UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ISABELA TOMAZINI SABINO

**Interação entre o exercício crônico e o *background* genético no
metabolismo do fluoreto**

BAURU
2019

ISABELA TOMAZINI SABINO

**Interação entre o exercício crônico e o *background* genético no
metabolismo do fluoreto**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dra Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU

2019

Tomazini Sabino, Isabela

Interação entre o exercício crônico e o *background* genético no metabolismo do fluoreto / Isabela Tomazini Sabino. – Bauru, 2019.

133p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 009/2015
Data: 16/06/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meu bem mais precioso.

Aos meus pais, **Rosana e Marcos**, pelo exemplo de amor, esforço, doação e zelo.

Aos meus irmãos, **Erick e Leonardo**, por todo cuidado, paciência, cumplicidade e companheirismo.

Ao meu marido **Denilson**, que é meu companheiro, meu amigo, meu esposo e pai. Dedicado em todas as funções. É suporte e abrigo.

Aos meus filhos **Lívia e Angelo**. Lívia que chegou no meio dessa jornada e Angelo que aguardamos ansiosamente por seu nascimento. São eles que dão a força e a coragem necessárias para caminhar e enfrentar o conhecido e o desconhecido, o novo passo e a rotina diária. É deles que vem a vontade e persistência em tentar ser uma pessoa melhor, todos os dias, um pouco mais.

Meu imensurável amor e eterna gratidão à todos vocês!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me deu o dom da vida, e me permite contemplar Seu imenso amor em cada etapa da minha vida, em cada detalhe do dia-a-dia.

Aos meus pais **Marcos e Rosana**.

Muito obrigada por serem um ‘transbordar’ de amor. Amor que ensina valores e princípios. Amor que não mede esforços me ver feliz. Amor que dá colo. Amor suporta. Amor em forma de confiança. Amor puro. Amor sem medidas.

Aos meus irmãos **Erick e Leonardo**.

Irmão é sinônimo de amor multiplicado. Obrigada, queridos, por todo companheirismo, toda cumplicidade. Obrigada por estarem comigo independente da distância e circunstâncias. Amo vocês.

Ao meu marido **Denilson**.

Agradeço a Deus por sua vida, e por ter te colocado na minha. Um marido dedicado, companheiro. Um pai bondoso e amoroso. Exemplo de força, firmeza, fé e perseverança. Obrigada por não me deixar desanimar nunca, por ser meu abrigo, minha calma. Te amo muito!

Aos meus tios **Antonio Carlos e Simone** e aos meus primos **João Otávio e Luiz Eduardo**.

Minha gratidão e meu amor por vocês, que, em todos os momentos fazem questão de estarem presentes. Muito obrigada pela preocupação, pelos conselhos, pelo carinho, por todo amor.

Aos meus familiares, agradeço pelo carinho e apoio ao longo da vida. **Fábio, Elaine, Lavínia, Miguel, Liliana, Sebastião, Aline, Luciano, Danilo, Patrícia**, as pequenas **Daphne e Júlia, Shirley, Altamir, Lucas, Vinicius, Vitória, Sueli, Sônia, Simone, Silvana, Júnior, Marcio, Matheus, Bia, Silvia, Estevam, Giovana**.

Aos meus avós **Erci, Juracy e Antonia** (*in memoriam*), que já não brilham há algum tempo na Terra, mas que deixaram as lembranças dos bons momentos vividos conosco.

Aos meus sogros **David e Terezinha**.

Pelo exemplo de fé e sabedoria. Por toda ajuda e todo o apoio. Por me acolherem e me tratarem como verdadeira filha. Muito obrigada.

Aos meus cunhados **Josimari e Anderson**, e meus sobrinhos **Gabriela, Miguel, Rafaela, Emanuel** e o “agregado” **Gelson**. Família linda e abençoada, obrigada pelo carinho sempre.

Aos meus compadres **Samanta e Eduardo**, e meu afilhado **Kaik**.

Obrigada por estarem comigo sempre, pelo carinho e compreensão. São minha família de coração.

Aos meus compadres **Elton e Diana**.

Sou grata a Deus por ter colocado vocês em nossas vidas. Quantas coisas já vivemos juntos, e que Deus permita muito mais. Muito obrigada pelo apoio, carinho, orações, paciência, conselhos. Nossas famílias estão crescendo juntas e como é bom tudo isso.

