UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

HELOISA APARECIDA BARBOSA DA SILVA PEREIRA

**“Análise proteômica em fígado de ratos submetidos
à exposição crônica ao flúor”.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

HELOISA APARECIDA BARBOSA DA SILVA PEREIRA

**Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição
crônica ao flúor**

BAURU
2011

HELOISA APARECIDA BARBOSA DA SILVA PEREIRA

**Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição
crônica ao flúor**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de mestre em Ciências
Odontológica Aplicada.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2011

P414a

Pereira, Heloisa Aparecida Barbosa da Silva
Análise proteômica em fígado de ratos submetidos
à exposição crônica ao flúor / Heloisa Aparecida
Barbosa da Silva Pereira. – Bauru, 2011.
195p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr.^a Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação/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 dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 001/2009
Data: 30/01/2009

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai e minha Mãe que me ensinaram valores como a honestidade, a humildade e justiça demonstradas durante suas ações. Ao seu apoio e incentivo, os quais me fazem sempre prosseguir em frente, por mais difícil que o caminho pareça ser.

Ao meu marido que me mostrou que é possível ser estudante e esposa ao mesmo tempo. Obrigado pelo seu apoio, paciência, dedicação e o seu amor que me fez crescer muito.

Aos meus irmãos, sempre companheiros e amigos, sei que torcem muito por mim, assim como eu torço por eles.

A meu sogro e sogra que me receberam como filha e me apoiaram muito durante esta caminhada.

E com muito carinho a minha filha que mudou a minha vida antes mesmo de nascer, foi por ela que me empenhei tanto nos últimos meses para finalizar este trabalho antes que ela nascesse. Espero que um dia este trabalho e esforço possa ser pra ela motivo de orgulho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Marília Afonso Rabelo Buzalaf muito obrigado pela sua paciência e confiança os quais me ajudaram a ser a profissional e a pessoa que sou hoje, pela prontidão em me auxiliar. Gostaria de salientar que a minha trajetória profissional foi crescente e quando olho para trás e vejo o que fui e como sou agora percebo o quanto foi grande o meu crescimento profissional durante todo o tempo que convivemos. Mas sei que ainda a caminhada é longa pra chegar ao ponto que gostaria, e esse ponto de chegada tem como referencial a minha Orientadora a qual admiro e espero um dia me aproximar da profissional e pessoa que é.

À Aline de Lima Leite que me ensinou e participou ativamente deste trabalho de forma decisiva para que ele atingisse o resultado tão importante e superior. Muito obrigado pela disponibilidade e presteza sem você esse trabalho não teria sido desenvolvido de forma tão competente. Agradeço também pela amizade e apoio de todas as horas principalmente naquelas mais difíceis.

A aluna de Doutorado Senda por sempre me auxiliar quando necessário neste trabalho em todas as horas, principalmente quando mais precisei. Muito obrigado pela sua amizade e dedicação.

À Aluna Milene Fernandes pela convivência e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado por tudo, você é uma das poucas pessoas que acompanharam de perto toda a minha trajetória pelo departamento e fez dela a mais agradável possível.

A aluna de Mestrado Janete e Taisa pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade e presteza sem vocês seria muito difícil finalizar esta pesquisa, muito obrigado.

À técnica do Laboratório de Bioquímica Larissa pelo seu auxílio no desenvolvimento deste trabalho o qual foi de extrema relevância. E pela convivência e disponibilidade em auxiliar principalmente nas horas que mais precisei.

A Kellen e Alessandra pela convivência tão especial principalmente durante o cumprimento das disciplinas durante o mestrado. Sei que sempre posso contar com vocês.

À Claudinha e Juliane que também me mostraram caminhos mais fáceis me ajudaram muito me passando a sua experiência o qual me facilitou muito no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado pela amizade e pela convivência que apesar de ser breve foi preciosa pra mim.

À aluna de mestrado Livia e Bruna, companheiras, pela amizade e presteza. Muito obrigado vocês foram uma grande surpresa nesta minha caminhada, pois sei que posso contar com vocês a qualquer momento.

A aluna Cintia companheira na gravidez e no desafio de ser mãe e estudante, muito obrigado pela sua convivência e amizade.

A Flávia Levy e Juliano amigos que posso contar pra todas as horas e principalmente quando preciso de conselho. Obrigado pela convivência tão divertida que passamos.

A Maria Cecília, Thiemi, Angela, Bruno, Jose, Flávia Italiane, Flávia Iano, Camila, e aos meus colegas de mestrado, pela convivência e amizade tão primordial.

À todos os colegas que freqüentam o laboratório de bioquímica e fazem do dia-dia mais harmonioso e leve.

Aos Técnicos da bioquímica Thelma e Ovídio pelo auxílio e convivência.

A secretária Vera pela sua presteza e prontidão.

Aos funcionários do Biotério, do CIP e pós graduação pela disponibilidade e a prontidão em atender as minhas necessidades durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Tânia e Daniela técnicas da do laboratório de Histologia e professor Gerson pela auxílio e presteza no desenvolvimento do histológico.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron que possibilitou a finalização deste trabalho. Agradeço principalmente a Prof.^a Adriana Franco Paes Leme a qual possibilitou a utilização dos equipamentos e as técnicas do laboratório, muito obrigado pela presteza e prontidão.

À FAPESP pelo apoio financeiro primordial para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Faculdade de Odontologia de Bauru que oferece oportunidade para que alunos de várias áreas possam compartilhar seu conhecimento.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo recomeço,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

RESUMO

O recente desenvolvimento de técnicas proteômicas tem permitido a análise do perfil proteico completo dos sistemas biológicos, permitindo um melhor entendimento da fisiologia normal do organismo, bem como dos mecanismos de doenças, descoberta de biomarcadores para detecção precoce de doenças, identificação de novas terapias e descobertas de fármacos. No presente trabalho, a análise proteômica foi usada para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na intoxicação induzida pelo fluoreto no fígado de ratos e definir biomarcadores potenciais de toxicidade. Três grupos de ratos *Wistar* machos recém-desmamados (21 dias de vida) foram tratados *ad libitum* com água de beber contendo 0 (controle), 5 ou 50 mg/L de fluoreto, por 60 dias (n=6/grupo). Os animais foram eutanasiados e o fígado e o soro foram coletados. O fígado foi dividido em lobos, sendo que o esquerdo foi destinado à dosagem de fluoreto (eletrodo íon-sensível, após difusão facilitada por hexametildisiloxano), o direito à análise histológica (hematoxilina e eosina) e o mediano, à análise proteômica (eletroforese bidimensional associada a LC-MS/MS). Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi possível detectar uma dose-resposta em relação à ingestão para os níveis de fluoreto presentes no soro e no fígado houve diferença significativa entre os grupos que receberam 5 e 50 mg/L de fluoreto. A análise morfométrica histológica não revelou alterações nas estruturas celulares e exame o morfológico indicou inclusões lipídicas nos grupos 5 mg/L e 50 mg/L de fluoreto, mais intensas no último. A análise quantitativa de intensidade (*software* ImageMaster 2D-Platinum v 7.0), comparando a porcentagem de alteração de volume do *spot* protéico, revelou que 33, 44 e 29 *spots* aumentaram ou diminuíram sua expressão nos grupos controle X 5 mg/L, controle X 50 mg/L e 5 mg/L X 50 mg/L de fluoreto, respectivamente. Além disto, foram encontradas 18, 1 e 5 *spots* exclusivos nos grupos controle, 5 mg/L e 50 mg/L de fluoreto, respectivamente. Dentre os *spots* proteínas com expressão diferencial, foram identificadas 94 proteínas (72,3%). Em síntese, a exposição ao fluoreto alterou a expressão a nível hepático de proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais, com predominância daquelas relacionadas ao metabolismo, sendo que as alterações mais pronunciadas foram observadas no grupo de 50 mg/L de fluoreto. Proteínas que tiveram sua expressão ausente mediante exposição ao fluoreto ou que tiveram

sua expressão induzida por este elemento são potenciais biomarcadores para este tipo de exposição e devem ser melhor investigadas. Uma vez que se trata do primeiro trabalho envolvendo análise proteômica de fígado de animais expostos a diferentes doses de fluoreto, estes achados apontam importantes vias e processos celulares afetados no fígado pela exposição ao fluoreto, os quais devem ser melhor analisados em estudos futuros.

