmente não é incorporado no osso completamente mineralizado (osso maduro), e acumula-se somente no osso formado durante

o período de exposição ao F (BOIVIN; MEUNIER 1993), uma maior taxa de aposição mineral nos fêmures da linhagem 129P3/J tratados com 50 ppm F quando comparados com o controle e o grupo 10 ppmF é consistente com uma maior concentração de F nos fêmures destes animais em comparação com os demais grupos. Em adição, a administração de NaF com liberação lenta em pacientes com osteoporose resultou em um aumento significativo nos valores de MAR no osso cortical, sem afetar outros índices histomorfométricos no osso cortical, como também nos valores de BMD, Tb.Th, MAR e na conectividade nos osso esponjoso, consistentes com um efeito anabólico do F no osso (ZERWEKH et al. 1997). A administração por via intraperitoneal de 5 mg/Kg/dia de Fenitoína combinada com 50 ppm F pela água de beber em ratos machos adultos por 36 dias levou a um aumento em vários parâmetros de medida de formação óssea, como os níveis séricos da osteocalcina e atividade da ALP, MAR, taxa de formação óssea, estimulando a formação e o aumento do volume ósseo (OHTA et al. 1995).

6.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FÊMUR DE CAMUNDONGO DA LINHAGEM 129P3/J

Para o presente estudo, foi escolhido para a extração protéica um método descrito por Domenicucci et al. (1988) modificado. Primeiramente, é feita uma extração com tampão de PBS, para remover as proteínas sanguíneas da medula óssea que estão fracamente ligadas ao osso. Na segunda extração com tampão guanidina HCl, espera-se remover as proteínas ligadas de forma não-covalente ao tecido mole remanescente, incluindo osteoide. A terceira extração com tampão de EDTA tem como objetivo retirar as proteínas ligadas ao mineral. E para finalizar, repete-se a extração com o tampão de guanidina HCl para remover as proteínas remanescentes que ficaram ligadas na matriz de colágeno exposta.

Para caracterização das proteínas presentes no fêmur, foram analisados separadamente os extratos de proteínas obtidos de camundongos da linhagem 129P3/J. Para cada extrato foram realizados géis SDS, catiônico e aniônico, além do mapa proteômico. Esta linhagem foi escolhida por apresentar uma característica peculiar de resistência aos efeitos do F nos tecidos mineralizados (CARVALHO et al. 2009; EVERETT et al. 2002; MOUSNY et al. 2006; MOUSNY et al. 2008) e pela ausência de estudos proteômicos prévios utilizando esses animais.

Ao contrário do SDS-PAGE, a eletroforese em gel catiônico e aniônico é realizada sob condições não-desnaturantes, ou seja, os géis são preparados na ausência de SDS e agentes

redutores que contêm tióis, como DTT ou β -mercaptoetanol e as amostras não são fervidas antes de serem aplicadas no gel. Empregando esses métodos eletroforéticos, não foi possível obter uma separação satisfatória. Para o extrato G1G2, como os géis catiônico e aniônico estão indicados para amostras nativas, o pequeno número de bandas poderia ser explicado pelo fato das proteínas nesse extrato encontrarem-se desnaturadas pela ação da guanidina HCl. A guanidina HCl, altera a solubilidade e estrutura das proteínas, aumentando a solubilidade polar das moléculas pelas ligações de hidrogênio com os grupos das cadeias laterais dos aminoácidos e das ligações peptídicas (GIANNI; BRUNORI; TRAVAGLINI-ALLOCAPELLI 2001; YAN et al. 1998). Além de aumentar a solubilidade de moléculas hidrofóbicas, a guanidina HCl tem uma ação desnaturante promovendo o desdobramento das proteínas e alterando sua estrutura tridimensional. Consequentemente, algumas proteínas podem ser irreversivelmente alteradas após interação com uma solução de guanidina HCl (ARAKAWA et al. 1994; NEURATH; ERICKSON; COOPER 1942). O agente desnaturante funciona também como uma barreira para agregação durante o renovelamento da proteína, devido ao efeito caotrópico do desnaturante e as interações entre o desnaturante e a proteína. Entretanto, à medida que a concentração do desnaturante é reduzida, sua ação como barreira para evitar a agregação também é reduzida, por isso a agregação de proteínas é comumente observada durante o redobramento proteico (HO et al. 2003). Portanto, após a precipitação com etanol 90% do extrato de proteínas G1G2, houve uma redução da concentração de guanidina HCl, promovendo uma agregação das proteínas. Como o tampão de amostra catiônico não contém agentes desnaturantes (SDS ou agentes redutores), provavelmente não foi suficiente para ressolubilizar as proteínas precipitadas e agregadas para permitir sua entrada no gel. Em adição, as moléculas de guanidina HCl são carregadas positivamente (STEL'MAH; BAZARON; MOGNONOV 2009), o que poderia contribuir para migração das proteínas no gel catiônico (proteínas migram em direção ao pólo negativo) e interferir no gel aniônico (proteínas migram em direção ao pólo positivo).

Para testar essa hipótese, foram aplicados 10 e 20 μ g do extrato G1G2 (sem remover a guanidina HCl com etanol 90%.) nos géis catiônico e aniônico. Para compensar o aumento da condutividade, o tampão de 4M de guanidina HCl (no mesmo volume utilizado para a amostra) foi concentrado no *speed vac* e ressuspenso com o tampão de amostra catiônico ou aniônico e aplicado em todos os poços restantes. Além disso, a corrida foi realizada a 60 V até que o azul de bromofenol atingisse a borda inferior do gel, conforme descrito na seção 4.9.2. para o gel catiônico e 4.9.3. para o gel aniônico. As proteínas nos géis catiônico e aniônico foram coradas com Coomassie Blue e prata (Figura 44).

Esse resultado demonstrou que a carga positiva da guanidina HCl alterou a migração das proteínas. Como a polaridade está invertida na eletroforese em gel catiônico, houve um aumento no número de bandas visíveis, sugerindo que a guanidina HCl favoreceu a migração proteica em direção ao ânodo. Por outro lado, o gel aniônico não mostrou bandas visíveis e a presença de manchas escuras no *stacking* gel (gel de separação) indica que as proteínas não conseguiram penetrar no gel de corrida. Provavelmente o excesso de guanidina HCl carregado positivamente na amostra pode ter interferido na migração das proteínas em direção ao cátodo.

Figura 44 – Géis de poliacrilamida catiônico (A e B) e aniônico (C e D) do extrato G1G2 de proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J. Aliquotas correspondentes a 10 µg foram aplicadas nos poços 1 e 3, e a 20 µg nos poços 2 e 4. As proteínas dos géis catiônico e aniônico foram coradas com *Coomassie Blue* (A e C) e prata (B e D).

Os extratos obtidos com o tampão de PBS, EDTA e G1G2 apresentaram uma separação pobre com poucas bandas tanto para o gel aniônico como para o gel catiônico. Em relação à separação das proteínas por SDS-PAGE foram visualizadas bandas com pesos moleculares variando de 250 a 10 kDa, sendo que o extrato PBS apresentou o maior número de bandas, seguido do extrato obtido com tampão de EDTA. O extrato G1G2 foi o que apresentou o menor número de bandas quando comparado com os demais grupos (Figura 30). Apesar do extrato PBS ter apresentado a concentração de proteína mais alta e o maior número de bandas no gel SDS, apenas um número razoável de proteínas foi identificado para esse extrato. Uma possível explicação seria a presença de proteínas altamente abundantes, que poderiam impossibilitar a identificação das menos abundantes. Baseado nestes resultados, optou-se por excluir a necessidade de uma separação cromatográfica prévia ao LC-ESI- MS/MS.

Para extração das proteínas de fêmur de camundongo da linhagem 129P3/J foi avaliado um método de extração sequencial combinando três soluções tampão diferentes: tampão PBS (pH 7,4), tampão 4 M guanidina HCl/50 mM tris HCl (pH 7,4) e tampão 0,5 M EDTA/50 mM tris HCl (pH 7,4). Um baixo número de proteínas (0,7%), em comum entre os extratos obtidos com PBS e EDTA era esperado, uma vez que o primeiro extrato é constituído em sua maioria por proteínas da medula óssea e o segundo por proteínas ligadas ao mineral. Os extratos G1G2 e E apresentaram 26 proteínas em comum (8,8%), como vários tipos de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas da matriz óssea. Apenas 12 proteínas (4,1%) foram identificadas nos três extratos, e esse pequeno número indica que os passos nesse método foram complementares, tornando esse método de extração sequencial eficiente para ser empregado na análise proteômica de tecido ósseo. Em adição, a identificação de proteínas de membrana comprova a eficiência do método de extração empregado no presente estudo, uma vez que a extração de proteínas de membrana, pela dificuldade de solubilização e separação, continua a ser um grande desafio para análise proteômica.

Dentre as proteínas presentes nos três extratos estavam a *serum albumin* e diversos tipos de histonas (tabela 4, 5 e 6). No tecido ósseo, a proliferação de osteoblastos inicialmente expressa genes associados com o ciclo celular (como histonas e c-fos) e com a síntese de proteínas da matriz extracelular (como o colágeno tipo I) e em seguida genes envolvidos na maturação e organização da matriz extracelular (como a fosfatase alcalina) e finalmente genes que facilitam a mineralização da matriz extracelular (como a osteocalcina e osteopontina) (DWORETZKY et al. 1990).

Além da *serum albumin*, foram identificadas outras proteínas derivadas do soro, como a *hemoglobin* (extratos G1G2 e PBS) e *alpha-2-HS-glycoprotein* (extratos EDTAe G1G2). Em concordância com esses achados, a extração com EDTA de proteínas de osso cortical humano também revelou a presença de proteínas plasmáticas, dentre elas a albumina (MBUYI et al. 1982). Em um estudo realizado em coelhos jovens, enquanto a maioria da albumina extravascular nos tecidos mole é permutável com a albumina plasmática, no osso apenas a fração que está no fluido do tecido é prontamente permutável; o restante encontra-se mais permanentemente incorporado na matriz mineralizada (OWEN; TRIFFITT 1976). A descalcificação de áreas calcificadas em lesões ateroscleróticas demonstrou a presença de albumina formando um complexo proteico juntamente com uma proteína de baixo peso molecular contendo ácido gama-carboxiglutâmico (KEELEY; SITARZ 1983). Além da *serum albumin*, proteínas plasmáticas como a *alpha-2-HS-glycoprotein* e a *hemoglobin* também foram identificadas em osso parietal de cães adultos (JIANG et al. 2007). Evidências têm

demonstrado que a concentração da *alpha-2-HS-glycoprotein* no osso e na dentina é maior do que a de outras proteínas plasmáticas (MBUYI et al. 1982; TRIFFITT 1976). Parte da *alpha-2-HS-glycoprotein* produzida no fígado acumula-se no osso, o qual serve como reservatório para essa glicoproteína que é liberada durante o processo de remodelação óssea (TRIFFITT 1976). Entre as diversas funções atribuídas a *alpha-2-HS-glycoprotein* está a sua participação na inibição da mineralização óssea (DICKSON; POOLE; VEIS 1975; SCHINKE et al. 1996). Foi demonstrado que camundongos deficientes de *alpha-2-HS-glycoprotein* podem desenvolver microcalcificações ectópicas em tecidos mole, suportando a teoria de que essa proteína pode funcionar como um inibidor do crescimento de cristal de apatita *in vivo* (JAHNEN-DECHENT et al. 1997; TRIFFITT 1976). Em adição, alterações na concentração da *alpha-2-HS-glycoprotein* têm sido relatadas em doenças ósseas, com na doença de Page (ASHTON; SMITH 1980).

Proteínas específicas do tecido ósseo também foram identificadas, sendo que a maioria foi encontrada nos extratos G1G2 e/ou E. O colágeno corresponde a aproximadamente 90% do material orgânico da matriz óssea, além de uma pequena, mas importante concentração de proteínas não-colagênicas que participam do processo de mineralização (NYMAN; REYES; WANG 2005). Como esperado, além do *collagen alpha-1(I) chain* e *collagen alpha-2 (I) chain*, foram identificados o *collagen alpha-1(II) chain*, *collagen alpha-2(V) chain*, *collagen alpha-1(VI) chain*, *collagen alpha-2(VI) chain*, *collagen alpha-1(XI) chain*, *collagen alpha-2(XI) chain* e *collagen alpha-1(XII) chain*. No osso, dentina, cemento as fibras de colágeno formam uma rede compondo a estrutura macromolecular da matriz que define a forma e a estrutura do compartimento de mineralização (VEIS 1993).