Aos meus compadres **Fernando e Tamires**.

Fer, amigo de anos, que se tornou um verdadeiro irmão para mim e meu marido. Deus permitiu nossa aproximação quando fomos ao encontro Dele. E quantas histórias desde então. Obrigada pelo carinho para com minha família, pelos conselhos, por nos presentear com a Tamires, garota de fé, conselheira, paciente e amiga. Muito obrigada, casal.

Aos compadres **Cidinha e Fábio**.

Muito obrigada pelas orações, carinho e confiança. Que Deus abençoe muito nossa amizade.

Às minhas amigas **Aline e Beatriz**.

Li e Bia, entramos praticamente juntas no Laboratório de bioquímica, nos tornamos colegas de trabalho e Deus foi nos aproximando de certa forma que hoje somos grandes amigas-comadres. Com vocês sei que posso contar em qualquer momento. Muito obrigada pelo carinho, por serem muitas vezes apenas “ouvidos e paciência” para os desabafos, por todos os conselhos ao longo desses anos. Que nossa amizade possa crescer ainda mais e que nossas famílias possam estar sempre unidas. Amo vocês.

À **Tati Martini.**

Entrou na minha vida através de sua Iniciação Científica e permanece até hoje, com amizade que vai além das bancadas de laboratório. Muito obrigada por todo carinho e apoio, Tati.

À todos os alunos/colegas/amigos do **Laboratório de Bioquímica: Tamara, Talita, Cíntia, Even, Flávia Levy, Flávia Iano, Gabi, João, Juliana, Natara, Thamyris, Adriana, Simone, Mariele, Carlos, Kely, Nathalia, Vinicius, Aline Braga.** Que, de alguma forma, participaram da minha jornada durante esses anos. Agradeço pela convivência, pela ajuda, por todos os momentos juntos.

À **Heloisa Barbosa.**

Obrigada, Helô, por transmitir tudo o que sabe, com amor e dedicação. Você é exemplo de força e determinação. Obrigada pelos conselhos dados, pelo apoio e por deixar nossos dias mais doces.

Às técnicas do Laboratório de Bioquímica **Thelma e Larissa.**

Obrigada pelos ensinamentos, pela convivência, por toda ajuda que deram durante todo o tempo que estive no laboratório.

À **Mileni.**

Por dividir este trabalho comigo, por me ajudar sempre que precisei durante todo o tempo de Bioquímica, por responder minhas mil mensagens mesmo tendo todos os seus afazeres. Muito obrigada, Mi.

À secretária **Dalva.**

Agradeço por sempre estar disposta a ajudar, dar conselhos, apoiar. Seu trabalho é essencial pra nós.

Aos docentes do Departamento de Ciências Biológicas, em especial os da Bioquímica: **Profª Carol e Profº Rodrigo.** Carol, é a Professora que não se cansa até que todo conteúdo fique claro pra cada aluno. Um exemplo de dedicação e amor pela profissão. Muito obrigada.

Profº Rodrigo, obrigada por sempre ser paciente e tentar ajudar da melhor forma.

À Universidade de São Paulo – FOB.

Minha gratidão por essa Universidade que me acolheu, por todos os funcionários que eu pude conhecer e conviver durante toda minha jornada desde a Iniciação Científica.

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por subsidiar este trabalho de Doutorado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora e Orientadora Marília Afonso Rabelo Buzalaf

São quase 10 anos desde de que cheguei na sua sala pra conversar sobre um possível estágio no LRQ. Neste momento não tem como passar um filme na cabeça. Sou imensamente grata por ter me acolhido com toda paciência e carinho. Muito obrigada por estar sempre de portas e coração abertos, disposta a me receber, me incentivar, a me “chacoalhar” quando fosse preciso. Obrigada por todos os ensinamentos. Obrigada por ser orientadora e ao mesmo tempo família. Deus te abençoe e que Nossa Senhora interceda por você em todos os seus passos.

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.

Antoine de Saint-Exupery

“Nada é pequeno se feito com amor.”