Palavras-chave: fluoreto. análise proteômica. fígado. exposição crônica.

ABSTRACT

Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride

The recent development of proteomic techniques allowed the analysis of the whole proteomic profile of the biological systems, allowing the comprehension of the normal physiology, as well as of the mechanisms underlying diseases. It has also made easier the discovery of biomarkers of diseases, as well as the identification of new therapies and drugs. In the present study, proteomic analysis was used as a tool to help understanding the molecular mechanisms underlying chronic fluoride toxicity in rat liver and also to define potential biomarkers of toxicity. Three groups of weanling male *Wistar* rats (21 days) were treated *ad libitum* with drinking water containing 0 (control), 5 or 50 mg/L fluoride for 60 days (n=6/group). After euthanasia, liver and serum were collected. The liver was divided into lobes. The left lobe was used for fluoride analysis (ion-sensitive electrode, after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion). The right lobe was used for histological analysis (hematoxylin and eosine) while the median was used for proteomic analysis (2D-PAGE associated with LC-MS/MS). Data were analysed by ANOVA and Tukey's test, ($p < 0.05$). A dose-response relationship was observed for serum fluoride levels. In liver, a significant increase in fluoride levels was observed in the 50 mg/L group when compared with the 5 mg/L group. Morphometric analysis did not reveal alterations in the cellular structures. The morphological exam revealed macrovesicular lipid droplets in the 5 and 50 mg/L groups which were more intense in the later. Quantitative intensity analysis (software ImageMaster 2D-Platinum v 7.0) comparing the percentage of alteration of volume of protein spots revealed 33, 44 and 29 protein spots that had increase or decrease in expression in the groups control X 5 mg/L, control X 50 mg/L and 5 mg/L X 50 mg/L, respectively. In addition, 18, 1 and 5 protein spots were detected exclusively in groups control, 5 mg/L and 50 mg/L, respectively. From the differentially expressed spots, 94 proteins were satisfactorily identified (72.3%). Briefly, exposure to fluoride altered the expression of liver proteins belonging to all the functional categories, especially those related to metabolism. More pronounced alterations were seen for the 50 mg/L group. Proteins that were not detected upon exposure to fluoride or that had their expression induced in the presence of fluoride are potential biomarkers of toxicity and should be better

investigated. Since this is the first study involving proteomic analysis of liver in rats exposed to different doses of fluoride, these findings indicate important pathways and cellular processes affected by exposure to this element that should be addressed in details in future studies.

Keywords: fluoride.proteomic analysis . liver.chronic exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Sequência da dosagem de fluoreto nas amostras de plasma e fígado. Em **a** placas de Petri contendo as amostras a serem analisadas juntamente com a tampa perfurada contendo as gotas de NaOH; em **b** o HMDS é adicionado e então as placas são seladas com vaselina; em **c** as gotas de NaOH são unidas após a difusão; em **d**, a leitura com auxílio de um eletrodo íon específico 9409 acoplado a um eletrodo calomelano de referência 57
- Figura 2 - Homogeneização do tecido hepático para determinação da concentração de fluoreto 58
- Figura 3 - Lâmina de vidro contendo os 3 fragmentos obtidos para o lóbulo direito do fígado 59
- Figura 4 - Graticulo de integração II Zeiss® sobre a imagem de um corte histológico 60
- Figura 5 - Microscópio de fluorescência DiaplanLeitz- Wetzlar- Alemanha 61
- Figura 6 - Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A – Moinho criogênico; B – Tubo de polycarbonato; C – Colocação da amostra no moinho criogênico; D – Colocação do N₂. 62
- Figura 7 - Focalização isoeletrica no EttanIPGphor 3 e o *EttanIPGphorCupLoadingManifold* (GE Healthcare). 66
- Figura 8 - Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema *EttanDALTsix* (GE Healthcare). 67
- Figura 9 - Excisão e recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa. Os *spots* provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com lâmina de bisturi. 69

Figura 10 -	Fotomicrografia dos fígados de ratos tratados cronicamente com água contendo diferentes concentrações de fluoreto visão panorâmica das estruturas EP(espço porta), S (sinusóides) e H (Hepatócitos)indicando morfologia normal em A -grupo controle, B - grupo de 5mgF/L e C - grupo de 50mgF/L.	81
Figura 11 -	Fotomicrografia dos fígados de ratos tratados cronicamente com água contendo diferentes concentrações de fluoreto visão panorâmica das estruturas VC (veia centro lobular) indicando morfologia sem alterações nos grupos: A - grupo controle, B - grupo de 5 mgF/L e C - grupo de 50 mgF/L.	83
Figura 12 -	Fotomicrografias de fígado de ratos apresentando inclusões lipídicas (IL) nos grupos de 5 mg F/L (B) e 50 mg F/L (C). No grupo controle (A) não se observam estas inclusões.	87
Figura 13 -	Géis bidimensionais representativosde proteínas hepáticas de ratos dos grupos controle (I), grupo tratado com 5mg/L de fluoreto (II) e grupo tratado com 50 mg/L de fluoreto (III). As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguidas separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.	89
Figura 14 -	Gel representativo contendo os <i>spots</i> comuns aos dois grupos sobrepostos. Em vermelho estão representados os <i>spots</i> do grupo I (controle) e em azul os <i>spots</i> pertencentes ao grupo II (5mg/L de fluoreto).	91
Figura 15 -	Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de <i>coomassie</i> coloidal. Os <i>spots</i> circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos I (A, controle) e II (B, 5 mg/L de fluoreto).	93
Figura 16 -	Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de <i>coomassie</i> coloidal. Os <i>spots</i> circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo I (A, controle) quando comparado ao II	95

(B, 5 mg/L de fluoreto).

- Figura 17 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 97
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se
exclusivamente no grupo II (A, 5 mg/L de fluoreto) quando
comparado ao I (B, controle).
- Figura 18 - Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos 101
sobrepostos. Em vermelho estão representados os *spots* do
grupo I (controle) e em azul os *spots* pertencentes ao grupo III
(50 mg/L de fluoreto).
- Figura 19 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 103
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença
de expressão entre os grupos I (A, controle) e III (B, 50 mg/L de
fluoreto).
- Figura 20 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 105
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se
exclusivamente no grupo I (A, controle) quando comparado ao III
(B, 50 mg/L de fluoreto).
- Figura 21 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 107
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se
exclusivamente no grupo III (A, 50 mg/L de fluoreto) quando
comparado ao I (B, controle).
- Figura 22 - Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos 113
sobrepostos. Em vermelho estão representados os *spots* do
grupo II (5mg/L de fluoreto) e em azul os *spots* pertencentes ao
grupo III (50 mg/L de fluoreto).
- Figura 23 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 115
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença
de expressão entre os grupos II (A, 5 mg/L de fluoreto) e III (B, 50

mg/L de fluoreto).

- Figura 24 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 117
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se
exclusivamente no grupo II (A, 5 mg/L de fluoreto) quando
comparado ao III (B, 50 mg/L de fluoreto).
- Figura 25 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoelétrica em 119
tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie*
coloidal. Os *spots* circundados em verde
- Figura 26 - Gráfico resultante dos *score* referente a cada espectro analisado 122
pelo programa Mascot do *spot* 173, salientando na área
sombreada o limite de 60.
- Figura 27 - Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas em 123
fígado de ratos tratados ou não cronicamente com fluoreto, de
acordo com Rison; Hodgman; Thornton, (2000).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso corporal dos animais do grupo controle(I – 0 mg/L fluoreto)-	53
Tabela 2- Peso corporal dos animais do grupo experimental II (5 mg/L fluoreto)-	53
Tabela 3 - Peso corporal dos animais do grupo experimental III (50 mg/L fluoreto).	54
Tabela 4 - Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo controle (I - 0 mg/L fluoreto)	54
Tabela 5 - Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo II (5 mg/L fluoreto).	55
Tabela 6 - Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo experimental III (50 mg/L fluoreto).	55
Tabela 7 - Dosagem de proteínas do homogenato hepático, concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cada amostra de fígado em 2 μL de amostra.	64
Tabela 8 -Dosagem de proteínas do homogenato hepático, volume de amostra utilizado para obtenção do pool.	65
Tabela 9 - Concentração média ($\pm\text{DP}$) de fluoreto no plasma e fígado dos animais, após administração de fluoreto.	77
Tabela 10 - Comparação das porcentagens médias ($\pm\text{DP}$) de cada estrutura avaliada através de análise morfométrica nos diferentes grupos.	79
Tabela 11- Comparação das porcentagens médias ($\pm\text{DP}$) do núcleo e citoplasma no hepatócito, avaliadas através de análise morfométrica nos diferentes.	79
Tabela 12 - Coeficiente de correlação entre os géis de cada grupo.	90