Além dos diversos tipos de colágeno foram identificadas várias proteínas não colagênicas presentes na matriz óssea, como proteoglicanas (*decorin*, *biglycan*, *fibromodulin*, *mimecan* (*osteoglycin*), *aggrecan core protein*, *basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein* e *prolargin*), glicoproteínas (*osteonectin* (SPARC), *osteopontin*, *bone sialoprotein 2*, *fibronectin*, *dentin matrix acidic phosphoprotein 1*, *asporin*, *tetranectin*), proteínas contendo gla (*matrix gla protein*, *vitamin K-dependent protein S*), proteínas associadas a reabsorção óssea (*tartrate-resistant acid phosphatase type 5*) e degradação da matriz óssea (*collagenase 3* e *cathepsin G*), fatores de crescimento (*insulin-like growth factor binding protein 5*).

Glicoproteínas na matriz extracelular (ECM) óssea que são produzidas em diferentes estágios da maturação dos osteoblastos, como a *osteonectin*, *fibronectin*, *osteopontin* e *bone sialoprotein* (BSP) foram identificadas nos extratos G1G2 e/ou E. A *osteonectin* (SPARC)

possui dois domínios de ligação com o cálcio e age regulando os processos dependentes de cálcio na ECM (ENGEL et al. 1987). É capaz de modular as interações célula/ECM e influencia a resposta celular aos fatores de crescimento, contribuindo para processos fisiológicos envolvendo alterações na ECM e mobilização celular. De fato, a lista de processos biológicos afetados pelo SPARC incluem cicatrização de feridas, progressão de tumores, fibrose, angiogênese e formação óssea (RIVERA; BRADSHAW; BREKKEN 2011). No osso, a SPARC se liga seletivamente a hidroxiapatita e ao colágeno, e esse complexo osteonectina-colágeno é capaz de nuclear a fase de deposição mineral para formação da apatita (TERMINE et al. 1981).

Proteínas contendo Gla identificadas no extrato E, como a *Matrix Gla protein* (MGP) e *vitamin K-dependent protein*, participam na regulação do processo de mineralização do osso e da cartilagem durante o desenvolvimento (FETEIH; TASSINARI; LIAN 1990; YAGAMI et al. 1999). O osso tem altos níveis de duas proteínas dependentes de vitamina K contendo o aminoácido Gla (ácido gama-carboxiglutâmico), a *osteocalcin* (BGP – *Bone Gla Protein*) e a MGP. Enquanto a primeira é sintetizada apenas nos tecidos calcificados, a segunda é sintetizada nos tecidos calcificados, cartilagem e tecidos moles (PRICE 1989). Tem sido demonstrado que a MGP age inibindo a formação óssea, evitando o processo de calcificação de artérias e cartilagens *in vivo* (SHANAHAN et al. 1998).

Foram identificadas também a *fibronectin* (extrato G1G2), *thrombospondin-1* (extratos G1G2 e E), *vitronectin* (extrato G1G2 e E), *osteopontin* (extrato E) e *bone sialoprotein 2* (extrato E), glicoproteínas da ECM óssea que contêm RGD e estão relacionadas com a nucleação do cristal de hidroxiapatita. A sequência de tripeptídeos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) interage com as integrinas da superfície celular, mediando a adesão celular (DONLEY; FITZPATRICK 1998). A *osteopontin*, também conhecida como *bone sialoprotein 1*, foi identificada pela primeira vez na ECM óssea através de análises bioquímicas em extratos de EDTA por Franzén e Heinegård (1985). É uma glicoproteína ácida fosforilada com multidomínio sintetizada por muitos tipos de células e envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo adesão celular (REINHOLT et al. 1990), angiogênese (ASOU et al. 2001), apoptose, respostas inflamatórias (DENHARDT et al. 2001) e metástase de tumor (WEBER 2011). A *osteopontin* compreende aproximadamente 2% das proteínas não colagênicas no osso (MCKEE; NINCI 1996). Na medula óssea, a fonte mais proeminente de *osteopontin* são os osteoblastos, mas os pré-osteoblastos, osteócitos e células hematopoiéticas também sintetizam essa glicoproteína (MARK et al. 1987; MARK et al. 1988; SWANSON; NOMURA; HOGAN 1989). Acredita-se que é codificada por um

único gene (SMITH; DENHARDT 1987; SWANSON; NOMURA; HOGAN 1989), mas através da fosforilação, glicosilação e clivagens proteolíticas, diferentes massas moleculares da *osteopontin* podem ser detectadas, variando de 25 a 75 kDa. Os diferentes efeitos induzidos pela *osteopontin* são atribuídos às suas variadas formas, múltiplos receptores e sítios de ligação (DENHARDT; GUO 1993). Por possuir a sequência de RGD com especificidade para se ligar a superfícies das integrinas, é capaz de mediar adesões celulares (HAYLOCK; NILSSON 2006). Além de receptores na superfície celular, essa glicoproteína pode se ligar às proteínas da ECM, como fibronectina e colágeno (ALFORD; HANKENSON 2006). Também pode se ligar ao cálcio e tem sido reportado que é capaz de modular tanto a mineralização como a reabsorção óssea, provavelmente pelas vias de sinalização Runx2, 1,25-dihidroxivitamina D3 e Notch, as quais regulam a *osteopontin* nos osteoblastos e consequentemente a remodelação óssea (SHEN; CHRISTAKOS 2005). Em um modelo cirúrgico de reparo ósseo em ratos, a *osteopontin* secretada por macrófagos envolvendo uma resposta tipicamente inflamatória, devido às suas propriedades de ligação à hidroxiapatita por conter diversos sítios de fosforilação de serina e um prolongamento de nove resíduos de ácido aspártico carregado negativamente que se liga ao cálcio, ligou-se às superfícies mineralizadas recentemente expostas e às margens do defeito ósseo (MCKEE; PEDRAZA; KAARTINEN 2011). Assim como a *osteopontin*, a *bone sialoprotein 2* (BSP II) contém a sequência RGD, mas diferente da primeira, é encontrada quase que exclusivamente em tecidos mineralizados (BIANCO et al. 1991). Devido à sua propriedade estrutural que confere um alto potencial de ligação ao cálcio, a BSP II está relacionada com o início da formação do cristal de hidroxiapatita durante a neoformação óssea (KASUGAI; NAGATA; SODEK 1992). A expressão do gene da BSP II, a qual é induzida em osteoblastos recém-formados, é super-regulada por hormônios e citocinas que promovem a formação óssea, como o TGF- β (GANSS; KIM; SODEK 1999).

As proteoglicanas pequenas ricas em leucina (PPRL) formam uma família composta por 17 membros divididos em cinco classes (SCHAEFER; IOZZO 2008). No presente estudo, foram identificadas *decorin* e *biglycan*, pertencentes à classe I, a *fibromodulin* e *prolargin*, pertencente à classe II e a *mimacan* (*osteoglycin*), pertencente à classe III. *Decorin* e *biglycan* são altamente expressos na matriz óssea e existem evidências que demonstram que as PPRLs são capazes de influenciar a diferenciação e proliferação das células, além de atuarem regulando a deposição mineral e a morfologia do cristal em crescimento (BIANCO et al. 1991; TAKEUCHI; KODAMA; MATSUMOTO 1994; WADDINGTON et al. 2003). A natureza da cadeia de GAG (condroitin ou dermatan-sulfato) conjugada à proteína e o

momento de sua expressão poderiam determinar as funções dessas proteoglicanas durante a formação óssea (WADDINGTON et al. 2003). A *fibromodulin* e a *osteoglycin* exercem um papel na fibrilogênese do colágeno (CHEN et al. 2010; TASHEVA et al. 2002).

6.6 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA

A análise dos dados obtidos com LC-ESI MS/MS empregando o SIEVE software 1.3 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) revelou diferenças na abundância de proteínas entre os tratamentos para cada linhagem e entre as linhagens para cada tratamento.

Sodium/hydrogen exchanger 5 (NHA) e *sodium channel protein type 10 subunit alpha* (PN3) foram encontrados superexpressos nos grupos 129P3/J tratados com F em relação ao controle (razão controle / 10 ou 50 ppm F = 0,5 para ambas as proteínas) (Tabelas 11 e 12) e entre as linhagens apenas no grupo controle (razão 129P3/J / A/J = 1,5 e 1,8, respectivamente) (Tabela 14). Esses achados sugerem que o F em baixas e altas doses induziu um aumento na abundância do trocador de sódio e hidrogênio e no canal de sódio. PN3 é um canal de sódio resistente a tetrodoxina, também conhecido como *Voltage-gated sodium channel subunit alpha Na(v)1.8*. Foi demonstrado que a adição de F em solução intracelular, ligado ou não ao alumínio, aumentou a corrente de Na⁺ no canal Na(v)1.8 da raiz ganglionar dorsal de neurônios, pela ativação da proteína G (SAAB; CUMMINS; WAXMAN 2003). NHA, por sua vez, está envolvido na regulação do pH, eliminando ácidos gerados pelo metabolismo celular ativo e atuando na reabsorção óssea que depende da acidificação extracelular pela secreção vetorial de H⁺ pelos osteoclastos. Além dos mecanismos H⁺-ATPase vacuolar e o trocador Cl⁻/H⁺ (CLC7) envolvidos na reabsorção óssea, os osteoclastos também expressam trocadores Na⁺/H⁺ (NHA) (BLAIR et al. 1989; KORNAK et al. 2001; RAVESLOOT et al. 1995). No presente estudo o F induziu um aumento na abundância do trocador de Na⁺/H⁺ (NHA), sugerindo uma maior atividade osteoclástica nos grupos 10 e 50 ppmF na linhagem 129P3/J em relação ao controle. O mesmo padrão foi observado para a NOX 4, enzima relacionada com a ativação osteoclástica, discutida abaixo. Estudos recentes têm relatado um elevado nível de expressão de *sodium/hydrogen exchanger NHA2* durante a diferenciação de osteoclastos induzida pela RANKL (BATTAGLINO et al. 2008; HA et al. 2008). Em um estudo *in vivo* realizado por Hofstetter et al.(2010), apesar de ocorrer uma super expressão do NHA2 durante a diferenciação de osteoclastos, não foram encontradas diferenças nos parâmetros estruturais ósseos, analisados por micro-CT, entre camundongos NHA2 deficientes e os selvagens. Em adição, a estimulação de células de medula óssea

isoladas de camundongos selvagens e NHA2 deficientes não demonstraram diferenças no desenvolvimento e atividade dos osteoclastos. Portanto, embora ocorra um aumento da expressão do NHA2, sua presença não parece ser indispensável para a diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro* (HOFSTETTER et al. 2010)

No presente estudo, a proteína *exportin 2* que realiza o transporte de proteínas entre o núcleo e o citoplasma foi encontrada superexpressa no grupo A/J 10 ppm F em relação ao controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) (Tabela 8), no A/J controle em relação ao tratado com 50 ppm F (razão controle / 50 ppm F = 1,5) (Tabela 9) e entre as linhagens no grupo controle (129P3/J controle / A/J controle = 1,6) (Tabela 14). A *exportin 2* é responsável por mediar a re-exportação da *importin-alpha* do núcleo para o citoplasma após os substratos importados terem sido liberados pela *importin-alpha* no nucleoplasma e exerce um papel crítico no desenvolvimento embrionário (BERA et al. 2001). Apesar de não existirem relatos na literatura do seu papel específico em células ósseas maduras, outro fator de transporte nuclear, *exportin 1*, está envolvido no transporte de fatores de transcrição essenciais para formação óssea pelos osteoblastos e condrócitos (KOMORI et al. 1997). O fósforo inorgânico (Pi) em concentração alta mas fisiológica, estimulou rapidamente a exportação nuclear do fator de transcrição Runx2/Cbfa1 pela via CRM1/*exportin 1* em células ósseas (FUJITA et al. 2001). No presente estudo, a identificação da *exportin 2* no tecido ósseo maduro é um indício que essa proteína transportadora também pode estar envolvida no processo de formação óssea.

Foram encontradas com alteração na abundância, proteínas ligantes do p53 envolvidas no crescimento e proliferação celular e apoptose que regulam p53/TP53 através da degradação dependente de ubiquitina (LIN et al. 2005). A *E3 ubiquitin-protein ligase Topors* ou *tumor suppressor p53-binding protein 3* (p53BP3) foi encontrada aumentada no grupo 129P3/J tratado com 10 ppm F comparado com o controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) (tabela 11) e entre as linhagens nos grupos controle e tratado com 10 ppm F (razão 129P3/J / A/J controle = 1,9 e razão A/J / 129P3/J 10 ppm F = 1,6) (Tabelas 14 e 15, respectivamente). Já o *tumor suppressor p53-binding protein 1* (p53BP1) foi encontrado aumentado no grupo 129P3/J tratado com 50 ppm F comparado com o controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5). A proteína *tumor supressor p53* (TP53) se liga ao DNA e ativa a transcrição de genes alvos que contêm sítios de ligação com p53. Foi demonstrada uma atividade transcricional do p53 na diferenciação de osteoblastos, através da regulação da expressão do gene da *osteocalcin* (SCHWARTZ et al. 1999). Outra ligase dependente de ubiquitina, a *E3 ubiquitin-protein ligase RLIM*, foi encontrada aumentada no grupo 129P3/J tratado com 50 ppm F comparado

com o controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5) (Tabela 12). RLIM pode se ligar diretamente ao Smurf2, aumentando a responsividade das células U2OS de osteossarcoma ao TGF- β (HUANG et al. 2011). No presente estudo, uma maior abundância da RLIM nos animais da linhagem 129P3/J tratados com 50 ppm F em relação ao controle sugere uma possível ação indireta do F, funcionando como um regulador positivo na via de sinalização TGF- β que está envolvido na apoptose de osteoclastos e no bloqueio da reabsorção óssea (HUGHES et al. 1996).