Santa Terezinha do Menino Jesus

RESUMO

Interação entre o exercício crônico e o *background* genético no metabolismo do fluoreto

O metabolismo do fluoreto (F) é influenciado por fatores genéticos e epigenéticos, como o exercício físico. Vários estudos têm procurado desvendar a influência de fatores genéticos na suscetibilidade à fluorose dentária, utilizando linhagens de camundongos com respostas diferentes aos efeitos de F. No entanto, não existem estudos avaliando os efeitos combinados da genética e do exercício no metabolismo do F. Este estudo avaliou o efeito do exercício crônico no metabolismo do F e parâmetros relacionados à homeostase da glicose, bem como perfil proteômico do fígado e músculo gastrocnêmio, em camundongos suscetíveis (A/J; S) ou resistentes (129P3/J; R) à fluorose, em resposta à exposição ao (F). Quarenta e cinco camundongos machos de cada linhagem foram divididos em 3 grupos, de acordo com os tratamentos que receberam por 56 dias: a) água deionizada e nenhum exercício (I); b) água contendo 50ppmF (como NaF) e nenhum exercício (II); c) água contendo 50ppmF e exercício (corridas diárias em esteira, 5 dias por semana, durante 60 minutos em alta intensidade; III). A capacidade física de todos os camundongos foi medida ao longo do experimento. As concentrações plasmáticas, ósseas e renais de F foram analisadas com um eletrodo específico. Glicose e insulina plasmáticas foram analisadas pelos métodos da glicose-oxidase e ELISA, respectivamente. Análises proteômicas quantitativas, livres de marcadores, foram realizadas no fígado e músculo gastrocnêmio (n-LC-MS/MS). Os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios e Bonferroni ($p < 0,05$). As concentrações plasmáticas e ósseas de F foram significativamente maiores nos grupos II e III em relação ao I, independentemente da linhagem. Após o exercício, os camundongos RIII apresentaram concentrações de F no osso significativamente maiores quando comparadas aos RII. As concentrações de F no rim foram significativamente maiores nos camundongos RIII em comparação aos RII e SIII. A capacidade física final foi significativamente menor nos camundongos SII em comparação aos RII. Os camundongos S, independentemente do tratamento, apresentaram níveis plasmáticos de glicose mais altos que os R (significativo para o grupo II). Os níveis

plasmáticos de insulina foram semelhantes entre os grupos. Nos grupos I e II, houve um aumento nas proteínas envolvidas no fluxo energético e nas enzimas antioxidantes nos camundongos S. No entanto, no grupo III, houve uma redução nas proteínas envolvidas na síntese proteica, metabolismo energético e desintoxicação, mas as enzimas antioxidantes ainda estavam aumentadas nos camundongos S. No músculo, os camundongos SI tiveram uma diminuição na expressão proteica em comparação com os RI. Entretanto, nas comparações SIIXRII e SIIXRIII, houve um aumento de proteínas relacionadas ao fluxo energético e contração muscular nos camundongos S. Os resultados indicam uma complexa interação entre genética e exercício no metabolismo F. O exercício físico parece aumentar o acúmulo de F no osso de camundongos R. O estresse oxidativo em camundongos S pode ser exacerbado pelo tratamento com F. Os resultados analisados em conjunto sugerem que os indivíduos susceptíveis aos efeitos do F podem se beneficiar mais do efeito do exercício físico na homeostase da glicose do que os indivíduos resistentes, mediante exposição a este íon, o que dá respaldo à utilização do F em saúde pública.

Palavras-chave: Fluoreto. Exercício físico. *Background* genético.