- Tabela 13 – Razão dos spots protéicos com porcentagens de alterações de volume entre os diferentes grupos. Valores positivo e negativo indicam maior ou menor expressão da proteína, respectivamente. Foi considerada expressão diferencial apenas os valores com alterações significativas ($p < 0,05$). 109
- Tabela 14 – Spots protéicos presentes ou ausentes nos diferentes grupos. Valores positivo e negativo indicam presença e ausência, respectivamente. 111
- Tabela 15 - Perfil qualitativo de spots protéicos encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto, de acordo com a análise realizada através do software *Image Master 2D Platinum 7.0*. 112
- Tabela 16 - Perfil quantitativo de spots protéicos encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto, de acordo com a análise realizada através do software *Image Master 2D Platinum 7.0*. 112
- Tabela 17 - Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Transporte” em fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto. 126
- Tabela 18 - Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Estrutura e organização estrutural” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto. 129
- Tabela 19 - Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Processos celulares” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto. 135
- Tabela 20 - Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Vias da informação” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto. 143

Tabela 21 - Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de carboidrato” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

148

Tabela 22 -Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Lipídios” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

152

Tabela 23-Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Aminoácidos” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

160

Tabela 24 Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Energético” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

165

Tabela 25 Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Miscelânea” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

171

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

3-DG	3-deoxyglucosome
ACN	Acetonitrila
ADMA	Dimetil arginina assimétrica
AGT2	Alanineglyoxylateaminotransferase2, mitochondrial
AGXT2	alanine-glyoxylateaminotransferase2
AKU	Alkaptonúria
ALT	Alanina aminotransferase
AMBIC	Bicarbonato de amônio
APO-E	Apolipoprotein E
AST	Aspartatoaminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do Soro Bovino
CaF ₂	Fluorita
CCl ₂ F ₂	Freon-12
CFC	Clorofluorocarbono
CHDH	Choline dehydrogenase
Citop	Citoplasma
DHDPSL	Dehydrodipicolinate synthase-like, mitochondrial
DMGV	α -keto- δ -(<i>N,N</i> -dimethylguanidino)valericacid
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreital
EF	Fator de Alongamento
EF-2	Elongationfactor -2
EP	Espaço porta
ERK	Extracellular signal regulated kinases
EST	Estrogen sulfotransferase
F ₂	Gás flúor
FABP	Fattyacid-bindingprotein
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GDP	Guanosina difosfato
GOT	Transaminase glutâmico oxalacética
GRP78	78 glucose regulatedprotein
GST	Glutathione-S-Transferase

GSTM1	Glutathione-S-Transferase Mu1
GTP	Glutamato piruvato transaminase
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HF	Ácido fluorídrico
HGO	Homogintisate 1, 2 dioxygenase
HMDS	Hexametildisiloxano
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HnRNP k	Heterogeneous nuclear ribonucleioprotein K
Hp	Heptoglobina
Hsp60	60 KDa heat shock protein
Hsp70	70KDa heat shock protein
IEF	Focalização isoeletrica
IEP	Infiltrado de espaço porta
Ir	Irídio
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em TANDEM
LDH	Lactato desidrogenase
L-FABP	Fattyacid-bindingprotein, liver
MALDI	matrixassisted laser desorptionionization (Ionização/desorção a laser assistida por matriz)
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMSDH	Methylmalonate – semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial
NAD	Nicotinamida adeninedinocleotídeo
NADP	Nicotinamida adeninedinocleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adeninedinocleotídeo fosfato reduzida
NaF	Fluoreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NO	Óxido nítrico
PDC-E2	Pyruvatedehydrogenasecomplexcomponent E2
PDI	Proteindisulfideisomerase
PEBP-1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
Pi	Fosfato
PKC	Proteinaquinase C

PPI	Peptidylprolylcis-transisomerase
PRDx	Peroxirredoxina
Pt	Platina
PTFE	Polímero politetrafluoretileno
RA	ácido retinóico
RALDH1	Retinal dehydrogenase 1
RKIP	Rafkinaseinhibitorprotein
RNA	Ácido Ribonucléico
Sin	Sinusóide
TSC1	Tuberous sclerosis protein1
TSC2	Tuberous sclerosis protein 2
UF ₆	Hexafluoreto
VCL	Veia centro lobular
VDL	Lipoproteínas de baixa densidade
VLCAD	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	Flúor	33
2.1.1	<i>Características gerais e históricas</i>	33
2.1.2	<i>Utilização do fluoreto</i>	34
2.2	Toxicidade do fluoreto	35
2.2.1	Toxicidade aguda	36
2.2.2	Toxicidade crônica	37
2.3	Análise proteômica	39
2.4	Fígado	42
2.4.1	<i>Características gerais</i>	42
2.4.2	<i>Toxicidade do fígado x análise proteômica</i>	42
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Obtenção e tratamento dos animais	52
4.2	Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	52
4.3	Dosagens de fluoreto	56
4.3.1	<i>Plasma</i>	56
4.3.2	<i>Fígados</i>	57
4.4	Processamento histotécnico	58
	<i>Determinações estereológicas nos cortes histológicos para a</i>	
4.4.1	<i>microscopia de luz</i>	58
4.4.1.1	<i>Casualização dos campos microscópicos</i>	58
	Avaliação morfométrica da densidade de volume (vvi), das	
	estruturas glandulares e da densidade de volume nuclear (pn) e	
4.4.1.2	citoplasmático (pcit) do hepatócito.	59
4.5	Análise Proteômica	61
4.5.1	<i>Extração de proteínas do fígado</i>	61
4.5.2	<i>Eletroforese bi-dimensional</i>	65
4.5.2.1	<i>Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)</i>	65
4.5.2.2	<i>Elotroforese SDS-PAGE (segunda Dimensão)</i>	66

4.5.3	<i>Visualização e digitalização dos géis</i>	67
4.5.4	<i>Preparo das amostras para espectrometria de massa</i>	68
4.5.5	<i>Sequenciamento das proteínas nos espectro de massa</i>	70
4.5.6	<i>Identificação das proteínas</i>	71
4.6	Análise Estatística	71
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	73
5.1	Análise de fluoreto	75
5.2	Análise Histológica	77
5.3	Análise proteômica	89
5.3.1	<i>Análise das imagens</i>	89
5.3.2	<i>Análise comparativa entre os grupos</i>	90
5.3.3	<i>Proteínas identificadas</i>	121
5.3.3.1	<i>Proteínas relacionadas ao transporte</i>	123
5.3.3.2	<i>Proteínas relacionadas à estrutura e organização estrutural</i>	127
5.3.3.3	<i>Proteínas relacionadas aos processos celulares</i>	131
5.3.3.4	<i>Proteínas relacionadas às vias de informação</i>	137
5.3.3.5	<i>Proteínas relacionadas ao metabolismo</i>	145
5.3.3.5.1	<i>Metabolismo de carboidratos</i>	145
5.3.3.5.2	<i>Metabolismo de lipídios</i>	149
5.3.3.5.3	<i>Metabolismo de aminoácido</i>	155
5.3.3.5.4	<i>Metabolismo energético</i>	163
5.3.3.5.5	<i>Miscelânea</i>	167
6	CONCLUSÕES	173
7	REFERÊNCIAS	177
	ANEXO	193

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O fluoreto possui uma reconhecida atuação terapêutica contra a cárie dentária (MCDONAGH et al., 2000; WONG et al., 2011). Atualmente estudos estão sendo feitos para a sua utilização também contra a osteoporose devido à sua ação sobre o tecido ósseo (MELLO; GOMIDE, 2005). Entretanto, apesar desta ação terapêutica benéfica, como qualquer outro tipo de substância, a ingestão de doses excessivas pode levar a efeitos colaterais (WHITFORD, 1996). Embora o único efeito colateral resultante da adição controlada de fluoreto à água de abastecimento público seja a fluorose dentária (MCDONAGH et al., 2000), a presença natural de altos níveis de fluoreto na água pode levar à fluorose esquelética (BUZALAF, 2008). Entretanto, trabalhos experimentais com animais empregando doses crônicas elevadas de fluoreto têm relatado problemas em outros tipos de tecidos, afetando diversos sistemas proteicos e enzimáticos (STRUNECKA et al., 2007; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010). Isso ocorre em função de este elemento ser absorvido no sistema gastro-intestinal, chegando à corrente sanguínea, de onde se distribui para todos os tecidos mineralizados e não mineralizados (WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2008).