Chromodomain_helicase_DNA_binding protein 7 (CHD7) foi encontrada superexpressa nos grupos 129P3/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5) (Tabela 12), A/J tratado com 10 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,4) (Tabela 8) e entre as linhagens no grupo controle (razão 129P3/J / A/J controle = 1,6) (Tabela 14) e a *Chromodomain_helicase_DNA_binding protein 4* (CHD4) foi encontrada super expressa nos grupos 129P3/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,4). A CHD exerce um papel central no desenvolvimento embrionário através da remodelação da cromatina e a consequente regulação da expressão do gene (FOPPIANI; MAFFE; FORZANO 2010). Outro membro da família CHD, *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9* (CHD9) é expresso em células progenitoras durante o desenvolvimento e também no osso maduro e parece mediar a resposta transcricional dos hormônios que coordenam a função osteoblástica (MAROM et al. 2006). O CHD9 interage com a região promotora rica em pares A/T de genes de proteínas que exercem papel importante na maturação dos osteoblastos como a *osteocalcin* (SHUR; SOLOMON; BENAYAHU 2006).

A *EMILIN 1 precursor*, outra proteína que está relacionada com o desenvolvimento e início da organogênese (BRAGHETTA et al. 2002) e que também poderia estar envolvida com o desenvolvimento esquelético, foi identificada com um aumento na abundância nos grupos 129P3/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5) e entre as linhagens no grupo controle (razão 129P3/J / A/J controle = 1,6) (Tabela 12). Análise de *Western Blotting* detectou a expressão da proteína *EMILIN 5* em uma variedade de linhagens de células osteoblástica e parece exercer um papel no processo de osteogênese (DOI; NAGANO; NAKAMURA 2004).

A *fidgetin-like protein 1* (FIGNL1) apresentou uma maior abundância no grupo 129P3/J tratado com 10 ppm F em relação ao controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) (Tabela 11). FIGNL1 é membro da subfamília de ATPases que estão associadas com diversas atividades celulares (proteínas AAA), dentre elas, uma ação regulatória na osteoblastogênese

(COX et al. 2000). Existem evidências de que a superexpressão de FIGNL1 inibe a proliferação de osteoblastos e estimula sua diferenciação, sem causar qualquer alteração na apoptose (PARK et al. 2007). No presente estudo, o tratamento com 10 ppm F levou a uma maior abundância da FIGNL1 nos camundongos da linhagem 129P3/J quando comparado com o controle, e essa alteração pode ser um indício de que o F em baixas doses exerce uma regulação positiva na diferenciação de osteoblastos.

Enzimas de desintoxicação como a *aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* (AFB1-AR) e a *carbonyl reductase NADPH 2* (CBR) apresentaram-se mais abundantes no grupo 129P3/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 0,5) (Tabela 12). A CBR foi identificada no tecido pulmonar de camundongos e parece estar envolvida na desintoxicação de xenobióticos e de aldeídos xenobióticos derivados de processos de peroxidação lipídica (MOXON; HOLMES 1987). Alguns trabalhos relataram uma associação entre o F e o aumento da peroxidação lipídica (KARAOZ et al. 2004; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN 2004; WANG et al. 2010). Portanto, o F em altas doses administrado nos camundongos da linhagem 129P3/J pode ter promovido um aumento da peroxidação lipídica e conseqüentemente ocorreu uma indução na expressão da CBR. A AFB1-AR é uma enzima de desintoxicação pertencente à superfamília das aldo-ceto-redutases (ELLIS et al. 1993). Um aumento na abundância da *aflatoxin B1 aldehyde reductase* (AFB1-AR) também foi observada em urina dos ratos tratados com 50 ppm F, quando comparados com o controle (KOBAYASHI et al. 2009). A proteção do fígado contra os efeitos tóxicos e carcinogênicos da aflatoxin B1 pode ser ativada pela indução da AFB1-AR. Essa enzima foi identificada por Witzmann et al. (1998) como um potencial biomarcador para estudos de toxicidade renal. Xu et al. (2005) observaram que a administração de 100 ppm F em ratos aumentou a expressão da enzima rhodanese no tecido renal. Essa enzima converte o cianato inorgânico para uma forma menos tóxica, o ânion tiocianato. Este, por sua vez está relacionado com a indução da expressão da enzima aflatoxin B1 aldehyde reductase no fígado e em vários tecidos extra-hepáticos (BONNESEN; EGGLESTON; HAYES 2001).

A *ubiquitin specific protease 31* (USP31) é uma enzima de desubiquitinação, pertencente à família de peptidase C19. Em células HEK 293T, a superexpressão da USP31 inibiu a atividade de transcrição do TNF- α (fator- α de Necrose Tumoral), CD40, LMP1, TRAF2, TRAF6 e ativação do NF-kappa β mediada apenas pela IKK β , sem afetar a ativação mediada pelo Smad (TZIMAS et al. 2006). Foi demonstrado que a *ubiquitin-specific protease 41*, outro membro da família de peptidase C19, é seletivamente super-regulado em células

ósseas por agentes osteotrópicos, como o PTH (hormônio da paratireóide), PTHrP (paratormônio) e PGE2 (prostaglandina E2), possivelmente pela via PKA/cAMP e essa rápida indução dessa protease em resposta a esses reguladores fisiológicos poderia contribuir para o mecanismos pelo qual a estrutura, atividade, meia-vida ou localização de proteínas essenciais são modificadas para manter a homeostase óssea (MILES et al. 2002). No presente estudo, a USP31 foi encontrada superexpressa no grupo 129P3/J 50 ppm F em relação ao controle e ao tratado com 10 ppm F (razão controle / 50 ppm F = 0,3 e razão 10 ppm F / 50 ppm F = 0,5) (Tabelas 12 e 13, respectivamente), assim como no grupo 129P3/J 10 ppm F em relação ao controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) (Tabela 11). Esses achados sugerem que o F parece induzir um aumento dessa peptidase de desubiquitinação e consequentemente poderia influenciar nos mecanismos envolvidos na homeostase óssea.

A *agrin* é uma proteoglicana sulfato de heparana conhecida pelo seu envolvimento crucial na organização e manutenção de estruturas pós-sinápticas na junção neuromuscular (NMJ) (BEZAKOVA; RUEGG 2003). Além da NMJ, essa proteoglicana pode ser encontrada em outros tecidos. É altamente expressa em condrócitos e depositada na placa de crescimento ósseo de camundongos selvagens, exercendo um papel crítico no crescimento esquelético normal (HAUSSER et al. 2007). Sabe-se que a formação apropriada do esqueleto e o crescimento ósseo dependem de processos regulatórios que ocorrem na placa de crescimento (VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT 2003). Além do sistema *Indian hedgehog*/PTHrP e sistema FGF (fator de crescimento fibroblástico) envolvendo o FGFR3 (receptor FGF 3), outras moléculas sinalizadoras como o TGFβ (fator de crescimento tumoral), BMPs e proteínas wnt contribuem para essa regulação (HAUSSER et al. 2007). A *agrin* pode se ligar com afinidade relativamente alta à BMP2, BMP4 e TGFβ1, inibindo a atividade dos dois primeiros fatores de crescimento e aumentando ligeiramente a atividade do último (BANYAI; SONDEREGGER; PATTHY 2010). Essa ligação de membros da família TGFβ com *agrin* poderia ter uma dupla função, servindo como um reservatório desses fatores de crescimento e também como regulador de sua atividade (BANYAI; SONDEREGGER; PATTHY 2010). No presente estudo, foi observado um aumento na abundância de *agrin* nos grupos 129P3/J tratados com 10 e 50 ppm F e no A/J tratado com 10 ppm F em relação aos seus respectivos controle (razão 129P3/J controle / 10 ou 50 ppm F = 0,4 e A/J controle / 10 ppm F = 0,5) (Tabelas 11, 12 e 8, respectivamente). Camundongos deficientes em *agrin* exibiram um pronunciado retardo no crescimento pós-natal, acompanhado de alterações na composição e estrutura da placa de crescimento ósseo, sugerindo um prejuízo funcional dos condrócitos (HAUSSER et al. 2007). Por outro lado, um aumento na abundância dessa

glicoproteína pelo F, poderia promover um efeito oposto, aumentando a atividade dos condrócitos e estimulando o crescimento ósseo.

A proteína *deltex 4* é um regulador da via Notch, uma via de sinalização envolvendo comunicação célula-célula que regula um amplo espectro de fatores que determinam o destino celular (LEHAR; BEVAN 2006). Os osteoblastos exercem um papel crítico na função e auto-renovação das células tronco hematopoiéticas (HSC) (HAYLOCK et al. 2007). Foi demonstrado em um estudo *in vitro* utilizando células LSK (*Lineage⁻Sca-1⁺CD117⁺*) em cultura de osteoblastos que ocorreu um aumento da função hematopoiética através da via de sinalização Notch com maior expressão de Notch 2, Jagged 1 e 2, Delta 1 e 4, Hes 1 and 5, e Deltex (CHITTETI et al. 2010). A via Notch é crucial para a formação e manutenção das HSCs durante o desenvolvimento embrionário (VARNUM-FINNEY; BRASHEM-STEIN; BERNSTEIN 2003). No presente estudo foi encontrada uma menor abundância da *deltex 4* no grupo A/J 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 1,5) (Tabela 9) e uma maior abundância na linhagem 129P3/J em relação à linhagem A/J no grupo controle (razão 129P3/J / A/J = 1,5) (Tabela 14). O aumento desse fator regulador da função hematopoiética nos animais A/J tratados com altas doses de F sugere uma maior atividade das HSCs na medula óssea do fêmur.

A calmodulin (CaM), um sensor de Ca^{2+} intracelular, forma um complexo com Ca e controla um grande número de enzimas, canais de íons e outras proteínas (CHIN; MEANS 2000). Dentre as proteínas ativadas pelo complexo CaM-Ca estão várias proteínas quinases e fosfatases (SODERLING; STULL 2001). Existem evidências de que a CaM age como um regulador da diferenciação, função e sobrevivência dos osteoclastos (ZHANG et al. 2005). A reabsorção óssea pelo osteoclasto requer tanto a secreção de H^+ pela V-ATPase encontrada na membrana pregueada, como a liberação coordenada de proteases ácidas no compartimento extracelular selado pelas integrinas onde ocorre o processo de reabsorção, levando à degradação da matriz óssea e liberação de quantidades massivas de Ca^{+2} livre (BLAIR et al. 1989). A exposição dos osteoblastos a altos níveis de Ca^{+2} extracelular exerce uma pressão no mecanismo de tamponamento do cálcio e modula a função das proteínas ligadoras de Ca^{+2} , como a CaM. Durante a reabsorção óssea, a expressão da CaM aumenta e essa proteína fica concentrada na borda pregueada, promovendo o transporte ácido e a dissolução do osso (SEALES; MICOLI; MCDONALD 2006). No presente estudo, a CaM encontrou-se superexpressa nos animais da linhagem 129P3/J quando comparados aos da linhagem A/J, nos grupos controle e tratado com 10 ppm F (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,5 e A/J 10 ppm F / 129P3/J 10 ppm F = 0,4) (Tabelas 14 e 15, respectivamente). Em adição,

como mencionado acima, o canal de íon *Sodium/hydrogen exchanger 5* que interage com a CaM, também apresentou uma maior abundância na linhagem 129P3/J comparado com A/J no grupo controle. Coletivamente, esses dados sugerem uma maior atividade osteoclástica na linhagem 129P3/J, independente de F.