ABSTRACT

Interplay between chronic exercise and genetic background on fluoride metabolism

Fluoride (F) metabolism is influenced by genetic and epigenetic factors such as exercise. Several studies have attempted to unravel the influence of genetic factors on the susceptibility to dental fluorosis, using mice strains with different responses to the effects of F. However, there are no studies evaluating the combined effects of genetics and exercise on F metabolism. This study evaluated the effect of chronic exercise on F metabolism and parameters related to glucose homeostasis, as well as liver and gastrocnemius muscle proteome, in mice susceptible (A/J; S) or resistant (129P3/J; R) to fluorosis, in response to F exposure. Forty-five male mice from each strain were divided into 3 groups according to the treatments they received for 56 days: a) deionized water and no exercise (I); b) water containing 50ppmF (as NaF) and no exercise (II); c) water containing 50ppmF and exercise (daily runs on treadmill, 5 days a week for 60 minutes at high intensity; III). The physical capacity of all mice was measured throughout the experiment. Plasma, bone and renal F concentrations were analyzed with a specific electrode. Plasma glucose and insulin were analyzed by glucose oxidase and ELISA methods, respectively. Label-free quantitative label proteomic analyses were performed on the liver and gastrocnemius muscle (n-LC-MS/MS). Data were analyzed using 2-way ANOVA and Bonferroni's tests ($p < 0.05$). Plasma and bone concentrations of F were significantly higher in groups II and III than I, regardless of strain. After exercise, RIII mice had significantly higher bone F concentrations compared to RII mice. Kidney F concentrations were significantly higher in RIII mice compared to RII and SIII. Final physical capacity was significantly lower in SII mice compared to RII ones. S mice, regardless of treatment, had higher plasma glucose levels than R mice (significant for group II). Plasma insulin levels were similar between the groups. In groups I and II, there was an increase in proteins involved in energy flux and antioxidant enzymes in S mice. However, in group III, there was a reduction in proteins involved in protein synthesis, energy metabolism and detoxification, but antioxidant enzymes were still increased in

S mice. In muscle, SI mice had a decrease in protein expression compared to RI mice. However, in SIIxRII and SIIIxRIII comparisons, there was an increase in proteins related to energy flux and muscle contraction in S mice. The results indicate a complex interplay between genetics and exercise in F metabolism. Exercise seems to increase F accumulation in the bone of R mice. Oxidative stress may be exacerbated by F treatment in S mice. When analyzed in conjunction, our results suggest that the individuals susceptible to the effects of F might benefit more from the effects of physical exercise on glucose homeostasis than the resistant ones, upon exposure to this ion, which gives additional support to the use of F in public health.

Keywords: Fluoride. Physical exercise. Genetic background.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	ARTIGOS.....	21
2.1	ARTIGO 1 - Interplay between genetic and epigenetic factors (exercise) on fluoride metabolism.....	21
2.2	ARTIGO 2 - Chronic exercise and genetic background affect glucose homeostasis and liver/muscle proteome in mice.....	37
3	DISCUSSÃO.....	115
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXO	133

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A importância do fluoreto (F) é bem reconhecida pela comunidade científica e extremamente importante em termos de saúde pública. Ele desempenha um papel fundamental na obtenção e manutenção da saúde bucal, devido ao seu potencial no controle da cárie dentária. Por esse motivo, o F tem sido utilizado em programas de saúde pública e também incluído em produtos odontológicos. No entanto, a "janela terapêutica" do F é bastante estreita, isto é, o espaço entre insuficiência e excesso de F é pequeno, podendo oferecer riscos ao organismo se consumido ou aplicado de forma indiscriminada ou inadequada, dentre os quais se destacam a fluorose dentária e esquelética (BUZALAF, 2018). Após sua absorção, o F é distribuído pela corrente sanguínea e armazenado em tecidos calcificados principalmente e em pequena extensão em tecidos moles, sendo sua excreção essencialmente pela via renal (BUZALAF, 2018; WHITFORD, 1996). É importante caracterizar os efeitos fisiológicos do F através de uma melhor compreensão do seu metabolismo. Tem-se sugerido que vários fatores, incluindo nível de exposição a F, estágio de desenvolvimento esquelético, equilíbrio ácido-base, genética e exercício físico, afetam o metabolismo e a retenção de F no organismo (BUZALAF; WHITFORD, 2011). Quando ingerido em excesso, o F interfere nas principais vias metabólicas dos sistemas biológicos, funcionando como um potente inibidor de muitas enzimas, incluindo algumas da via glicolítica (ARAUJO; PEREIRA; DIONIZIO; SANCHEZ *et al.*, 2019). Além disso, efeitos tóxicos causados pela ingestão excessiva de F têm sido amplamente relatados e os mecanismos envolvidos na toxicidade têm sido investigados (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010; PEREIRA; DIONIZIO; ARAUJO; FERNANDES *et al.*, 2018). Esses efeitos relatados demonstraram ser dependentes da dose e do tempo de exposição ao F (ARAUJO; PEREIRA; DIONIZIO; SANCHEZ *et al.*, 2019; DABROWSKA; LETKO; BALUNOWSKA, 2006; KHAN; SABINO; DE SOUZA MELO; MARTINI *et al.*, 2018; PEREIRA; DIONIZIO; ARAUJO; FERNANDES *et al.*, 2018), bem como influenciados pela bagagem genética (BUZALAF, 2018; EVERETT, 2011).