Tem sido relatado que o fluoreto pode promover degeneração progressiva de estrutura e funções dos músculos esqueléticos, cérebro e coluna espinhal (MULLENIX, et al., 1995), além de diminuição do metabolismo aeróbico e alterações no metabolismo de radicais livres em órgãos como fígado, rins e coração (SHARMA; CHINOY, 1998). Pode ainda provocar estresse oxidativo, apoptose e alteração do ciclo celular em hepatócitos e células da mucosa oral (HE; CHEN, 2006). Danos ao DNA foram observados quando da utilização de doses muito elevadas de fluoreto por ratos (150 ppm) (HE; CHEN, 2006), embora estudos utilizando doses crônicas de fluoreto menores (BUZALAF et al., 2006) ou mesmo doses agudas (LEITE et al., 2007) não tenham observado danos ao DNA de diferentes tipos celulares. Deve ser ressaltado, que estes eventos de toxicidade foram observados em estudos experimentais com animais, mediante utilização de doses maiores que as usualmente utilizadas na prática clínica.

Entretanto, por estar presente em várias fontes como inúmeros produtos odontológicos, alimentos e água de abastecimento público, doses capazes de provocar toxicidade podem ser atingidas no organismo (CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009). Algumas fosfatases, por exemplo, são muito sensíveis ao

fluoreto, 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 et al., 1992; JANCKILA et al., 1992; PINKSE; MERKX; AVERILL, 1999; THOMAS et al. 1996).

De acordo com Barbier, Arreola-Mendoza e Razo (2010) o fluoreto pode interferir em vários processos moleculares como estresse oxidativo, modulação intracelular da homeostasia, peroxidação lipídica, apoptose, metabolismo enzimático, ciclo celular, comunicação entre células e transdução de sinal.

Assim, muitos estudos estão sendo feitos com o intuito de se entender melhor como pode ocorrer este processo de intoxicação. Em muitos deles são empregadas doses crônicas de fluoreto, ou seja, quantidades pequenas deste elemento são ingeridas por longos períodos de tempo (FEJERSKOV; EKSTRAND; BURT, 1996).

Shanthakumari, Seshachalam e Subramanian (2004) observaram alterações no fígado e rins nos grupos de ratos tratados com 25 ppm de fluoreto durante 8 e 16 semanas, bem como um aumento na concentração de TBARS e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Na análise histopatológica, o fígado dos grupos tratados apresentou inflamação, infiltração nos hepatócitos e focos de necrose.

Xiong, et al. (2007) encontraram uma relação dose-efeito nos níveis de fluoreto em águas fluoretadas e danos na função hepática e renal de crianças. Os autores observaram um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH), dosada a partir do soro de crianças que ingeriam água contendo mais que 2 mg/L de fluoreto. Com base nesses achados, os autores sugeriram que a ingestão de fluoreto a partir de água de abastecimento contendo concentrações maiores que 2 mg/L poderia resultar em danos hepáticos.

Apesar dos vários relatos na literatura sobre a toxicidade do fluoreto, principalmente nos tecidos gástrico e renal, que estão mais envolvidos no metabolismo deste elemento (WHITFORD, 1996), pouco se sabe sobre as reais consequências da ingestão crônica de fluoreto para o tecido hepático. Este tecido possui uma alta atividade metabólica e é responsável pela produção de proteínas plasmáticas e carreadoras, pelo processamento e armazenamento de nutrientes

vindos do trato digestivo, bem como pela neutralização e eliminação substâncias tóxicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disto, qualquer substância absorvida, inclusive o fluoreto, pode atingir facilmente o fígado, provocando alterações em suas funções. Michael et al. (1996) relataram que o fluoreto pode perturbar a síntese proteica, elevando as atividades de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que estão relacionadas ao metabolismo hepático.

Em adição, os dados envolvendo alterações hepáticas pela ingestão crônica de fluoreto são esparsos, enfocando proteínas isoladas. Para que se possa ter um entendimento global deste complexo fenômeno de intoxicação, uma ferramenta mais completa que permita a análise de várias proteínas com expressão alterada mediante intoxicação pelo fluoreto seria de grande valia. Assim, a proteômica parece ser a estratégia ideal para este fim, não só pela abrangência de informações obtidas através da análise simultânea de diversas proteínas com expressão alterada, como também pela alta sensibilidade da técnica, permitindo a detecção de efeitos tóxicos com utilização de doses bem menores em comparação à análise histológica e outros tipos de análises químicas. Outra vantagem desta técnica é que ela consegue demonstrar efeitos tóxicos mais rapidamente em comparação a outras ferramentas analíticas, o que resulta em economia (KENNEDY, 2002).

A proteômica obteve um rápido progresso nos últimos anos e isso se deve ao projeto genoma, que permitiu a identificação do genoma humano e de outras espécies, e também ao desenvolvimento de novas técnicas de separação de proteínas, utilizando-se gel ou não, bem como à evolução do processo de identificação proteica, utilizando espectrometria de massa (THONGBOONKERD, 2004). É importante mencionar que o conhecimento do genoma não é suficiente para o entendimento de alterações no organismo, já que modificações pós-tradução são naturais. Assim, quando se pretende estudar as vias metabólicas celulares, com o intuito de encontrar possíveis alvos para fármacos, é necessário avaliar o proteoma, que é a composição de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo. É importante ressaltar que outras técnicas de análise proteica como, por exemplo, o *western blotting* são capazes de identificar apenas uma proteína de cada vez, sendo ainda necessário utilizar anticorpos específico para cada uma, diferentemente da análise proteômica, que pode permitir a identificação de inúmeras

proteínas simultaneamente (ARTHUR et al. 2002). O uso desta técnica na toxicologia recebe a nomenclatura de toxiproteoma, que tem como principal meta identificar relações entre os efeitos tóxicos e as proteínas-alvo, levando a marcadores comuns que possam ser usados como biomarcadores toxicológicos (MERRICK, 2006; KENNEDY, 2002).

Atualmente, há poucos trabalhos avaliando a toxicidade do fluoreto através da utilização desta poderosa ferramenta analítica, que é a proteômica. Os órgãos/células/fluidos avaliados até o momento foram rins (XU et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2009), urina (KOBAYASHI et al., 2011), osteoblastos (XU; JING; LI, 2008) e cérebro (GE et al., 2011). Não há nenhum trabalhando utilizando tecido hepático, o que é de grande interesse, devido à importância deste órgão no metabolismo e a relatos de que o fluoreto pode provocar diversas alterações metabólicas.

Assim, seria interessante aliar a aplicação desta ferramenta analítica a fim de se determinar quais proteínas hepáticas têm sua expressão alterada em modelos experimentais animais nos quais são utilizadas doses crônicas de fluoreto similares às aquelas presentes na água artificial ou naturalmente fluoretada. Em síntese, a identificação de proteínas-alvo que teriam seu perfil alterado no tecido hepático após exposição crônica ao fluoreto, poderia contribuir sobremaneira para o avanço do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de intoxicações crônicas por este elemento.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão Bibliográfica

A fim de facilitar a sua compreensão, este capítulo será dividido em diferentes tópicos, a saber:

2.1 Flúor

2.1.1. Características gerais e históricas

2.1.2. Utilização do fluoreto

2.2.Toxicidade do fluoreto

2.2.1.Toxicidade aguda

2.2.2 Toxicidade crônica

2.3 Análise proteômica

2.4 Fígado

2.4.1 Características gerais

2.4.2 Toxicidade do fígado x análise proteômica

2.1. Flúor

2.1.1 Características gerais e históricas:

O flúor parte da constituição do solo, da água e está associado a erupções vulcânicas. Em temperatura ambiente, encontra-se em estado gasoso, possui uma cor amarelo-pálido, é do grupo dos halogênios, tem número atômico 9 e peso atômico 19. Trata-se de um elemento que não é encontrado naturalmente na sua forma livre, ou seja, sempre está associado a outro elemento. Isso ocorre devido às suas características químicas, que lhe conferem uma grande eletronegatividade gerando uma considerável força de repulsão entre os dois átomos fazendo com que cada um deles se ligue mais facilmente a outro elemento químico qualquer (BUZALAF, 2008; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010). Por esta razão, referir-se-á neste trabalho não ao elemento flúor, mas sim ao íon fluoreto.