O F pode interferir nas principais vias metabólicas do sistema biológico, funcionando como um potente inibidor de muitas enzimas. Por isto foi utilizado como uma ferramenta importante para definir certos passos na via glicolítica (WHITFORD 1996). No presente estudo, os camundongos da linhagem 129P3/J tratados com 50 ppm F e A/J tratados com 10 ppm F apresentaram uma maior abundância da *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha testis specific form mitochondrial precursor* (PDHE1-A type II) em relação ao controle (razão 129P3/J controle / 50 ppm F = 0,4 e A/J controle / 10 ppm F = 0,3, respectivamente) (Tabelas 12 e 8, respectivamente). A PDHE1-A faz parte do complexo piruvato desidrogenase (PDC) multienzimático que catalisa a conversão do piruvato em acetil-CoA, com liberação de uma molécula de CO₂ e redução do NAD (MACDONALD et al. 1991). Para conservar as reservas de carboidratos, a reação do PDC deve ser sub-regulada quando o ciclo de Krebs está abastecido com acetil-CoA suficiente (RAVINDRAN et al. 1996). Foi demonstrado que o aumento dos produtos de reação do PCD, como a acetil-CoA e NADH, promoveram um aumento na inibição da PCD (PETTIT; PELLEY; REED 1975). Em adição, em condições de privação de alimentos ou diabetes, a atividade de PDC é reduzida a níveis mínimos para conservar os carboidratos essenciais para o cérebro e outros órgãos e tecidos especializados (RAVINDRAN et al. 1996). Ratos submetidos à privação de alimento por 48 h apresentaram uma redução na expressão de mRNAs da PDHE1-A, sugerindo que a glicose poderia regular a expressão gênica dessa enzima (MACDONALD et al. 1991). Sabe-se que doses micromolares de F são capazes de inibir a atividade da enolase, enzima que participa da fase de pagamento da via glicolítica (QIN et al. 2006). Desta maneira, o F poderia estar interferindo na glicólise e consequentemente reduzindo a concentração de piruvato e acetil-CoA e induzindo uma super-regulação da PDHE1-A.

Em relação à sinalização, acredita-se que o F possa afetar pelo menos 3 classes de proteínas envolvidas em pontos-chave de transdução de sinal: proteínas trocadoras de GTP (proteínas G), proteínas quinases e proteínas fosfatases (REFSNES et al. 2003).

Elongation factor G mitochondrial (EF-Gmt) é uma GTPase mitocondrial que participa do processo de biossíntese proteica, catalisando o passo de translocação do ribossomo dependente de GTP durante o alongamento da tradução e participando da reciclagem do ribossomo (TSUBOI et al. 2009). Foi identificada superexpressa nos grupos A/J 10 ppm F em

relação ao A/J controle (razão controle / 10 ppm F = 0,5) (Tabela 8) e entre as linhagens nos grupos controle (razão 129P3/J controle / A/J controle = 1,5). Quando um ligante ativa o receptor acoplado à proteína G, ocorre uma mudança conformacional no receptor que passa a funcionar como um fator de troca do nucleotídeo guanina, substituindo o GTP no local do GDP que está ligado à subunidade α da proteína G ($G\alpha$). Essa ativação promove a dissociação da subunidade $G\alpha$ do dímero $G\beta\gamma$ e do receptor, ativando diferentes cascatas de sinalização e proteínas efetoras. Por fim, a molécula de GTP ligada é finalmente hidrolisada tornando-se novamente GDP, e a subunidade $G\alpha$ se recombina como dímero $G\beta\gamma$, iniciando um novo ciclo (GILMAN 1987). Existem evidências de que os íons flúor (F^-) e alumínio (Al^{3+}) podem inibir a atividade dessas enzimas que se ligam e hidrolisam o GTP em GDP, pertencentes à família de proteínas ligadas ao nucleotídeo de guanina (proteína G) (MILLER et al. 1989). O efeito do F que tem sido observado na atividade de enzimas efetoras da proteína G, como a *adenylate cyclase*, *phospholipase C* ou *cGMP phosphodiesterase* é na verdade um efeito indireto ou secundário, pois o substrato do F é a própria proteína G. Através da ação do fluoreto de alumínio, a proteína G transducina é ativada como se o GDP tivesse sido trocado pelo GTP (BIGAY et al. 1987). O fluoreto de alumínio age como um análogo do γ -fosfato do GTP, ligando-se ao sítio do nucleotídeo, e juntamente com o GDP perturbam o funcionamento do sítio de ligação GTP das proteínas G (BIGAY et al. 1987). Foi demonstrado que os íons F^- e Al^{3+} também inibiram a atividade GTPase do EF-G (*Elongation factor G*) em *Escherichia coli* através da formação de um complexo estável EF-G – GDP e ribossomos (MESTERS; MARTIEN DE GRAAF; KRAAL 1993). O aumento da abundância da EF-Gmt em resposta ao tratamento com 10 ppm F na linhagem A/J poderia ser uma tentativa da célula óssea de restabelecer o ciclo envolvendo a proteína G, uma vez que o F poderia estar inativando essa GTP-ase.

O PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonila) é utilizado como inibidor de uma variedade de proteases serina, enquanto o NaF é usado como inibidor de fosfoserina e fosfotreonina proteínas fosfatases (EVERETT 2011). Algumas fosfatases são muito sensíveis ao F, como a pirofosfatase inorgânica (inibida com 200 μ M), a fosfatase ácida de células ósseas (inibida com 50-200 μ M) e a fosfatase ácida tartarato-resistente osteoclástica (inibida com 200-1000 μ M) (BAYKOV; ALEXANDROV; SMIRNOVA 1992; JANCKILA et al. 1992; PINKSE; MERKX; AVERILL 1999; THOMAS et al. 1996; YOSHIDA; SHAH; WEINHOUSE 1982). O F pode exercer um efeito nas vias de sinalização gerando diversas respostas, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (EVERETT 2011). Evidências demonstram que o F parece agir predominantemente através da *Jun N-terminal kinase* (JNK)

e da via de sinalização p38 MAPK (KARUBE et al. 2009). Em relação aos efeitos mitogênicos do F em osteoblastos, uma via de sinalização alternativa MAPK/ERK1 envolvendo a enzima osteoblástica sensível ao F *phosphotyrosyl phosphatase* (PTP) foi proposta por Lau and Baylink, (1998). No presente estudo, o F alterou a abundância de algumas quinases (p. ex. PERK) e fosfatases (p. ex. SHIP1) envolvidas na diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente.

A *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 precursor* (eIF2 α k3), também conhecida como *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), apresentou uma menor abundância no grupo A/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle (razão controle / 50 ppm F = 1,5) (Tabela 9). A eIF2 α participa na via de sinalização PERK-eIF2 α -ATF4. Para evitar uma acumulação excessiva de proteínas no retículo endoplasmático (RE), células eucarióticas possuem vias de sinalização do RE para o citosol ou núcleo. Esses processos são coletivamente chamados de resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RUTKOWSKI; KAUFMAN 2004). A PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) é ativada pela presença de proteínas no lúmen do RE e promove a transdução do sinal para o citosol ou núcleo. A ativação do PERK leva à fosforilação da subunidade α do eIF2 α , resultando em uma atenuação da tradução (HARDING; ZHANG; RON 1999). Além disso, a eIF2 α também promove a tradução do fator de transcrição ATF4 (*activating transcription factor 4*) que escapa do controle da eIF2 α por apresentar *upstream open reading frames* (ORFs) na região 5' não traduzida (VATTEM; WEK 2004). A ATF4 exerce um papel importante na diferenciação de osteoblastos e formação óssea, atuando na expressão de genes da osteocalcina (Ocn) e sialoproteína óssea (Bsp). O estresse do RE durante a diferenciação de osteoblastos ativa a via de sinalização PERK-eIF2 α -ATF4 e conseqüentemente promove a expressão de genes essenciais para a osteogênese (SAITO et al. 2011). O tratamento com 50 ppm F levou a uma menor abundância da eIF2 α nos camundongos da linhagem A/J quando comparado com o controle, e essa alteração sugere que pode estar ocorrendo uma regulação negativa do F na diferenciação de osteoblastos e na formação de tecido ósseo.

A SHIP1 (*phosphatidylinositol 3-4-5 trisphosphate 5-phosphatase 1*) foi encontrada aumentada no grupo A/J 50 ppm F quando comparado com o controle (razão controle / 50 ppm F = 0,4) (Tabela 9). Essa enzima possui um domínio SH2 N-terminal e um domínio catalítico central inositol polifosfato-5-fosfatase (ROHRSCHNEIDER et al. 2000). A SHIP1 reconhece e cliva de forma específica o grupo 5'-fosfato presente na fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), o maior produto da atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) (HUBER et al. 1998). A sinalização intracelular que leva à diferenciação do precursor de

osteoclastos inclui a ativação da PI3-K, que pode ser feita tanto pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) quanto pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL). A habilidade do SHIP1 em desfosforilar PIP3, sugere que esta enzima pode agir inibindo o recrutamento e a função dos osteoclastos (TAKESHITA et al. 2002). Camundongos SHIP-/- apresentaram um aumento no número de osteoclastos precursores na medula óssea e um aumento duas vezes maior no número de osteoclastos presentes nos ossos (TAKESHITA et al. 2002). Portanto, SHIP1 age regulando negativamente a formação e a atividade dos osteoclastos. No presente estudo, a maior abundância da SHIP1 no grupo A/J tratado com 50 ppm F em relação ao controle poderia ajudar a explicar a maior BMD observada na tíbia para o grupo A/J tratado com 50 ppm F em relação ao A/J controle, embora essa diferença não tenha sido significativa (Figura 20).

Além da SHIP1, outra proteína envolvida na reabsorção óssea e regulação de osteoclastos identificada com abundância diferencial foi a *NADPH oxidase 4* (Nox4). A Nox4 foi encontrada em 6 comparações diferentes. Quando se compararam as linhagens, a abundância desta proteína foi maior na linhagem 129P3/J em relação a A/J no grupo controle e menor no grupo tratado com 10 ppm F (razão 129P3/J / A/J controle e A/J / 129P3/J 10 ppm F = 2,7 e 1,5 respectivamente) (Tabelas 14 e 15, respectivamente). Entre os tratamentos, para a linhagem 129P3/J, os grupos tratados com F apresentaram um aumento na abundância dessa proteína em relação ao controle (razão controle / 10 ppm F e controle / 50 ppm F = 0,5 e 0,2 respectivamente) (Tabelas 11 e 12, respectivamente). Para a linhagem A/J, a Nox4 estava com a abundância aumentada no grupo 10 ppm F em relação aos grupos controle e 50 ppm F (razão controle/10 ppm F = 0,4 e 10 ppm F / 50 ppm F = 3,3, respectivamente) (Tabelas 11 e 13, respectivamente). Fortes evidências indicam que o NADPH oxidase é um sistema enzimático responsável por gerar superóxidos em osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea (DARDEN et al. 1996; YANG; RIES; KEY 1998). Entretanto, a NADPH oxidase não é a única enzima responsável pela produção de superóxidos nos osteoclastos. Foi demonstrado a existência de uma via alternativa, a Nox 4, que também participa da geração de superóxidos e consequentemente do processo de reabsorção óssea (YANG et al. 2001). Os superóxidos não apenas contribuem diretamente com a reabsorção óssea, facilitando a degradação da matriz protéica (RIES; KEY; RODRIGUIZ 1992), como também estão envolvidos na ativação e formação de osteoclastos (GARRETT et al. 1990). Foi demonstrado que o superóxido exerce um papel central na ativação e transcrição do fator NFkB em osteoclastos. O NFkB induz um aumento na transcrição de genes que atuam nas vias de sinalização para ativação dos osteoclastos. Portanto, apesar das suas propriedades destrutivas,

o superóxido e seus radicais livres podem estar envolvidos na diferenciação e ativação celular. A maior abundância dessa oxidase nos grupos tratados com F em relação ao controle, para ambas as linhagens, poderia levar a um aumento na ativação dos osteoclastos e na reabsorção óssea. A administração de F sistêmico pela água de beber (50 ppm F) por 3 semanas, resultou em uma indução da osteoclastogênese na linhagem de camundongos C3H/HeJ, demonstrado pelo aumento do número de osteoclastos ao longo da superfície trabecular de tíbias (YAN et al. 2007).