A influência do *background* genético no efeito do F tem sido bastante estudada por meio de trabalhos comparando linhagens de camundongos com

diferentes susceptibilidades aos efeitos deste íon. Dentre elas, destacam-se as linhagens A/J, susceptível (S), com início rápido e desenvolvimento mais grave de fluorose dentária, enquanto a linhagem 129P3/J é resistente (R), desenvolvendo fluorose mínima mesmo sob alta exposição a F (EVERETT, E. T.; MCHENRY, M. A. K.; REYNOLDS, N.; EGGERTSSON, H. *et al.*, 2002). Foi demonstrado que os camundongos R excretam quantidades menores de F na urina, o que leva a níveis mais altos de F circulante quando comparados aos seus homólogos S, mas mesmo assim os primeiros são notavelmente resistentes à ocorrência de fluorose dentária (CARVALHO; LEITE; YAN; EVERETT *et al.*, 2009).

Outro fator que afeta o metabolismo do F é o exercício físico, embora esse efeito ainda não seja conhecido com precisão (BUZALAF; WHITFORD, 2011). Em dois estudos realizados com roedores, o exercício leve diminuiu as concentrações plasmáticas de F (LOMBARTE; FINA; LUPO; BUZALAF *et al.*, 2013; WHITFORD, 1996). Em contrapartida, um estudo recente com camundongos A/J não encontrou efeito do exercício intensivo sobre os níveis plasmáticos de F (AMARAL; AZEVEDO; BUZALAF; FABRICIO *et al.*, 2018). Sabe-se que o exercício físico provoca alterações na expressão gênica e síntese de proteínas (BARRES; ZIERATH, 2016) que podem ser mediadas pelo conteúdo dos exossomos (LI; LIU; MA; CHEN *et al.*, 2019), melhorando a homeostase da glicose e a proteção vascular. No entanto, os efeitos de F na homeostase da glicose ainda não são precisamente conhecidos. Enquanto alguns estudos relataram efeitos benéficos do F (LIMA LEITE; GUALIUME VAZ MADUREIRA LOBO; BARBOSA DA SILVA PEREIRA; SILVA FERNANDES *et al.*, 2014; LOBO; LEITE; PEREIRA; FERNANDES *et al.*, 2015; MALVEZZI; PEREIRA; DIONIZIO; ARAUJO *et al.*, 2018), 2018], outros reportam efeitos deletérios (CHIBA; COLOMBO; SHIRAKASHI; DA SILVA *et al.*, 2012; CHIBA; COLOMBO; SHIRAKASHI; GOMES *et al.*, 2010; LOMBARTE; FINA; LUPO; BUZALAF *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o presente estudo foi desenhado a fim de avaliar a interação entre fatores genéticos e epigenéticos (exercício crônico de alta intensidade) no metabolismo do F (artigo 1) e em parâmetros relacionados à homeostasia da glicose e perfil proteômico do fígado e músculo (artigo 2).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AMARAL, S. L.; AZEVEDO, L. B.; BUZALAF, M. A. R.; FABRICIO, M. F. *et al.* Effect of chronic exercise on fluoride metabolism in fluorosis-susceptible mice exposed to high fluoride. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 3211, Feb 16 2018.

ARAUJO, T. T.; PEREIRA, H. A. B. S.; DIONIZIO, A.; SANCHEZ, C. C. *et al.* Changes in energy metabolism induced by fluoride: insights from inside the mitochondria. **Chemosphere**, in press, 2019.

BALDWIN, A. S., Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **J Clin Invest**, 107, n. 1, p. 3-6, Jan 2001.

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chem Biol Interact**, 188, n. 2, p. 319-333, Nov 5 2010.