Apesar de ter sido descrito desde 1529 por Georgius Agricola, só em 1886 Henri Moissan isolou o gás F_2 . Porém o nome deste elemento foi dado antes mesmo da sua descoberta por André Ampere em 1812. Este pesquisador acreditava que o

flúor deveria ser um elemento químico muito parecido com o cloro. O nome vem do latim *fluere* (fluir), dado devido aos relatos de Georgius Agricola, que descreveu a utilização de CaF_2 como fundente de metais. Em 1670, Heinrich Schwanhard verificou que a fluorita (CaF_2) dissolvida em uma solução ácida poderia gravar o vidro. Depois de várias tentativas de muitos químicos, muitos dos quais acabaram pagando com a própria vida, na França, em 26 de junho de 1886, Moissan conseguiu, através da eletrólise do ácido fluorídrico anidro, misturado com o sal de potássio KHF_2 , utilizando um eletrodo de Pt (platina) e Ir (irídio) em um tubo no formato de U selado nas duas extremidades com CaF_2 , foi obtido o se obteve o gás F_2 . Devido a essa descoberta, aliada a outra, Moissan, em 1906, ganhou o Prêmio Nobel de Química (BUZALAF, 2008; PEIXOTO, 1998; OKAZOI, 2009).

2.1.2. Utilização do fluoreto

Com o domínio da produção de gás F_2 , foi possível a geração de vários compostos, dentre eles o urânio hexafluoreto (UF_6), que é o composto gasoso mais estável do urânio. Isto facilitou o enriquecimento do isótopo por difusão gasosa, para produção de energia nuclear e fins bélicos. O conhecimento deste composto serviu para a produção da bomba de Hiroshima e Nagasaki, na Segunda Guerra Mundial. Além disso, a General Motors, em 1928, a partir dos conhecimentos decritos por Moissan, começou a utilizar os freons (compostos orgânicos contendo cloro e fluoreto), também conhecidos como clorofluorocarbonos (CFCs), como líquidos de refrigeração. Até hoje, o freon-12 (CCl_2F_2), é usado com este intuito em aparelhos de ar condicionado doméstico e industrial e câmaras frigoríficas em geral. Há também o CCl_3F , o qual é utilizado como inseticida. Outros foram utilizados como propelentes na forma de *sprays* aerossóis. No entanto, já se sabe que alguns desses freons são os culpados na destruição da camada protetora de ozônio da Terra. Em 1938, a partir de um desses freons, R.J. Plunket desenvolveu o polímero politetrafluoretileno (PTFE), conhecido como teflon. Desta maneira, fica comprovada a importância do elemento flúor para a indústria (PEIXOTO, 1998; OKAZOE, 2009; BUZALAF, 2008).

Já nas primeiras décadas do século XX, começou-se a estabelecer uma relação entre a utilização de fluoreto e a redução da cárie dentária. Isto se deu através de observações feitas por McKay e Black, em 1916, de que pessoas que tinham nascido ou viviam desde pequenas em regiões que tinham a presença

natural de fluoreto na água de abastecimento possuíam alterações no esmalte levando a manchas, mas também tinham uma menor incidência de cáries dentárias (BUZALAF, 2008). Iniciaram-se, então, os estudos sobre este tema e hoje já se sabe que o fluoreto é muito importante no controle da cárie. Por este motivo, vários produtos de aplicação tópica de fluoreto foram desenvolvidos, dentre eles dentifrícios, soluções para bochechos e vernizes fluoretados (WONG et al., 2011). Além destes produtos designados à aplicação tópica, o fluoreto também tem sido utilizado em métodos sistêmicos, como a fluoretação artificial da água de abastecimento. Esta medida está associada a um aumento de crianças livres de cárie, bem como a uma diminuição de dentes afetados por esta doença (MCDONAGH et al., 2000).

Além do seu efeito benéfico no controle da cárie dentária, o fluoreto tem sido ainda utilizado como um agente terapêutico em mulheres para o tratamento de osteoporose pós-menopausa (BRIANCON; MEUNIER, 1981). Baixas doses de fluoreto (11-20 mg/dia) parecem diminuir o risco de fratura nas vértebras e aumentar a densidade mineral óssea na espinha dorsal, lombar e fêmur (REGINSTER et al., 1998). Entretanto, uma concentração de fluoreto na água de beber maior que 4,32 mgF/L aumentam 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). Assim, estudos ainda estão sendo realizados sobre este assunto com o intuito de verificar uma dose que gere um benefício maior com menor efeito colateral (MELLO; GOMIDE, 2005; AOBA, 1997; KLEEREKOPER, 1994).

2.2.Toxicidade do fluoreto

O fluoreto, apesar de seus importantes efeitos benéficos tanto a nível industrial quanto em Saúde Pública, quando ingerido em doses elevadas, à semelhança do que acontece com qualquer outro elemento, pode levar a efeitos colaterais. Isso pode ser facilmente constatado, pois como mencionado anteriormente, muitos químicos renomados vieram a óbito na tentativa de isolar o elemento flúor (BUZALAF, 2008; PEIXOTO, 1998).

A partir de uma administração sistêmica do fluoreto, o mesmo é facilmente absorvido pela mucosa gástrica, onde a absorção é tanto maior quanto menor for o

pH, já que as células possuem alta permeabilidade ao HF. O fluoreto que não for absorvido no estômago o será no intestino, onde a absorção não depende do pH, atingindo, desta maneira, a corrente sanguínea. Assim, logo após a ingestão, a concentração plasmática de fluoreto irá subir, atingindo um pico em 30 a 45 minutos. Do fluoreto circulante, uma grande parte será incorporada aos tecidos mineralizados, mas uma pequena parte será distribuída aos tecidos moles. Neste caso, o gradiente de pH entre os meios intra e extracelular irá governar a entrada ou a saída de fluoreto das células, sendo que este elemento sempre irá, na forma de HF, do compartimento mais ácido para o mais alcalino. O fluoreto absorvido que não for incorporado ao organismo será excretado pela via urinária, fenômeno este também dependente do pH da urina (WITFORD, 1996; BUZALF, 2008; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010). Com base nesta breve descrição do metabolismo do fluoreto, pode-se inferir que este elemento pode atingir todos os tipos de células, e, dependendo da sua concentração, da duração da ingestão, da solubilidade dos compostos que o contêm e também de fatores individuais, pode perturbar a homeostasia do organismo.

Uma vez que o fluoreto é ubiquamente disponível na natureza e em alimentos, além de ser adicionado a produtos odontológicos, esta grande disponibilidade pode permitir que ocorra uma ingestão excessiva deste elemento, podendo levar à ingestão de doses tóxicas (CHIOCA, LOSSO; ANDRATINI 2009).

Muitas pesquisas com modelos animais *in vivo*, estudos laboratoriais *in vitro* e até mesmo trabalhos feitos em humanos vêm demonstrando que o fluoreto tem um efeito tóxico, o qual está relacionado à quantidade e ao tempo de exposição e pode ser classificado como aguda ou crônica (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; HE; CHEN, 2006; MAMMA; SINHA; SIL, 2007; WITFORD, 1992).

2.2.1 Toxicidade aguda

Este tipo de toxicidade ocorre quando há uma ingestão de grande quantidade de fluoreto numa única vez. Relatos históricos revelam vários acidentes envolvendo toxicidade aguda por fluoreto, devido à ingestão acidental deste íon. Foi relatado que a ingestão acidental de fluoreto de sódio (NaF), substância com aparência similar ao leite em pó, levou à morte vários indivíduos em um Hospital em Oregon. No final do século 19 e começo do século 20, quando o fluoreto foi muito utilizado nas

residências como inseticida, vários casos de intoxicação aguda acidental aconteceram (WHITFORD, 1992). Também são descritos três casos de morte de crianças devido à ingestão de produtos odontológicos fluoretados (WHITFORD, 1992). Porém deve-se ressaltar que estes casos são raros e isolados. A dose letal estimada é entre 32 e 64 mg de fluoreto por kg de peso corporal (WHITFORD, 1992).