Foram identificadas 217 proteínas com diferença de abundância entre as duas linhagens no grupo controle, demonstrando que essa diferença é inerente às linhagens estudadas (Tabela 7). A grande maioria das proteínas identificadas com alteração apresentou maior abundância na linhagem 129P3/J em relação à A/J no grupo controle (Tabela 14). A principal proteína presente na matriz extracelular, *collagen alpha 2 (I) chain precursor* (130 kDa) e *collagen alpha 1 (I) chain precursor* (138 kDa), foi identificada superexpressa no grupo 129P3/J controle quando comparado com o A/J controle (Razão 129P3/J X A/J controle = 1,5) (Tabela 14). Esse resultado foi confirmado pela análise com *Western Blotting*, que encontrou diferenças significativas na expressão do colágeno tipo I entre as linhagens, independente do tratamento com F. Estes resultados são consistentes com o aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina no plasma observado no presente estudo para os animais da linhagem 129P3/J, quando comparados àqueles da linhagem A/J. Em concordância, a linhagem 129P3/J controle apresentou valores de B.Ar, MAR e BMD no osso cortical maiores do que os observados para o A/J controle, sendo que esse aumento foi significativo apenas para BMD. Em consistência com a influência genética na expressão de colágeno tipo I entre as duas linhagens, Mousny et al. (2008) encontraram em vértebra torácica de camundongos valores para a porcentagem do volume e da superfície osteóide significativamente maiores na linhagem 129P3/J em relação à A/J, independente do tratamento com F. No presente estudo, a maior quantidade de colágeno na linhagem 129P3/J em relação à A/J, mesmo na ausência de F, poderia ajudar a explicar a maior resistência óssea observada em fêmures de camundongos na linhagem 129P3/J comparada com a A/J nos grupos controle (0 ppm F) submetidos a testes mecânicos (MOUSNY et al. 2006).

Analisando coletivamente esses achados, o grupo A/J 10 ppm F apresentou uma maior abundância da Nox4, enzima relacionada com ativação de osteoclastos, tanto em relação ao grupo controle, como ao grupo tratado com 50 ppm F. Por outro lado, também foi observada uma maior abundância no grupo A/J 10 ppm F em relação ao controle de proteínas que podem estar relacionadas com a formação óssea, como CDH7, *exportin 2* e *agrin*. O grupo

A/J 50 ppm F, por sua vez, apresentou uma maior abundância da SHIP1 em relação ao controle, enzima relacionada com regulação negativa de osteoclastos e uma menor abundância da Nox4 envolvida na ativação de osteoclastos em relação ao A/J 10 ppm F, assim como uma menor abundância da eIF2, que atua na regulação positiva da osteogênese e diferenciação de osteoblastos e da *exportin 2* que pode estar relacionada com o transporte de fatores de transcrição envolvidos na formação óssea, quando comparado com o grupo controle. Portanto, em baixas doses as células ósseas da linhagem A/J responderam ao tratamento com F aumentando a abundância de proteínas relacionadas tanto com a formação como com a reabsorção óssea (Figura 45). Em altas doses, o F alterou a abundância de proteínas envolvidas com a redução da atividade de osteoclastos e osteoblastos (Figura 45). Esse resultado poderia ser explicado como uma tentativa do organismo de manter o equilíbrio no processo de remodelação óssea, compensando a menor formação óssea resultante da regulação negativa de proteínas que atuam na diferenciação de osteoblastos pelo F em altas doses, através da alteração da abundância de proteínas que inibem a osteoclastogênese. Em baixas doses, observa-se o inverso, o aumento da atividade osteoblástica poderia levar a um aumento da atividade osteoclástica com a finalidade de manter a homeostase óssea.

Proteínas como CDH7, *agrin* e P53BP relacionadas com a diferenciação de osteoblastos, e RLIM provavelmente relacionada com inibição de osteoclastos via TGF β estavam superexpressas na linhagem 129P3/J nos grupos tratados com 50 ppm F comparado com o controle. Já a *fidgetin*, *exportin 2*, *agrin* e P53BP3 estavam superexpressas na linhagem 129P3/J nos grupos tratados com 10 ppm F. A NHA e Nox4 relacionadas com a estimulação da atividade osteoclástica e a USP31 que pode ter um papel na regulação da homeostase óssea estavam superexpressas na linhagem 129P3/J nos grupos tratados com 10 ou 50 ppm F comparado com o controle. Os animais da linhagem 129P3/J responderam de maneira semelhante às doses altas e baixas de F, aumentando a abundância de proteínas envolvidas na formação, assim como na reabsorção óssea (Figura 45). Esse comportamento foi similar ao apresentado pela linhagem A/J tratada com baixas doses de F. Entretanto, enquanto o A/J apresentou uma alteração do padrão para resposta ao F em altas doses, a resposta da linhagem 129P3/J permaneceu inalterada. Esses achados são consistentes com as diferenças na susceptibilidade das duas linhagens estudadas aos efeitos do F. A linhagem A/J foi classificada como sensível aos efeitos do F e a linhagem 129 P3/J como resistente, em um estudo conduzido por Everett et al. (2002), no qual foram observadas variações no início e na severidade da fluorose dentária entre estas linhagens. Análises das propriedades mecânicas ósseas, também demonstraram alterações significativas na qualidade óssea na linhagem A/J

susceptível e ausência de alterações na linhagem 129P3/J resistente tratadas com 50 e 100 ppm F (MOUSNY et al. 2006). Em adição, o fato da linhagem 129P3/J tratada com altas doses de F continuar respondendo com aumento da atividade das células ósseas e a linhagem A/J passar a responder com inibição da atividade das células ósseas, poderia explicar valores de MAR significativamente maiores no grupo 129P3/J 50 ppm F do que àqueles observados para o grupo A/J 50 ppm F. Por ser mais sensível, mesmo em baixas doses a linhagem A/J já seria altamente responsiva ao F (42 proteínas identificadas com diferença de abundância entre o grupo controle e tratado com 10 ppm F) (Tabela 7). Em doses mais altas de F, o organismo dos animais A/J já apresentaria uma resposta adaptativa ao F, diminuindo a intensidade da resposta (25 proteínas identificadas com diferença de abundância entre o grupo controle e tratado com 10 ppm F) (Tabela 7). Enquanto que para a linhagem 129P3/J doses baixas de F promoveram uma menor resposta ao F (46 proteínas identificadas com diferença de abundância entre o grupo controle e tratado com 10 ppm F) comparado com doses mais altas (164 proteínas identificadas com diferença de abundância entre o controle e tratado com 50 ppm F) (Tabela 7). Esse aumento da resposta em altas doses sugere que por ser mais resistente, a linhagem 129P3/J necessitaria de doses mais altas de F para provocar uma resposta, seja ela citotóxica, o que pode ser confirmado pela maior abundância das proteínas AFB1-AR e CBR relacionadas com desintoxicação, no grupo 129P3/J 50 ppm F em relação ao controle, ou anabólica, aumentando a formação óssea, como observado através da MAR e da maior abundância de proteínas relacionadas à diferenciação de osteoblastos.

Esses resultados aparentemente contraditórios dos efeitos simultâneos do F na osteogênese e osteoclastogênese encontrados no presente estudo poderiam ser explicados pela ação que o F pode exercer tanto nos osteoblastos como nos osteoclastos *in vivo* e *in vitro* (EVERETT 2011). A primeira sugestão de que o F poderia ser usado no tratamento da osteoporose foi feita em 1964 (DEQUEKER; DECLERCK 1993). Portanto, os efeitos anabólicos do F no osso são conhecidos há muito tempo, e embora existam inúmeros estudos a esse respeito, seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Por outro lado, sabe-se muito pouco em relação ao seu mecanismo de ação na osteoclastogênese. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o F pode inibir a função de osteoclastos em concentrações modestas entre 0,5 a 1,0 mM (OKUDA; KANEHISA; HEERSCHE 1990) ou próximas aos níveis fisiológicos (15 ppm F), equivalendo aproximadamente a 0,8 mM (TAYLOR; BOYDE; JONES 1989). Em um estudo realizado por Taylor et al. (1990), foram adicionados em culturas de osteoclastos concentrações de NaF, variando de 0,15 a 30 ppm. A atividade de reabsorção dos osteoclastos foi inibida nas concentrações de 15 e 30 ppm. Entretanto, a

concentração de 1 ppm promoveu um aumento da atividade dos osteoclastos. Os autores não foram capazes de explicar se o aumento da atividade osteoclástica na concentração de 1 ppm foi devido a um efeito direto ou indireto *via* ação dos osteoblastos residuais presentes na cultura.

Figura 45 – Proteínas identificadas com abundância diferencial entre os tratamentos na linhagem A/J e 129P3/J demonstrando efeitos simultâneos do F na osteogênese e osteoclastogênese.

No momento, o único agente anabólico aprovado para o tratamento da osteoporose é o PTH, mas infelizmente seu uso tem sido limitado, pois este agente pode causar tumores ósseos (BETANCOURT et al. 2003). Os resultados do presente estudo poderão ter aplicabilidade na prevenção e/ou tratamento da osteoporose utilizando F, já que este tratamento tem um custo significativamente mais baixo que as demais terapias hoje disponíveis para este fim. Vale ressaltar que na dose de 10 ppm F (compatível com a água de beber otimamente fluoretada) não foram encontrados efeitos tóxicos do F nas células ósseas e

nem alterações na microestrutura trabecular e cortical, o que reforça a segurança da fluoretação controlada da água de abastecimento. Entretanto, aproximadamente um terço dos pacientes com osteoporose que recebem terapia de F não respondem ao tratamento (DEQUEKER; DECLERCK 1993). No presente estudo, o tratamento com 10 e 50 ppm F promoveu alterações específicas nas linhagens estudadas, demonstrando a existência de uma influência genética na resposta celular ao F. Em adição, a linhagem 129P3/J parece ter o “perfil genético” ideal para ser uma boa candidata para o tratamento da osteoporose com F, uma vez que nossos resultados mostraram uma resposta positiva ao F com aumento da formação óssea e estudos prévios relatam ausência de alteração na resistência do osso (MOUSNY et al. 2006). Estudos futuros deveriam identificar, em humanos, biomarcadores de resposta do tecido ósseo ao F, a fim de identificar os candidatos a receberem terapia para osteoporose baseada em F.

7 CONCLUSÕES

Em virtude dos resultados obtidos, concluiu-se que a administração de F através da água de beber a camundongos com diferentes susceptibilidades genéticas aos efeitos deste íon em tecidos mineralizados:

- Aumentou a concentração deste íon no plasma e fêmur, de maneira dose-dependente, sendo este aumento mais pronunciado para a linhagem 129P3/J submetida à dose alta;
- Não alterou significativamente a atividade da fosfatase alcalina no plasma, embora os animais da linhagem 129P3/J tenham apresentado atividades significativamente maiores que aqueles da linhagem A/J, independentemente da exposição ao F;
- Não alterou significativamente os parâmetros histomorfométricos estáticos no fêmur, tíbia e vértebra lombar (L4). Entretanto, foi observado um aumento significativo na BMD na tíbia, BV/TV, BS/TV e Tb.N na vértebra, e MMI, B.Pm, T.Ar e T.Pm no fêmur nos animais da linhagem 129P3/J quando comparados àqueles da linhagem A/J, independentemente da exposição ao F, enquanto que o mesmo efeito foi observado para a BMD no fêmur, mas neste caso apenas para o grupo controle;
- Aumentou significativamente a taxa de aposição mineral apenas para os animais da linhagem 129P3/J, submetidos à dose alta, comparados ao controle e àqueles submetidos à dose baixa. Em adição, os animais da linhagem 129P3/J apresentaram taxa de aposição mineral significativamente mais alta que aqueles da linhagem A/J, apenas para a dose alta;
- Alterou a abundância de 42 e 25 proteínas nos animais A/J submetidos à baixa e à alta dose de F, respectivamente. Essa redução no número das proteínas alteradas quando da exposição à alta dose é sugestiva de uma adaptação do animal. Dentre as proteínas identificadas com diferença de abundância quando da exposição à baixa dose de F, destacam-se aquelas relacionadas com o aumento dos processos de formação e reabsorção óssea, enquanto que a dose alta levou a alteração de proteínas relacionadas com a diminuição destes eventos;
- Alterou a abundância de 46 e 164 proteínas nos animais 129P3/J submetidos à baixa e à alta dose de F, respectivamente. O aumento no número de proteínas alteradas quando da exposição à alta dose sugere que o animal, por ser mais resistente aos efeitos do F nos tecidos mineralizados, torna-se mais responsivo em altas doses. Dentre as proteínas identificadas com diferença de abundância tanto em baixa quanto alta dose de F, destacam-se aquelas relacionadas com o aumento dos processos de formação e reabsorção óssea;

Os resultados contribuíram para um melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na susceptibilidade genética aos efeitos do F no tecido ósseo nas linhagens de camundongos avaliadas.