BARRES, R.; ZIERATH, J. R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. **Nature Reviews Endocrinology**, 12, n. 8, p. 441-451, Aug 2016.

BARTALUCCI, A.; FERRUCCI, M.; FULCERI, F.; LAZZERI, G. *et al.* High-intensity exercise training produces morphological and biochemical changes in adrenal gland of mice. **Histol Histopathol**, 27, n. 6, p. 753-769, Jun 2012.

BAUER-MEHREN, A. Integration of genomic information with biological networks using Cytoscape. **Methods Mol Biol**, 1021, p. 37-61, 2013.

BOUCHARD, C.; DAW, E. W.; RICE, T.; PERUSSE, L. *et al.* Familial resemblance for VO₂max in the sedentary state: the HERITAGE family study. **Med Sci Sports Exerc**, 30, n. 2, p. 252-258, Feb 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BUZALAF, M. A.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism. **Monogr Oral Sci**, 22, p. 20-36, 2011.

BUZALAF, M. A. R. Review of Fluoride Intake and Appropriateness of Current Guidelines. **Adv Dent Res**, 29, n. 2, p. 157-166, Mar 2018.

CARVALHO, J. G.; LEITE ADE, L.; PERES-BUZALAF, C.; SALVATO, F. *et al.* Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e53261, 2013.

CARVALHO, J. G.; LEITE, A. L.; YAN, D.; EVERETT, E. T. *et al.* Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. **J Dent Res**, 88, n. 11, p. 1054-1058, Nov 2009.

CHARONE, S.; DE LIMA LEITE, A.; PERES-BUZALAF, C.; SILVA FERNANDES, M. *et al.* Proteomics of Secretory-Stage and Maturation-Stage Enamel of Genetically Distinct Mice. **Caries Res**, 50, n. 1, p. 24-31, 2016.

CHIBA, F. Y.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; DA SILVA, V. C. *et al.* NaF treatment increases TNF-alpha and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. **Journal of Fluorine Chemistry**, 136, p. 3-7, Apr 2012.

CHIBA, F. Y.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; GOMES, W. D. S. *et al.* Insulin Signal Decrease in Muscle but Not in the Liver of Castrated Male Rats from Chronic Exposure to Fluoride. **Fluoride**, 43, n. 1, p. 25-30, Jan-Mar 2010.

COURTNEY, S. M.; MASSETT, M. P. Identification of exercise capacity QTL using association mapping in inbred mice. **Physiol Genomics**, 44, n. 19, p. 948-955, Oct 02 2012.

DABROWSKA, E.; LETKO, R.; BALUNOWSKA, M. Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. **Adv Med Sci**, 51 Suppl 1, p. 91-95, 2006.

DEL BALSIO, C.; CAFARELLI, E. Adaptations in the activation of human skeletal muscle induced by short-term isometric resistance training. **J Appl Physiol (1985)**, 103, n. 1, p. 402-411, Jul 2007.

DIONIZIO, A. S.; MELO, C. G. S.; SABINO-ARIAS, I. T.; VENTURA, T. M. S. *et al.* Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: insights from proteomics and enteric innervation analysis. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 3180, Feb 16 2018.

DJAWDAN, M.; GARLAND, T. Maximal Running Speeds of Bipedal and Quadrupedal Rodents. **Journal of Mammalogy**, 69, n. 4, p. 765-772, Nov 1988.

EVERETT, E. T. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. **Journal of Dental Research**, 90, n. 5, p. 552-560, May 2011.

EVERETT, E. T.; MCHENRY, M. A.; REYNOLDS, N.; EGGERTSSON, H. *et al.* Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **J Dent Res**, 81, n. 11, p. 794-798, Nov 2002.

EVERETT, E. T.; MCHENRY, M. A. K.; REYNOLDS, N.; EGGERTSSON, H. *et al.* Dental fluorosis: Variability among different inbred mouse strains. **Journal of Dental Research**, 81, n. 11, p. 794-798, Nov 2002.

EVERETT, E. T.; YAN, D.; WEAVER, M.; LIU, L. *et al.* Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. **Cells Tissues Organs**, 189, n. 1-4, p. 212-218, 2009.

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34, n. 8, p. 760-765, Aug 2007.