Os sinais e sintomas referentes a este tipo de intoxicação são: vômito com presença de sangue, diarreia, broncoespasmo, fibrilação ventricular, pupilas dilatadas, hemoptise, câibras, colapso cardíaco, hipercalemia, hipocalcemia e comprometimento da função renal (BUZALAF, 2008; WHITFORD, 1992, CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009).

Leite (2010) administrou doses únicas de 50 e 100 mg de fluoreto por Kg de peso corporal para ratos de 75 dias. Após duas horas foi feita eutanásia e os rins foram coletados para análise proteômica. Foram encontradas 192, 182 e 245 proteínas diferencialmente expressas quando foram comparados os grupos controle vs. 50 mgF/Kg, controle vs 100 mgF/kg e 50 vs 100 mgF/Kg, respectivamente. A maioria das proteínas identificadas estavam relacionadas às categorias metabolismo e energia, transporte, processos celulares, estrutura e organização celular e vias de informação. Adachi et al. (2007) também perceberam injúrias no rim de ratos provocadas por uma intoxicação aguda de fluoreto de cádmio em ratos, além de uma severa injúria no fígado, a qual foi atribuída a uma acidose metabólica.

Estes trabalhos são muito importantes, porque revelam casos de intoxicação extrema e ajudam a se compreender melhor os casos nos quais a intoxicação ocorre aos poucos, como quando se ingerem pequenas quantidades de fluoreto por um longo período tempo.

2.2.2 Toxicidade crônica

A toxidade crônica do fluoreto foi observada antes mesmo do conhecimento da utilidade deste íon para a prevenção da cárie dentária, quando se observou uma alteração do esmalte provocada por consumo de pequenas quantidades de fluoreto durante o desenvolvimento dos dentes, a fluorose dentária (BUZALAF, 2008). Acredita-se que a fluorose dentária aconteça quando há ingestão média diária de

fluoretos acima de 0,07 mg/Kg de peso corporal durante o período de formação dos dentes (BUZALAF, 2008). Uma ingestão crônica de doses maiores pode levar à fluorose esquelética, comum em regiões endêmicas nas quais a concentração natural de fluoreto na água de beber é superior a 5 mg/L de fluoreto (BUZALAF, 2008).

No entanto, além dos tecidos mineralizados, outros tecidos também podem ser atingidos por este íon já que a sua administração sistêmica oriunda de várias fontes pode levar a uma absorção e sua condução a todos os tecidos do organismo (CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009).

Quando se pensa em toxicidade dos fluoretos, o maior alvo dentre os tecidos moles são os rins, que são os responsáveis pela sua eliminação. Isso pode ser verificado através de vários tipos de análises. Dentre elas, análises histológicas têm revelado degeneração celular, alterações na morfologia e alinhamento dos túbulos renais, presença de vacúolos no tecido conjuntivo, infiltração de células inflamatórias e congestão vascular (OLGIVIE, 1953; KARAOZ et al., 2004; SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; KOBAYASHI et al., 2009). Análises proteômicas têm revelado alteração no perfil de várias proteínas e enzimas nos rins de ratos submetidos a doses crônicas de 5, 50 e 100 ppm de fluoreto a partir da água de beber (XU et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2009). Xiong et al. (2007) também concluíram que concentrações de fluoreto na água de beber por volta de 2 mg/L podem causar danos nas funções dos rins e também no fígado em crianças. Mamma; Sinha e Sil (2007) expuseram ratos a uma dose de 600 mgF/L através da ingestão de água por uma semana e verificaram uma significativa depressão da atividade em algumas enzimas antioxidantes no fígado e no rim.

Estudos vêm também demonstrando que, em concentrações milimolares, o fluoreto pode interferir em muitas funções celulares provocando efeitos citotóxicos em células dos ductos coletores renais e também inibindo severamente enzimas como as fosfatases tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CITTANOVA et al., 1996; ZAGER; IWATA, 1997; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010). Isso porque muitas fosfatases são extremamente sensíveis ao fluoreto, como a pirofosfatase inorgânica, a fosfatase ácida de células ósseas e a fosfatase ácida tartarato-resistente osteoclástica (BAYKOV et al., 1992; JANCKILA et al., 1992; PINKSE; MERKX; AVERILL, 1999; THOMAS et al., 1996). Já em concentrações micromolares o fluoreto tem um efeito anabólico promovendo a proliferação celular, bem como a

inibição de algumas enzimas em menor escala (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010; MENDOZA-SCHULZ et al., 2009). He e Chen (2006) concluíram que o excesso de fluoreto pode induzir a um estresse oxidativo, levando à apoptose e alteração do ciclo celular.

Em uma revisão recente, Barbier; Arreola-Mendoza e Razo (2010) relataram que o fluoreto pode interferir em uma grande gama de processos celulares, na expressão gênica, ciclo celular, tanto na proliferação quanto na migração celular, no metabolismo, no transporte iônico, nos processos de secreção, endocitose, apoptose, estresse oxidativo e que ainda estes processos estão envolvidos com uma grande variedade de vias de sinalização. Strunecka et al. (2007) também relataram que são várias as evidências demonstradas por trabalhos científicos que indicam que o fluoreto tem demonstrado ação sobre diversas moléculas e processos biológicos, e que algumas destas alterações se devem a uma ação sinérgica com o alumínio. Deve ser enfatizado que a ação do fluoreto irá depender da dose que é ingerida.

Deve ser ressaltado que a grande maioria dos estudos enfocando toxicidade crônica dos fluoretos investigou um pequeno número de proteínas e enzimas. Apenas cinco estudos até o momento fizeram uma avaliação mais global, utilizando análise proteômica. Estes estudos foram realizados em rins (XU et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2009), urina (KOBAYASHI et al., 2011), osteoblastos (XU; JING; LI, 2008). Não há nenhum trabalho utilizando tecido hepático, o que é de grande interesse, devido à importância deste órgão no metabolismo e a relatos de que o fluoreto pode provocar diversas alterações metabólicas.

2.3 Análise proteômica

A proteômica é uma ferramenta de análise que busca caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um momento específico e surge para complementar os estudos sobre a biologia molecular (SAVATO; CARVALHO, 2010). Esta nova área da Ciência começou em 1994, quando Marc Wilkins usou o termo “Proteoma” em público pela primeira vez (WILKINS et al., 1996), o qual pode ser definido como “a análise sistemática de proteínas em relação à sua identidade, quantidade e função” (PENG; GYGI, 2001).

A análise proteômica vem ganhando aumento de popularidade na última década (BANTSCHEFF et al., 2007). Isto aconteceu porque, com o grande desenvolvimento observado após a caracterização do genoma humano, percebeu-se que este conhecimento, apesar de extremamente relevante é limitado, pois se sabe que uma proteína pode ser originada a partir de diferentes genes, bem como um só gene pode dar origem a diversas proteínas. Além disso, podem ocorrer alterações pós-traducionais, as quais podem originar proteínas funcionalmente distintas a partir de um único gene. Por fim, mas não menos importante, as informações contidas no genoma podem em determinados momentos não serem expressas ou ainda serem expressas em excesso. Assim, a proteômica complementa as informações obtidas através da genômica (LEITE, 2010; BANTSCHEFF et al., 2007).

Uma análise proteômica convencional tem um fluxo de trabalhos caracterizado pela extração de proteínas a partir da amostra selecionada, (THONGBOONKERD et al., 2004), sua separação através de eletroforese bidimensional, quantificação e, por fim sua identificação (SAVATO; CARVALHO, 2010).

Na eletroforese bidimensional, a carga das proteínas e sua massa são utilizadas em duas etapas distintas: a focalização isoeletrica e a eletroforese em gel de poli-acrilamida, respectivamente, resultando em diferentes *spots* constituídos por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas (PENNINGTON; DUNN, 2001). A utilização de *softwares* de análise de géis confere uma maior confiança na determinação dos *spots*, permitindo a detecção de diferenças de expressão relativas de proteínas, ao se comparar o *spot* de um grupo com o mesmo *spot*, mas visualizado em outro grupo experimental (LÓPEZ et al., 2002).