REFERÊNCIAS

- Aaron JE, de Vernejoul MC, Kanis JA. The effect of sodium fluoride on trabecular architecture. *Bone*. 1991;12(5):307-10.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
- Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J Nat Sci Biol Med*. 2011 Jul;2(2):154-63.
- Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*. 2006 Jun;38(6):749-57.
- Arakawa T, Haniu M, Narhi LO, Miller JA, Talvenheimo J, Philo JS, et al. Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 1994 Nov 11;269(45):27833-9.
- Arnold CM, Bailey DA, Faulkner RA, McKay HA, McCulloch RG. The effect of water fluoridation on the bone mineral density of young women. *Can J Public Health*. 1997 Nov-Dec;88(6):388-91.
- Ashton BA, Smith R. Plasma alpha 2HS-glycoprotein concentration in Paget's disease of bone: its possible significance. *Clin Sci (Lond)*. 1980 May;58(5):435-8.
- Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1325-32.
- Balcerzak M, Malinowska A, Thouverey C, Sekrecka A, Dadlez M, Buchet R, et al. Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo. *Proteomics*. 2008 Jan;8(1):192-205.
- Balena R, Kleerekoper M, Foldes JA, Shih MS, Rao DS, Schober HC, et al. Effects of different regimens of sodium fluoride treatment for osteoporosis on the structure, remodeling and mineralization of bone. *Osteoporos Int*. 1998;8(5):428-35.
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Oct;389(4):1017-31.
- Banyai L, Sonderegger P, Patthy L. Agrin binds BMP2, BMP4 and TGFbeta1. *PLoS One*. 2010;5(5):e10758.
- Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Feb;97(2):311-25.
- Battaglini RA, Pham L, Morse LR, Vokes M, Sharma A, Odgren PR, et al. NHA-oc/NHA2: a mitochondrial cation-proton antiporter selectively expressed in osteoclasts. *Bone*. 2008 Jan;42(1):180-92.

- Baykov AA, Alexandrov AP, Smirnova IN. A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Apr;294(1):238-43.
- Becker CH, Bern M. Recent developments in quantitative proteomics. *Mutat Res*. 2011 Jun 17;722(2):171-82.
- Beltran-Aguilar ED, Griffin SO, Lockwood SA. Prevalence and trends in enamel fluorosis in the United States from the 1930s to the 1980s. *J Am Dent Assoc*. 2002 Feb;133(2):157-65.
- Bera TK, Bera J, Brinkmann U, Tessarollo L, Pastan I. Cse1l is essential for early embryonic growth and development. *Mol Cell Biol*. 2001 Oct;21(20):7020-4.
- Betancourt M, Wirfel KL, Raymond AK, Yasko AW, Lee J, Vassilopoulou-Sellin R. Osteosarcoma of bone in a patient with primary hyperparathyroidism: a case report. *J Bone Miner Res*. 2003 Jan;18(1):163-6.
- Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Apr;4(4):295-308.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 1991 Dec;49(6):421-6.
- Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP. *EMBO J*. 1987 Oct;6(10):2907-13.
- Bivi N, Picotti P, Muller LN, Romanello M, Moro L, Quadrifoglio F, et al. Shotgun proteomics analysis reveals new unsuspected molecular effectors of nitrogen-containing bisphosphonates in osteocytes. *J Proteomics*. 2011 Jun 10;74(7):1113-22.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 1989 Aug 25;245(4920):855-7.
- Blume SW, Curtis JR. Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporos Int*. 2011 Jun;22(6):1835-44.
- Boivin G, Meunier P. Effects of fluoride on bone mineral. *Res Clin Forums* 1993;15:13-9.
- Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6120-30.
- Borgstrom F, Sobocki P, Strom O, Jonsson B. The societal burden of osteoporosis in Sweden. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1602-9.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86.
- Braghetta P, Ferrari A, de Gemmis P, Zanetti M, Volpin D, Bonaldo P, et al. Expression of the EMILIN-1 gene during mouse development. *Matrix Biol*. 2002 Nov;21(7):603-9.
- Brun LR, Pera LI, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother*. 2010 Jan;64(1):1-6.

- Butler WJ, Segreto V, Collins E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. *Am J Public Health*. 1985 Dec;75(12):1408-12.
- Buzalaf MA, Caroselli EE, Cardoso de Oliveira R, Granjeiro JM, Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol*. 2004 May-Jun;28(4):249-52.
- Buzalaf MA, Caroselli EE, de Carvalho JG, de Oliveira RC, da Silva Cardoso VE, Whitford GM. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. *J Anal Toxicol*. 2005 Nov-Dec;29(8):810-3.
- Buzalaf MAR, Whitford GM. Fluoride Metabolism. In: Buzalaf MAR, editor. *Fluoride and the oral environment*. Basel: Karger; 2011. p. 20-36.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004 May;25(9):1327-33.
- Cargile BJ, Sevinsky JR, Essader AS, Stephenson JL, Jr., Bundy JL. Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first-dimension separation in shotgun proteomics. *J Biomol Tech*. 2005 Sep;16(3):181-9.
- Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):1054-8.
- Catanese J, 3rd, Iverson EP, Ng RK, Keaveny TM. Heterogeneity of the mechanical properties of demineralized bone. *J Biomech*. 1999 Dec;32(12):1365-9.
- Chachra D, Turner CH, Dunipace AJ, Grynpas MD. The effect of fluoride treatment on bone mineral in rabbits. *Calcif Tissue Int*. 1999 Apr;64(4):345-51.
- Chachra D, Limeback H, Willett TL, Grynpas MD. The long-term effects of water fluoridation on the human skeleton. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1219-23.
- Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2002 Jul-Aug;1(4):317-23.
- Chen EI, Yates JR, 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Mol Oncol*. 2007 Sep;1(2):144-59.
- Chen J, Lee CS, Shen Y, Smith RD, Baehrecke EH. Integration of capillary isoelectric focusing with capillary reversed-phase liquid chromatography for two-dimensional proteomics separation. *Electrophoresis*. 2002 Sep;23(18):3143-8.
- Chen S, Oldberg A, Chakravarti S, Birk DE. Fibromodulin regulates collagen fibrillogenesis during peripheral corneal development. *Dev Dyn*. 2010 Mar;239(3):844-54.
- Cheng P-T, Bader SM, Grynpas MD. Biphasic sodium fluoride effects on bone and bone mineral: a review. *Cells Mater*. 1995;5(3):271-82.
- Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*. 2000 Aug;10(8):322-8.

Chitteti BR, Cheng YH, Poteat B, Rodriguez-Rodriguez S, Goebel WS, Carlesso N, et al. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*. 2010 Apr 22;115(16):3239-48.

Chong PK, Lee H, Zhou J, Liu SC, Loh MC, So JB, et al. Reduced plasma APOA1 level is associated with gastric tumor growth in MKN45 mouse xenograft model. *J Proteomics*. 2010 Jun 16;73(8):1632-40.

Choubisa SL, Choubisa L, Choubisa DK. Endemic fluorosis in Rajasthan. *Indian J Environ Health*. 2001 Oct;43(4):177-89.

Claessens HA, van Straten MA. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004 Dec 10;1060(1-2):23-41.

Colucci-D'Amato L, Farina A, Vissers JP, Chambery A. Quantitative neuroproteomics: classical and novel tools for studying neural differentiation and function. *Stem Cell Rev*. 2011 Mar;7(1):77-93.

Cox GA, Mahaffey CL, Nystuen A, Letts VA, Frankel WN. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat Genet*. 2000 Oct;26(2):198-202.

CTAnalyser. Structural parameters measured by the Skyscan™ CT-analyser software. [texto na internet]. 2008 [updated 2008 acesso em]. Disponível em: <http://www.skyscan.be/next/CTAn03.pdf>.

Darden AG, Ries WL, Wolf WC, Rodriguiz RM, Key LL, Jr. Osteoclastic superoxide production and bone resorption: stimulation and inhibition by modulators of NADPH oxidase. *J Bone Miner Res*. 1996 May;11(5):671-5.

Demos LL, Kazda H, Cicuttini FM, Sinclair MI, Fairley CK. Water fluoridation, osteoporosis, fractures--recent developments. *Aust Dent J*. 2001 Jun;46(2):80-7; quiz 143.

Deng FY, Lei SF, Zhang Y, Zhang YL, Zheng YP, Zhang LS, et al. Peripheral blood monocyte-expressed ANXA2 gene is involved in pathogenesis of osteoporosis in humans. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Nov;10(11):M111 011700.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993 Dec;7(15):1475-82.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001 May;107(9):1055-61.

DePaula CA, Abjornson C, Pan Y, Kotha SP, Koike K, Guzelsu N. Changing the structurally effective mineral content of bone with in vitro fluoride treatment. *J Biomech*. 2002 Mar;35(3):355-61.

Dequeker J, Declerck K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. *Schweiz Med Wochenschr*. 1993 Nov 27;123(47):2228-34.

- Dickson IR, Poole AR, Veis A. Localisation of plasma alpha2HS glycoprotein in mineralising human bone. *Nature*. 1975 Jul 31;256(5516):430-2.
- Doi M, Nagano A, Nakamura Y. Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 23;313(4):888-93.
- Domenicucci C, Goldberg HA, Hofmann T, Isenman D, Wasi S, Sodek J. Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem J*. 1988 Jul 1;253(1):139-51.
- Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):212-7.
- Donley GE, Fitzpatrick LA. Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization; possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends Cardiovasc Med*. 1998 Jul;8(5):199-206.
- Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res*. 1995 Jan;74(1):358-68.
- Dworetzky SI, Fey EG, Penman S, Lian JB, Stein JL, Stein GS. Progressive changes in the protein composition of the nuclear matrix during rat osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4605-9.
- Eanes ED, Meyer JL. The influence of fluoride on apatite formation from unstable supersaturated solutions at pH 7.4. *J Dent Res*. 1978 Apr;57(4):617-24.
- Eanes ED, Hailer AW. The effect of fluoride on the size and morphology of apatite crystals grown from physiologic solutions. *Calcif Tissue Int*. 1998 Sep;63(3):250-7.
- Ellis EM, Judah DJ, Neal GE, Hayes JD. An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov 1;90(21):10350-4.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR, 3rd. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994(5):976-89.
- Engel J, Taylor W, Paulsson M, Sage H, Hogan B. Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. *Biochemistry*. 1987 Nov 3;26(22):6958-65.
- Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res*. 2002 Nov;81(11):794-8.
- Everett ET. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res*. 2011 May;90(5):552-60.
- Fan Y, Liu J, Wang S, Wang H, Shi F, Xiong L, et al. Functional proteome of bones in rats with osteoporosis following ovariectomy. *Life Sci*. 2005 May 6;76(25):2893-901.

- Feteih R, Tassinari MS, Lian JB. Effect of sodium warfarin on vitamin K-dependent proteins and skeletal development in the rat fetus. *J Bone Miner Res*. 1990 Aug;5(8):885-94.
- Florens L, Carozza MJ, Swanson SK, Fournier M, Coleman MK, Workman JL, et al. Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods*. 2006 Dec;40(4):303-11.
- Folio C, Mora MI, Zalacain M, Corrales FJ, Segura V, Sierrasesumaga L, et al. Proteomic analysis of chemo-naïve pediatric osteosarcomas and corresponding normal bone reveals multiple altered molecular targets. *J Proteome Res*. 2009 Aug;8(8):3882-8.
- Foppiani L, Maffe A, Forzano F. CHARGE syndrome as unusual cause of hypogonadism: endocrine and molecular evaluation. *Andrologia*. 2010 Oct;42(5):326-30.
- Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 1985 Dec 15;232(3):715-24.
- Fratzl P, Roschger P, Eschberger J, Abendroth B, Klaushofer K. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: a small-angle x-ray-scattering study. *J Bone Miner Res*. 1994 Oct;9(10):1541-9.
- Fratzl P, Schreiber S, Roschger P, Lafage MH, Rodan G, Klaushofer K. Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs: a small-angle X-ray scattering and backscattered electron imaging study. *J Bone Miner Res*. 1996 Feb;11(2):248-53.
- Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, et al. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):348-52.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):632-9.
- Gianni S, Brunori M, Travaglini-Allocatelli C. Refolding kinetics of cytochrome c(551) reveals a mechanistic difference between urea and guanidine. *Protein Sci*. 2001 Aug;10(8):1685-8.
- Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:615-49.
- Gonçalves M. Biomecânica do tecido ósseo. In: Amadio AC, Barbanti VJ, editors. *A biodinâmica do movimento humano e suas relações interdisciplinares*. São Paulo: Estação Liberdade Ltda; 2000. p. 89-112.
- Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):39-63; table of contents.
- Grobler SR, Louw AJ, Chikte UM, Rossouw RJ, van WKTJ. The Relationships between Two Different Drinking Water Fluoride Levels, Dental Fluorosis and Bone Mineral Density of Children. *Open Dent J*. 2009;3:48-54.