HUANG, H.; BA, Y.; CUI, L.; CHENG, X. *et al.* COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calciotropic hormone levels, and dental fluorosis. **Community Dent Oral Epidemiol**, 36, n. 6, p. 517-522, Dec 2008.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Med**, 29, n. 6, p. 373-386, Jun 2000.

JUEL, C.; LUNDBY, C.; SANDER, M.; CALBET, J. A. *et al.* Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. **J Physiol**, 548, n. Pt 2, p. 639-648, Apr 15 2003.

KASHIWAGI, N.; SHERER, D.; TOWNSEND, C. M.; JACOBS, R. *et al.* Antibody localization in horse, rabbit, and goat antilymphocyte sera. **Surgery**, 67, n. 5, p. 789-798, May 1970.

KHAN, Z. N.; AHMED, S.; ALI, M. Effect of Thermal Budget on the Electrical Characterization of Atomic Layer Deposited HfSiO/TiN Gate Stack MOSCAP Structure. **PLoS One**, 11, n. 8, p. e0161736, 2016.

KHAN, Z. N.; ASSIR, M. Z.; SHAFIQ, M.; CHAUDHARY, A. E. *et al.* High prevalence of preobesity and obesity among medical students of Lahore and its relation with dietary habits and physical activity. **Indian J Endocrinol Metab**, 20, n. 2, p. 206-210, Mar-Apr 2016.

KHAN, Z. N.; LEITE ADE, L.; CHARONE, S.; SABINO, I. T. *et al.* Liver proteome of mice with different genetic susceptibilities to the effects of fluoride. **J Appl Oral Sci**, 24, n. 3, p. 250-257, May-Jun 2016.

KHAN, Z. N.; SABINO, I. T.; DE SOUZA MELO, C. G.; MARTINI, T. *et al.* Liver Proteome of Mice with Distinct Genetic Susceptibilities to Fluorosis Treated with Different Concentrations of F in the Drinking Water. **Biol Trace Elem Res**, Apr 29 2018.

KILIKEVICIUS, A.; VENCKUNAS, T.; ZELNIENE, R.; CARROLL, A. M. *et al.* Divergent physiological characteristics and responses to endurance training among inbred mouse strains. **Scand J Med Sci Sports**, 23, n. 5, p. 657-668, Oct 2013.

KOBAYASHI, C. A.; LEITE, A. L.; PERES-BUZALAF, C.; CARVALHO, J. G. *et al.* Bone response to fluoride exposure is influenced by genetics. **PLoS One**, 9, n. 12, p. e114343, 2014.

KVEDARAS, M.; MINDERIS, P.; FOKIN, A.; RATKEVICIUS, A. *et al.* Forced Running Endurance Is Influenced by Gene(s) on Mouse Chromosome 10. **Front Physiol**, 8, p. 9, 2017.

LAURSEN, P. B. Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? **Scand J Med Sci Sports**, 20 Suppl 2, p. 1-10, Oct 2010.

LAURSEN, P. B.; RHODES, E. C. Factors affecting performance in an ultraendurance triathlon. **Sports Med**, 31, n. 3, p. 195-209, 2001.

LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R.; HERMANS, M. P. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. **Diabetes Care**, 21, n. 12, p. 2191-2192, Dec 1998.

LI, G. H.; LIU, H.; MA, C. L.; CHEN, Y. F. *et al.* Exosomes are the novel players involved in the beneficial effects of exercise on type 2 diabetes. **Journal of Cellular Physiology**, 234, n. 9, p. 14896-14905, Sep 2019.

LIMA LEITE, A.; GUALIUME VAZ MADUREIRA LOBO, J.; BARBOSA DA SILVA PEREIRA, H. A.; SILVA FERNANDES, M. *et al.* Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e106646, 2014.

LOBO, J. G.; LEITE, A. L.; PEREIRA, H. A.; FERNANDES, M. S. *et al.* Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. **J Dent Res**, 94, n. 7, p. 990-997, Jul 2015.

LOMBARTE, M.; FINA, B. L.; LUPO, M.; BUZALAF, M. A. *et al.* Physical exercise ameliorates the toxic effect of fluoride on the insulin-glucose system. **J Endocrinol**, 218, n. 1, p. 99-103, Jul 2013.