A identificação das proteínas de interesse pode ser feita pela espectrometria de massas, após uma prévia digestão proteolítica que gera vários fragmentos de peptídeos. Estes serão ionizados, mais comumente por eletronebulização (*electrospray*) ou por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) (PENNINGTON, DUNN, 2001; PIERCE; CAI, 2004; SECHI, 2004). No final da ionização, a partir das relações massa/carga (m/z), há geração de espectros os quais são relacionados à variedade dos fragmentos *versus* a relação m/z , sendo então confrontados em bancos de dados para a identificação das proteínas (SAVATO; CARVALHO, 2010).

A partir desta ferramenta, podem-se gerar novas hipóteses e esclarecer melhor como o organismo se comporta, tanto em seu estado natural, quanto quando se encontra exposto a algum tipo de alteração. A partir do entendimento do estado de “normalidade” podem-se descobrir possíveis biomarcadores para o estado “anormal” e com isso identificar precocemente doenças, e originar novas terapias e fármacos. Assim, a utilização desta ferramenta em estudos toxicológicos é pertinente, tendo recebido a nomenclatura de “Toxiproteoma”, que tem como objetivo a identificação de proteínas alteradas e um melhor entendimento da química da toxicidade. Estas novas descobertas podem ser utilizadas para uma classificação dos agentes tóxicos em experimentos com animais, com o intuito de se verificarem possíveis riscos para a saúde. Esses dados podem ser utilizados no biomonitoramento da população humana, bem como para contaminantes ambientais (MERRICK, 2006).

A utilização da proteômica para avaliar a toxicidade do fluoreto é algo extremamente recente na literatura, constituindo-se num vasto campo para pesquisas. Xu et al. (2005) encontraram 141 spots com expressão aumentada e 8 com expressão reduzida em relação ao controle no rim de ratos que receberam uma dose de 100 mg/L de fluoreto através da água por 8 semanas. Dentre estas foram identificadas treze proteínas que estavam envolvidas com a proliferação celular, metabolismo e estresse oxidativo.

Kobayashi et al, (2009) também analisaram a expressão protéica diferencial em rins de ratos submetidos à ingestão crônica de fluoreto por 60 dias nas concentrações de 0, 5 e 50 mg/L administrado a partir da água de beber. Dentre as várias proteínas com expressão alterada que puderam ser identificadas, o achado mais interessante foi um aparente desvio metabólico induzido pelo fluoreto em alta dose, caracterizado por um declínio na expressão de proteínas relacionadas à glicólise e um simultâneo aumento nas proteínas relacionadas à β -oxidação de ácidos graxos. Já na urina foram encontrado 27 spots protéicos com expressão alterada, sendo identificadas duas proteínas, as quais estavam relacionadas à regulação de andrógenos e ao processo de desintoxicação (KOBAYASHI et al, 2011).

Xu; Jing e Li (2008) analisaram cultura de osteoblastos isolados de calvárias de ratos recém-nascidos. As células foram cultivadas na presença de 2 mg/L de

fluoreto por 72 horas e relataram alteração em 28 *spots* proteicos, sendo que 12 dos identificados estavam relacionados à proliferação celular, metabolismo e processos oxidativos.

Ge et al. (2011) realizaram análise proteômica em cérebros de ratos expostos a uma concentração alta de fluoreto (100 mg/L na água) e baixa de iodeto (<0,6 mg/L) e encontraram alteração em proteínas relacionadas com a sinalização celular, metabolismo energético e metabolismo protéico.

2.4 Fígado

2.4.1 Características gerais

O fígado é o maior órgão do corpo. Possui como unidade funcional o lóbulo hepático. Possui alta taxa metabólica, compartilha substratos e energia uma vez que recebe todos os nutrientes absorvidos no trato digestivo, processando-os, armazenando-os e sintetizando várias substâncias que são transportadas para outras regiões do corpo, além de neutralizar e eliminar substâncias tóxicas. Além disso, ele é responsável pela produção de proteínas plasmáticas e carreadoras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.4.2 Toxicidade no fígado x análise proteômica

O fígado é o primeiro sítio de metabolização de xenobióticos e também é o maior órgão de biotransformação e eliminação de substâncias estranhas do nosso corpo. Essa função lhe confere uma suscetibilidade maior para problemas com contaminantes, produtos naturais, agentes virais ou bactérias. Uma exposição crônica a xenobióticos, portanto, pode levar a vários prejuízos ou distúrbios no fígado (MERRICK, 2006).

Pelo fato de receber todas as substâncias absorvidas no trato gastrointestinal, o fígado acaba sendo um órgão de fácil acesso para qualquer composto, inclusive o fluoreto, o qual pode provocar alterações em suas funções. Essas alterações podem ser o resultado do próprio metabolismo do tecido hepático na tentativa de eliminar este ou outros compostos. Isto pode levar a uma disfunção celular gerando estresse oxidativo, e, dependendo de fatores genéticos poderá originar um estresse celular de maior ou menor extensão (STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010).

Alguns trabalhos mostram esta associação entre toxicidade crônica de fluoreto e aumento do estresse oxidativo no fígado em humanos e animais experimentais. Shanthakumari; Seshachalam e Subramanian (2004) observaram um aumento na concentração de TBARS e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado dos grupos de ratos tratados com 25 mg/L de fluoreto através da água de beber por 8 e 16 semanas. A exposição ao fluoreto também pode aumentar significativamente a atividade de enzimas como GPT, GOT e fosfatase alcalina, bem como a geração de radicais livres. Na análise histopatológica, os fígados dos grupos tratados apresentaram inflamação, infiltração nos hepatócitos e focos de necrose (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004). De acordo com Grucka-Mamczar et al. (2007) o fluoreto pode alterar o metabolismo de carboidratos no fígado inibindo a conversão de sorbitol a frutose, além de inibir a glicólise devido à sua ação sobre a enolase.

Michael et al. (1996) relataram que o fluoreto pode perturbar a síntese protéica, elevando as atividades de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que estão relacionadas ao metabolismo hepático. Xiong, et al. (2007) encontraram uma relação dose-resposta entre os níveis de fluoreto na água e danos na função hepática de crianças. Os autores observaram um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH), dosada a partir do soro de crianças que ingeriam água contendo mais que 2 mg/L de fluoreto. Com base nesses achados, os autores sugeriram que a ingestão de fluoreto em quantidades maiores que 2 mg/L poderia resultar em danos hepáticos.

Zhan et al. (2006) trataram porcos com 0, 100, 250 e 400 mg/kg de fluoreto, adicionado à ração por 50 dias, a fim de verificar alterações no sistema antioxidante hepático. Os autores observaram que os grupos tratados apresentaram uma diminuição significativa na atividade da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, quando comparados ao grupo controle.

A proteômica é de grande relevância para avaliar de maneira global estes eventos causados pelo fluoreto no tecido hepático, uma vez que as análises feitas até o momento estão relacionadas a análises específicas, buscando determinadas proteínas. Através desta nova ferramenta analítica se poderá fazer uma análise do perfil proteico relacionado a este tipo de toxicidade, e se ter assim mais informações sobre as alterações que podem ocorrer e possíveis biomarcadores para as mesmas,

os quais poderão ser utilizados como indicadores destas alterações de acordo com o tempo ou concentração que se expôs um indivíduo, possibilitando, com isso um diagnóstico precoce e mais preciso (MERRICK, 2006).

Amacher et al. (2005) utilizaram a análise proteômica com o intuito de achar biomarcadores no plasma associados com a toxicidade do fígado. Os autores identificaram as proteínas *paraoxanase*, *vitamin D-binding protein*, *celular retinol-binding protein*, *malate dehydrogenase*, *F-protein* e *purine nucleoside phosphorylase*, as quais foram confirmadas como biomarcadores no plasma para danos hepáticos em animais tratados com drogas. A partir desses resultados os autores concluíram que a proteômica pode ser aplicada para a identificação e também confirmação de proteínas periféricas que foram alteradas diante de exposições do fígado a agentes tóxicos.