- Grynblas MD, Rey C. The effect of fluoride treatment on bone mineral crystals in the rat. *Bone*. 1992;13(6):423-9.
- Guo D, Tan W, Wang F, Lv Z, Hu J, Lv T, et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2008 Jul;75(4):439-44.
- Ha BG, Hong JM, Park JY, Ha MH, Kim TH, Cho JY, et al. Proteomic profile of osteoclast membrane proteins: identification of Na⁺/H⁺ exchanger domain containing 2 and its role in osteoclast fusion. *Proteomics*. 2008 Jul;8(13):2625-39.
- Haugenauer D, Welch V, Shea B, Tugwell P, Wells G. Fluoride for treating postmenopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(4):CD002825.
- Hahn M, Vogel M, Pommesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*. 1992;13(4):327-30.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):271-4.
- Hausser HJ, Ruegg MA, Brenner RE, Ksiazek I. Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth. *Histochem Cell Biol*. 2007 Apr;127(4):363-74.
- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol*. 2006 Sep;134(5):467-74.
- Haylock DN, Williams B, Johnston HM, Liu MC, Rutherford KE, Whitty GA, et al. Hemopoietic stem cells with higher hemopoietic potential reside at the bone marrow endosteum. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):1062-9.
- Herbert BR, Harry JL, Packer NH, Gooley AA, Pedersen SK, Williams KL. What place for polyacrylamide in proteomics? *Trends Biotechnol*. 2001 Oct;19(10 Suppl):S3-9.
- Higgs RE, Knierman MD, Gelfanova V, Butler JP, Hale JE. Comprehensive label-free method for the relative quantification of proteins from biological samples. *J Proteome Res*. 2005 Jul-Aug;4(4):1442-50.
- Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Rueggsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res*. 1999 Jul;14(7):1167-74.
- Ho JG, Middelberg AP, Ramage P, Kocher HP. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci*. 2003 Apr;12(4):708-16.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):2-12.
- Hofstetter W, Siegrist M, Simonin A, Bonny O, Fuster DG. Sodium/hydrogen exchanger NHA2 in osteoclasts: subcellular localization and role in vitro and in vivo. *Bone*. 2010 Aug;47(2):331-40.

Hong D, Chen HX, Yu HQ, Wang C, Deng HT, Lian QQ, et al. Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. *Osteoporos Int*. 2011 Jul;22(7):2175-86.

Huang Y, Yang Y, Gao R, Yang X, Yan X, Wang C, et al. RLIM interacts with Smurf2 and promotes TGF-beta induced U2OS cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 14;414(1):181-5.

Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;95(19):11330-5.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1132-6.

Inoue M, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, LeGeros RZ, Yamamoto T, Nagai N. In vivo effect of fluoride-substituted apatite on rat bone. *Dent Mater J*. 2005 Sep;24(3):398-402.

Inoue M, Rodriguez AP, Nagai N, Nagatsuka H, LeGeros RZ, Tsujigiwa H, et al. Effect of fluoride-substituted apatite on in vivo bone formation. *J Biomater Appl*. 2011 May;25(8):811-24.

Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Sep;4(9):1265-72.

Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):697-8, 700.

Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Muller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, et al. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31496-503.

Janckila AJ, Woodford TA, Lam KW, Li CY, Yam LT. Protein-tyrosine phosphatase activity of hairy cell tartrate-resistant acid phosphatase. *Leukemia*. 1992 Mar;6(3):199-203.

Jiang X, Ye M, Liu G, Feng S, Cui L, Zou H. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J Proteome Res*. 2007 Jun;6(6):2287-94.

Judex S, Donahue LR, Rubin C. Genetic predisposition to low bone mass is paralleled by an enhanced sensitivity to signals anabolic to the skeleton. *FASEB J*. 2002 Aug;16(10):1280-2.

Kang JH, Park KK, Lee IS, Magae J, Ando K, Kim CH, et al. Proteome analysis of responses to ascochlorin in a human osteosarcoma cell line by 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF MS. *J Proteome Res*. 2006 Oct;5(10):2620-31.

Karaoz E, Oncu M, Gulle K, Kanter M, Gultekin F, Karaoz S, et al. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. *Biol Trace Elem Res*. 2004 Winter;102(1-3):199-208.

Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res*. 2009 May;88(5):461-5.

- Kasugai S, Nagata T, Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol.* 1992 Sep;152(3):467-77.
- Kawai A, Kondo T, Suehara Y, Kikuta K, Hirohashi S. Global protein-expression analysis of bone and soft tissue sarcomas. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Sep;466(9):2099-106.
- Keeley FW, Sitarz EE. Characterization of proteins from the calcified matrix of atherosclerotic human aorta. *Atherosclerosis.* 1983 Jan;46(1):29-40.
- Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Burger EH. Osteocyte and bone structure. *Curr Osteoporos Rep.* 2003 Jun;1(1):5-10.
- Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact.* 2009 Jul 15;180(2):305-11.
- Koh JM, Lee YS, Kim YS, Park SH, Lee SH, Kim HH, et al. Heat shock protein 60 causes osteoclastic bone resorption via toll-like receptor-2 in estrogen deficiency. *Bone.* 2009 Oct;45(4):650-60.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 May 30;89(5):755-64.
- Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, et al. Loss of the *ClC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell.* 2001 Jan 26;104(2):205-15.
- Kotha SP, Walsh WR, Pan Y, Guzelsu N. Varying the mechanical properties of bone tissue by changing the amount of its structurally effective bone mineral content. *Biomed Mater Eng.* 1998;8(5-6):321-34.
- Lammi MJ, Hayrinen J, Mahonen A. Proteomic analysis of cartilage- and bone-associated samples. *Electrophoresis.* 2006 Jul;27(13):2687-701.
- Lau KH, Baylink DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. *J Bone Miner Res.* 1998 Nov;13(11):1660-7.
- Lau KH, Baylink DJ. Osteoblastic tartrate-resistant acid phosphatase: its potential role in the molecular mechanism of osteogenic action of fluoride. *J Bone Miner Res.* 2003 Oct;18(10):1897-900.
- Lehar SM, Bevan MJ. T cells develop normally in the absence of both *Deltex1* and *Deltex2*. *Mol Cell Biol.* 2006 Oct;26(20):7358-71.
- Lehmann R, Wapniarz M, Hofmann B, Pieper B, Haubitz I, Allolio B. Drinking water fluoridation: bone mineral density and hip fracture incidence. *Bone.* 1998 Mar;22(3):273-8.
- Leidig-Bruckner G, Raue F, Frank-Raue K. Secondary osteoporosis - relevant clinical characteristics in diagnosis and therapy. *Dtsch Med Wochenschr.* 2012 Feb;137(7):326-32.

- Leite AL, Caroselli EE, Maria AG, Fernandes MS, Buzalaf MA. Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008 Apr;30(3):209-14.
- Li Y, Liang C, Slemenda CW, Ji R, Sun S, Cao J, et al. Effect of long-term exposure to fluoride in drinking water on risks of bone fractures. *J Bone Miner Res*. 2001 May;16(5):932-9.
- Li Y, Liang Q, Wen YQ, Chen LL, Wang LT, Liu YL, et al. Comparative proteomics analysis of human osteosarcomas and benign tumor of bone. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Apr 15;198(2):97-106.
- Lilley KS, Friedman DB. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2004 Dec;1(4):401-9.
- Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, et al. topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a coactivator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene*. 2005 May 12;24(21):3385-96.
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 1999 Jul;17(7):676-82.
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2004 Jul 15;76(14):4193-201.
- Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2001 May-Jun;27(3):677-90.
- Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan;25(1):117-24.
- Ludlow M, Luxton G, Mathew T. Effects of fluoridation of community water supplies for people with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Oct;22(10):2763-7.
- MacDonald MJ, Kaysen JH, Moran SM, Pomije CE. Pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase. Sites of pretranslational regulation by glucose of glucose-induced insulin release in pancreatic islets. *J Biol Chem*. 1991 Nov 25;266(33):22392-7.
- Mark MP, Prince CW, Oosawa T, Gay S, Bronckers AL, Butler WT. Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J Histochem Cytochem*. 1987 Jul;35(7):707-15.
- Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation*. 1988;37(2):123-36.
- Marom R, Shur I, Hager GL, Benayahu D. Expression and regulation of CReMM, a chromodomain helicase-DNA-binding (CHD), in marrow stroma derived osteoprogenitors. *J Cell Physiol*. 2006 Jun;207(3):628-35.

- Marreiros HF, Loff C, Calado E. Osteoporosis in paediatric patients with spina bifida. *J Spinal Cord Med.* 2012;35(1):9-21.
- Matthiesen R, Carvalho AS. Methods and algorithms for relative quantitative proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2010;593:187-204.
- Mbuyi JM, Dequeker J, Bloemmen F, Stevens E. Plasma proteins in human cortical bone: enrichment of alpha 2 HS-glycoprotein, alpha 1 acid-glycoprotein, and IgE. *Calcif Tissue Int.* 1982 May;34(3):229-31.
- McKee MD, Nanci A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):197-205.
- McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(2-4):313-9.
- Mesters JR, Martien de Graaf J, Kraal B. Divergent effects of fluoroaluminates on the peptide chain elongation factors EF-Tu and EF-G as members of the GTPase superfamily. *FEBS Lett.* 1993 Apr 26;321(2-3):149-52.
- Meunier PJ, Sebert JL, Reginster JY, Briancon D, Appelboom T, Netter P, et al. Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the FAVOStudy. *Osteoporos Int.* 1998;8(1):4-12.
- Miao Q, Xu M, Liu B, You B. [In vivo and in vitro study on the effect of excessive fluoride on type I collagen of rats]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2002 Jun;31(3):145-7.
- microCTWorld. The surface of an object. Bone surface (BS) and specific bone surface (BS/BV). [texto na internet]. 2011 [updated 2011 acesso em 2012 abril 28]. Disponível em.
- Miles RR, Sluka JP, Halladay DL, Santerre RF, Hale LV, Bloem L, et al. Parathyroid hormone (hPTH 1-38) stimulates the expression of UBP41, an ubiquitin-specific protease, in bone. *J Cell Biochem.* 2002;85(2):229-42.
- Miller JL, Hubbard CM, Litman BJ, Macdonald TL. Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *J Biol Chem.* 1989 Jan 5;264(1):243-50.
- Motoyama A, Yates JR, 3rd. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2008 Oct 1;80(19):7187-93.
- Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, et al. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone.* 2006 Dec;39(6):1283-9.
- Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone.* 2008 Dec;43(6):1067-74.
- Moxon LN, Holmes RS. Lung carbonyl reductase in the mouse: biochemical and catalytic properties. *Prog Clin Biol Res.* 1987;232:383-99.
- Mueller LN, Brusniak MY, Mani DR, Aebersold R. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res.* 2008 Jan;7(1):51-61.

- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988 Jun;9(6):255-62.
- Neurath H, Erickson JO, Cooper GR. The Antigenic Properties of Native and Regenerated Horse Serum Albumin. *Science*. 1942 Jul 31;96(2483):116-7.
- Nyman JS, Reyes M, Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron*. 2005;36(7-8):566-82.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975 May 25;250(10):4007-21.
- Ohta T, Wergedal JE, Matsuyama T, Baylink DJ, Lau KH. Phenytoin and fluoride act in concert to stimulate bone formation and to increase bone volume in adult male rats. *Calcif Tissue Int*. 1995 May;56(5):390-7.
- Okuda A, Kanehisa J, Heersche JN. The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 1990 Mar;5 Suppl 1:S115-20.
- Opiteck GJ, Jorgenson JW. Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides. *Anal Chem*. 1997 Jul 1;69(13):2283-91.
- Owen M, Triffitt JT. Extravascular albumin in bone tissue. *J Physiol*. 1976 May;257(2):293-307.
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):837-46.
- Park SJ, Kim SJ, Rhee Y, Byun JH, Kim SH, Kim MH, et al. Fidgetin-like 1 gene inhibited by basic fibroblast growth factor regulates the proliferation and differentiation of osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2007 Jun;22(6):889-96.
- Pastorelli R, Carpi D, Airoidi L, Chiabrando C, Bagnati R, Fanelli R, et al. Proteome analysis for the identification of in vivo estrogen-regulated proteins in bone. *Proteomics*. 2005 Dec;5(18):4936-45.
- Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom*. 2001 Oct;36(10):1083-91.
- Pepinsky RB. Selective precipitation of proteins from guanidine hydrochloride-containing solutions with ethanol. *Anal Biochem*. 1991 May 15;195(1):177-81.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999 Dec;20(18):3551-67.
- Pettit FH, Pelley JW, Reed LJ. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD ratios. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975 Jul 22;65(2):575-82.