MALVEZZI, M.; PEREIRA, H.; DIONIZIO, A.; ARAUJO, T. T. *et al.* Low-level fluoride exposure reduces glycemia in NOD mice. **Ecotoxicol Environ Saf**, 168, p. 198-204, Oct 30 2018.

MILLAN, P. P. Visualization and analysis of biological networks. **Methods Mol Biol**, 1021, p. 63-88, 2013.

MILLION, D.; ZILLNER, P.; BAUMANN, R. Oxygen pressure-dependent control of carbonic anhydrase synthesis in chick embryonic erythrocytes. **Am J Physiol**, 261, n. 5 Pt 2, p. R1188-1196, Nov 1991.

MOUSNY, M.; BANSE, X.; WISE, L.; EVERETT, E. T. *et al.* The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. **Bone**, 39, n. 6, p. 1283-1289, Dec 2006.

ORCHARD, S. Molecular interaction databases. **Proteomics**, 12, n. 10, p. 1656-1662, May 2012.

OYAGBEMI, A. A.; OMOBOWALE, T. O.; ASENUGA, E. R.; ADEJUMOBI, A. O. *et al.* Sodium fluoride induces hypertension and cardiac complications through generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappa beta. **Environ Toxicol**, 32, n. 4, p. 1089-1101, Apr 2017.

PEREIRA, H.; DIONIZIO, A. S.; ARAUJO, T. T.; FERNANDES, M. D. S. *et al.* Proposed mechanism for understanding the dose- and time-dependency of the effects of fluoride in the liver. **Toxicol Appl Pharmacol**, 358, p. 68-75, Nov 1 2018.

PEREIRA, H. A.; LEITE ADE, L.; CHARONE, S.; LOBO, J. G. *et al.* Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, 8, n. 9, p. e75343, 2013.

PETROVIC-OGGIANO, G.; DAMJANOV, V.; GURINOVIC, M.; GLIBETIC, M. [Physical activity in prevention and reduction of cardiovascular risk]. **Med Pregl**, 63, n. 3-4, p. 200-207, Mar-Apr 2010.

SHERER, T. R.; SUTTIE, J. W. Effect of fluoride on glycolytic and citric acid cycle metabolites in rat liver. **J Nutr**, 100, n. 7, p. 749-756, Jul 1970.

SMITH, C. E.; CHONG, D. L.; BARTLETT, J. D.; MARGOLIS, H. C. Mineral acquisition rates in developing enamel on maxillary and mandibular incisors of rats and mice: implications to extracellular acid loading as apatite crystals mature. **J Bone Miner Res**, 20, n. 2, p. 240-249, Feb 2005.

TAVES, D. R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, 15, n. 9, p. 969-974, Sep 1968.

TOTI, L.; BARTALUCCI, A.; FERRUCCI, M.; FULCERI, F. *et al.* High-intensity exercise training induces morphological and biochemical changes in skeletal muscles. **Biol Sport**, 30, n. 4, p. 301-309, Dec 2013.

WANG, T.; ESKANDARI, D.; ZOU, D.; GROTE, L. *et al.* Increased Carbonic Anhydrase Activity is Associated with Sleep Apnea Severity and Related Hypoxemia. **Sleep**, 38, n. 7, p. 1067-1073, Jul 1 2015.

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

ZHANG, M.; WANG, A.; XIA, T.; HE, P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. **Toxicol Lett**, 179, n. 1, p. 1-5, Jun 10 2008.

ANEXO

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 009/2015

Bauru, 16 de junho de 2015.

Senhora Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Efeito do exercício físico no metabolismo de fluoretos em camundongos com diferentes susceptibilidades à fluorose: análise proteômica*" sob a responsabilidade de Vossa Senhoria, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), em reunião realizada no dia **29 de maio de 2015**.

Esta comissão solicita que ao final da pesquisa seja enviado relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Vigência do projeto:	Agosto/2015 a Agosto/2017
Espécie/Linhagem:	A/J e 129P3/J
Nº de animais:	n=90 (30 A/J - projeto piloto; 30 A/J - projeto pesquisa, 30 129P3/J - projeto de pesquisa)
Peso/Idade	após desmame
Sexo:	Macho
Origem:	Biotério de criação da FOB-USP

Cordialmente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

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