- Pinkse MW, Merks M, Averill BA. Fluoride inhibition of bovine spleen purple acid phosphatase: characterization of a ternary enzyme-phosphate-fluoride complex as a model for the active enzyme-substrate-hydroxide complex. *Biochemistry*. 1999 Aug 3;38(31):9926-36.
- Porteus B, Kocharunchitt C, Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Apr;90(2):407-16.
- Powell DW, Weaver CM, Jennings JL, McAfee KJ, He Y, Weil PA, et al. Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. *Mol Cell Biol*. 2004 Aug;24(16):7249-59.
- Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res*. 1989;21(1-4):51-7; discussion 7-60.
- Qin J, Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Lebiada L. Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. *Biochemistry*. 2006 Jan 24;45(3):793-800.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res*. 2002 Aug;12(8):1231-45.
- Ravesloot JH, Eisen T, Baron R, Boron WF. Role of Na-H exchangers and vacuolar H⁺ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts. *J Gen Physiol*. 1995 Feb;105(2):177-208.
- Ravindran S, Radke GA, Guest JR, Roche TE. Lipoyl domain-based mechanism for the integrated feedback control of the pyruvate dehydrogenase complex by enhancement of pyruvate dehydrogenase kinase activity. *J Biol Chem*. 1996 Jan 12;271(2):653-62.
- Refsnes M, Schwarze PE, Holme JA, Lag M. Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems. *Hum Exp Toxicol*. 2003 Mar;22(3):111-23.
- Reginster JY, Meurmans L, Zegels B, Rovati LC, Minne HW, Giacovelli G, et al. The effect of sodium monofluorophosphate plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1998 Jul 1;129(1):1-8.
- Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4473-5.
- Rejou F, Dumas R, Belon C, Meunier PJ, Edouard C. Fluoride treatment in corticosteroid induced osteoporosis. *Arch Dis Child*. 1986 Dec;61(12):1230-1.
- Ries WL, Key LL, Jr., Rodriguiz RM. Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts in vitro inhibited by a manganese-based superoxide dismutase mimic. *J Bone Miner Res*. 1992 Aug;7(8):931-9.
- Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, Chao EY, Wahner HW, Muhs JM, et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 1990 Mar 22;322(12):802-9.

- Ringe JD, Kipshoven C, Coster A, Umbach R. Therapy of established postmenopausal osteoporosis with monofluorophosphate plus calcium: dose-related effects on bone density and fracture rate. *Osteoporos Int.* 1999;9(2):171-8.
- Rivera LB, Bradshaw AD, Brekken RA. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Oct;68(19):3165-73.
- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* 2000 Mar 1;14(5):505-20.
- Rubin CD, Pak CY, Adams-Huet B, Genant HK, Li J, Rao DS. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. *Arch Intern Med.* 2001 Oct 22;161(19):2325-33.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004 Jan;14(1):20-8.
- Saab CY, Cummins TR, Waxman SG. GTP gamma S increases Nav1.8 current in small-diameter dorsal root ganglia neurons. *Exp Brain Res.* 2003 Oct;152(4):415-9.
- Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem.* 2011 Feb 11;286(6):4809-18.
- Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 2008 Aug 1;283(31):21305-9.
- Schinke T, Amendt C, Trindl A, Poschke O, Muller-Esterl W, Jahnke-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20789-96.
- Schulze WX, Usadel B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:491-516.
- Schwartz KA, Lanciloti NJ, Moore MK, Campione AL, Chandar N. p53 transactivity during in vitro osteoblast differentiation in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Carcinog.* 1999 Jun;25(2):132-8.
- Seales EC, Micoli KJ, McDonald JM. Calmodulin is a critical regulator of osteoclastic differentiation, function, and survival. *J Cell Biochem.* 2006 Jan 1;97(1):45-55.
- Seshi B. An integrated approach to mapping the proteome of the human bone marrow stromal cell. *Proteomics.* 2006 Oct;6(19):5169-82.
- Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1998;8(3-4):357-75.
- Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology.* 2004 Nov 15;204(2-3):219-28.

- Shen Q, Christakos S. The vitamin D receptor, Runx2, and the Notch signaling pathway cooperate in the transcriptional regulation of osteopontin. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40589-98.
- Shur I, Solomon R, Benayahu D. Dynamic interactions of chromatin-related mesenchymal modulator, a chromodomain helicase-DNA-binding protein, with promoters in osteoprogenitors. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1288-93.
- Silva MJ, Ulrich SR. In vitro sodium fluoride exposure decreases torsional and bending strength and increases ductility of mouse femora. *J Biomech*. 2000 Feb;33(2):231-4.
- Smith JH, Denhardt DT. Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but not at low, cell densities. *J Cell Biochem*. 1987 May;34(1):13-22.
- Soderling TR, Stull JT. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem Rev*. 2001 Aug;101(8):2341-52.
- Sogaard CH, Mosekilde L, Schwartz W, Leidig G, Minne HW, Ziegler R. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. *Bone*. 1995 Jan;16(1):163-9.
- Stel'mah SA, Bazarov LU, Mogonov DM. On the Mechanism of the Hexamethylenediamine and Guanidine Hydrochloride Polycondensation. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2009;83(2):342-4.
- Swanson GJ, Nomura S, Hogan BL. Distribution of expression of 2AR (osteopontin) in the embryonic mouse inner ear revealed by in situ hybridisation. *Hear Res*. 1989 Sep;41(2-3):169-77.
- Takeshita S, Namba N, Zhao JJ, Jiang Y, Genant HK, Silva MJ, et al. SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat Med*. 2002 Sep;8(9):943-9.
- Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23;269(51):32634-8.
- Tan X, Cai D, Wu Y, Liu B, Rong L, Chen Z, et al. Comparative analysis of serum proteomes: discovery of proteins associated with osteonecrosis of the femoral head. *Transl Res*. 2006 Sep;148(3):114-9.
- Tasheva ES, Koester A, Paulsen AQ, Garrett AS, Boyle DL, Davidson HJ, et al. Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol Vis*. 2002 Oct 31;8:407-15.
- Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta*. 1968 Oct;15(10):1015-23.
- Taylor ML, Boyde A, Jones SJ. The effect of fluoride on the patterns of adherence of osteoclasts cultured on and resorbing dentine: a 3-D assessment of vinculin-labelled cells using confocal optical microscopy. *Anat Embryol (Berl)*. 1989;180(5):427-35.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.

ThermoScientific1. Label-Free LC/GC-MS Chromatographic Alignment with SIEVE [texto na internet]. [acesso em 2012 mar 2]. Disponível em: <http://vastsci.com/iorbi/I%20Orbi%203%20-%20Metabolomics.pdf>

ThermoScientific2. Metabolomics Workflow (SIEVE). [texto na internet]. [acesso em 2012 mar 2]. Disponível em: <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D14295~.pdf>.

ThermoScientific3. Metabolomics: Obtaining best data out of your Orbitrap. [texto na internet]. [acesso em 2012 Mar 2]. Disponível em: <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D20373~.pdf>.

Thomas AB, Hashimoto H, Baylink DJ, Lau KH. Fluoride at mitogenic concentrations increases the steady state phosphotyrosyl phosphorylation level of cellular proteins in human bone cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jul;81(7):2570-8.

Townend J. *Practical Statistics for Environmental and Biological Scientists*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005.

Triffitt JT. Plasma proteins present in human cortical bone: enrichment of the alpha₂HS-glycoprotein. *Calcif Tissue Res*. 1976 Nov 24;22(1):27-33.

Tsuboi M, Morita H, Nozaki Y, Akama K, Ueda T, Ito K, et al. EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Mol Cell*. 2009 Aug 28;35(4):502-10.

Turner CH, Hasegawa K, Zhang W, Wilson M, Li Y, Dunipace AJ. Fluoride reduces bone strength in older rats. *J Dent Res*. 1995 Aug;74(8):1475-81.

Turner CH, Garetto LP, Dunipace AJ, Zhang W, Wilson ME, Grynpas MD, et al. Fluoride treatment increased serum IGF-1, bone turnover, and bone mass, but not bone strength, in rabbits. *Calcif Tissue Int*. 1997 Jul;61(1):77-83.

Tzimas C, Michailidou G, Arsenakis M, Kieff E, Mosialos G, Hatzivassiliou EG. Human ubiquitin specific protease 31 is a deubiquitinating enzyme implicated in activation of nuclear factor-kappaB. *Cell Signal*. 2006 Jan;18(1):83-92.

Unwin RD, Griffiths JR, Whetton AD. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nat Protoc*. 2010 Sep;5(9):1574-82.

van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev*. 2003 Dec;24(6):782-801.

Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1784-9.

- Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101(31):11269-74.
- Veis A. Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S493-7.
- Vieira AP, Hanocock R, Eggertsson H, Everett ET, Grynpas MD. Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. *Calcif Tissue Int*. 2005 Jan;76(1):17-25.
- Voyksner RD, Lee H. Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(14):1427-37.
- Waddington RJ, Langley MS. Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Connect Tissue Res*. 2003;44(2):88-95.
- Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater*. 2003 Oct 6;6:12-21; discussion
- Walsh WR, Guzelsu N. Compressive properties of cortical bone: mineral-organic interfacial bonding. *Biomaterials*. 1994 Jan;15(2):137-45.
- Walsh WR, Labrador DP, Kim HD, Guzelsu N. The effect of in vitro fluoride ion treatment on the ultrasonic properties of cortical bone. *Ann Biomed Eng*. 1994 Jul-Aug;22(4):404-15.
- Wang W, Zhou H, Lin H, Roy S, Shaler TA, Hill LR, et al. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal Chem*. 2003 Sep 15;75(18):4818-26.
- Wang ZH, Li XL, Yang ZQ, Xu M. Fluorine-induced apoptosis and lipid peroxidation in human hair follicles in vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Dec;137(3):280-8.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*. 2001 Mar;19(3):242-7.
- Weber GF. The cancer biomarker osteopontin: combination with other markers. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011 Nov-Dec;8(6):263-88.
- Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci*. 1996;16 Rev 2:1-153.
- Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA. Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal Chem*. 2004 Oct 15;76(20):6085-96.
- Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics. *Electrophoresis*. 1998 Oct;19(14):2491-7.
- Xu H, Hu LS, Chang M, Jing L, Zhang XY, Li GS. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. *Toxicol Lett*. 2005 Dec 30;160(1):69-75.

- Xu H, Jing L, Li GS. Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2008 Summer;123(1-3):91-7.
- Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Abrams WR, Shapiro IM, et al. Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol*. 1999 Nov 29;147(5):1097-108.
- Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfeiler TW, Lobo EG, Everett ET. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone*. 2007 Dec;41(6):1036-44.
- Yan X, Morrison A, Han T, Chen Q, Li J, Wang J. Fluoride induces apoptosis and alters collagen I expression in rat osteoblasts. *Toxicol Lett*. 2011 Feb 5;200(3):133-8.
- Yan Z, Wang J, Zheng H, Liu D. Volumetric Properties of Some α -Amino Acids in Aqueous Guanidine Hydrochloride at 5, 15, 25, and 35°C. *J Solution Chem*. 1998;27(5):473-83.
- Yang S, Ries WL, Key LL, Jr. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 1998 Oct;63(4):346-50.
- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276(8):5452-8.
- Yoder KM, Mabanya L, Robison VA, Dunipace AJ, Brizendine EJ, Stookey GK. Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998 Dec;26(6):382-93.
- Yoshida C, Shah H, Weinhouse S. Purification and properties of inorganic pyrophosphatase of rat liver and hepatoma 3924A. *Cancer Res*. 1982 Sep;42(9):3526-31.
- Zerwekh JE, Antich PP, Mehta S, Sakhaee K, Gottschalk F, Pak CY. Reflection ultrasound velocities and histomorphometric and connectivity analyses: correlations and effect of slow-release sodium fluoride. *J Bone Miner Res*. 1997 Dec;12(12):2068-75.
- Zhang B, VerBerkmoes NC, Langston MA, Uberbacher E, Hettich RL, Samatova NF. Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2006 Nov;5(11):2909-18.
- Zhang H, Recker R, Lee WN, Xiao GG. Proteomics in bone research. *Expert Rev Proteomics*. 2010 Feb;7(1):103-11.
- Zhang L, McKenna MA, Said-Al-Naief N, Wu X, Feng X, McDonald JM. Osteoclastogenesis: the role of calcium and calmodulin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2005;15(1):1-13.
- Zhang WB, Wang L. Label-free quantitative proteome analysis of skeletal tissues under mechanical load. *J Cell Biochem*. 2009 Oct 15;108(3):600-11.
- Zhou F, Sikorski TW, Ficarro SB, Webber JT, Marto JA. Online nanoflow reversed phase-strong anion exchange-reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for efficient and in-depth proteome sequence analysis of complex organisms. *Anal Chem*. 2011 Sep 15;83(18):6996-7005.

Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:840518.

Zybailov B, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling. *Anal Chem.* 2005 Oct 1;77(19):6218-24.

Zybailov B, Mosley AL, Sardi ME, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res.* 2006 Sep;5(9):2339-47.

ANEXO A – Aprovação da Comissão 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° 006/2008

Bauru 19 de junho de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Análise proteômica e transcriptômica em ossos de linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades genéticas à fluorose submetidos a tratamento crônico com flúor”**, de autoria de Cláudia Ayumi Nakai Kobayashi, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís 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