Newton et al. (2009) utilizaram de um modelo de roedores para fazer uma análise proteômica do tecido hepático exposto a etanol e verificaram que houve uma diminuição nos níveis de proteínas com função de antioxidantes, o que pode estar relacionado à degradação de proteínas carbonatadas, em conjunto com a inibição da síntese e transcrição. A carbonilação da *Betaine-homocysteine-S-methyltransferase* durante a 3ª e 6ª semanas de exposição ao etanol sugere que a mesma poderia ser um biomarcador.

Yamamoto et al. (2006) investigaram a expressão protéica de quatro comprovados hepatocínicos, com o intuito de achar biomarcadores em comum. Foram encontradas 8 proteínas hepáticas alteradas, relacionadas ao estresse oxidativo, ao metabolismo energético e de lipídios e à β -oxidação de ácidos graxos, as quais são possíveis candidatas a biomarcadores para o desenvolvimento de estágio de pesquisas com drogas.

Ao se pensar em um órgão que poderia ser alvo de pesquisa em “Toxiproteoma”, o fígado certamente ocupa um papel central, uma vez que ele recebe, através da veia porta, todas as substâncias às quais o organismo é exposto durante a alimentação, tendo o importante papel de detoxificar o organismo. Entretanto, até o momento nenhum trabalho utilizou a proteômica como ferramenta para avaliar alterações em proteínas hepáticas devido à ingestão de fluoreto.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Neste trabalho foi avaliada a expressão protéica diferencial em fígado de ratos submetidos à exposição crônica pelo flúor, utilizando-se como ferramenta a análise proteômica, através de eletroforese bi-dimensional.

Para complementar também foi realizado a análise de concentração de flúor no fígado e no plasma, além de análise histológica nos fígados.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de facilitar a sua compreensão, este capítulo será dividido em diferentes tópicos, a saber:

4.1 Obtenção e tratamento dos animais

4.2 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

4.3 Dosagens de fluoreto

4.3.1 Plasma

4.3.2 Fígados

4.4 Processamento histotécnico

4.4.1 Determinações estereológicas nos cortes histológicos para a microscopia de luz

4.4.1.1 Casualização dos campos microscópicos

4.4.1.2 Avaliação morfométrica da densidade de volume (vvi), das estruturas glandulares e da densidade de volume nuclear (pn) e citoplasmático (pcit) do hepatócito.

4.5 Análise Proteômica

4.5.1 Extração de proteínas do fígado

4.5.2 Eletroforese bi-dimensional

4.5.2.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

4.5.2.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

4.5.3 Visualização e digitalização dos géis

4.5.4 Preparo das amostras para espectrometria de massa

4.5.5 Seqüenciamento das proteínas nos spectrometro de massa

4.5.6 Identificação das proteínas

4.1 Obtenção e tratamento dos animais

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da FOB-USP (Proc. 001/2009, ANEXO). Todos os animais (*Rattus norvegicus* Wistar machos recém-desmamados) foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo e permaneceram em caixas plásticas em grupos de 3 durante todo o período experimental.

Para a realização deste estudo foram utilizados 18 animais distribuídos em 3 grupos de 6 animais cada, os quais receberam, desde o desmame, durante 60 dias, água *ad libitum* com concentrações fixas de fluoreto, a saber: grupo I - 0 mg/L (controle); grupo II - 5 mg/L e grupo III - 50 mg/L fluoreto. Estas doses foram selecionadas por corresponderem, em humanos, a doses de 1 (concentração usualmente adicionada à água de abastecimento público) e 10 mg/L de fluoreto na água (concentração máxima de fluoreto presente naturalmente na água de algumas regiões onde ocorre fluorose endêmica), respectivamente (DUNIPACE et al., 1995). Os animais receberam AIN-93 (teor de fluoreto inferior a 3 µg/g). Isto foi necessário, pois em estudos prévios realizados em nosso laboratório, as rações comerciais apresentaram teores de fluoreto superiores a 20 µg/g (BUZALAF et al., 2004, 2005).

Doze horas antes da eutanásia, a água que era oferecida aos animais foi removida.

4.2 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Ao final do período experimental, os animais foram pesados (tabelas 1 a 3) e anestesiados por injeção intra-peritoneal de 0,5 mL/Kg de peso corporal de Anasedan (Agribands, USA) + 1,5 mL/Kg de peso corporal de Cloridrato de quetamina vetaset (Fort Dodge, Iowa, USA). Em seguida, a cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, e o coração foi puncionado com agulha para coleta do sangue colhido com uma seringa plástica heparinizada (uma gota de Heparina contendo 5.000 UI/mL), e transferido para tubos plásticos (tipo Eppendorf), homogeneizado e posteriormente centrifugado a 3000 rpm

por 5 minutos (Jouan A14) para obtenção do plasma. Foram coletados em média 3 mL de sangue, para obtenção de 1 mL de plasma.

Tabela 1. Peso corporal dos animais do grupo controle (I – 0 mg/L fluoreto)

Animal	Peso (g)
1	324,59
2	345,24
3	272,78
4	304,20
5	339,46
6	307,00

Tabela 2. Peso corporal dos animais do grupo experimental II (5 mg/L fluoreto)

Animal	Peso (g)
1	325,70
2	325,60
3	301,70
4	322,00
5	287,53
6	296,50

Tabela 3. Peso corporal dos animais do grupo experimental III (50 mg/L fluoreto)

Animal	Peso (g)
1	330,30
2	300,00
3	333,50
4	281,80
5	330,00
6	302,70

Os fígados foram coletados, pesados (tabelas 4, 5 e 6) e cada lobo foi cuidadosamente separado. O lobo mediano de cada fígado foi destinado à análise proteômica, sendo para isso dividido em vários pedaços, os quais foram lavados com tampão PBS gelado pH 7,4, contendo um coquetel com inibidores de proteases (complete ULTRA tablets, Mini, Roche Diagnostics), na proporção de 1 comprimido de coquetel para 50 mL de tampão. Após a lavagem, os fígados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. O lobo esquerdo foi destinado à análise de fluoreto, sendo armazenado a -20°C até a referida análise. Por fim, o lobo direito foi destinado à análise histológica, para a qual foi fixado em formalina tamponada a 10%.

Tabela 4. Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo controle (I - 0 mg/L fluoreto)

Fígado (g)	Lobo direito (g)	Lobo mediano (g)	Lobo esquerdo (g)
11,17	4,66	4,66	3,70
13,28	5,03	4,42	5,35
10,62	4,15	3,82	4,22
11,93	3,78	4,3	6,07
14,59	3,88	5,47	5,59
11,04	3,51	3,97	3,76

Tabela 5. Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo II (5 mg/L fluoreto)

Fígado (g)	Lobo direito (g)	Lobo mediano (g)	Lobo esquerdo (g)
11,74	3,50	3,90	4,00
10,90	3,01	4,18	3,90
15,78	4,06	4,00	5,46
13,33	4,47	3,45	4,73
10,12	2,63	3,37	3,84
10,64	3,28	3,30	4,06

Tabela 6. Peso dos fígados e lobos coletados dos animais do grupo experimental III (50 mg/L fluoreto)

Fígado (g)	Lobo direito (g)	Lobo mediano (g)	Lobo esquerdo (g)
13,61	4,00	4,17	4,45
11,75	3,31	3,96	4,33
13,31	3,66	5,26	4,06
11,20	3,50	3,76	3,50
12,01	3,38	4,00	4,55
10,16	3,60	2,97	3,52

4.3 Dosagens de fluoreto

4.3.1 Plasma

Para análise do fluoreto no plasma, 200 μ L do mesmo foram inicialmente submetidos a uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada na placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi adicionado ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que correspondia a 15% 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 fluoreto residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO_2 , o volume das mesmas então foi completado para 2 mL com água deionizada e a difusão seguiu normalmente como descrita por Taves (TAVES, 1968), modificado por Whitford (WHITFORD, 1996).

Para a difusão, 50 μ L de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas 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 combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M, e o volume total foi ajustado para 75 μ L com água deionizada, usando uma pipeta automática Gilson (10-100 μ L). A gota, contendo todo o fluoreto, foi analisada com eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catalogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940, sendo estes mantidos unidos através de bandas de borracha durante a leitura, e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa, conforme mostrado na figura 1.

Figura 1. Sequência da dosagem de fluoreto nas amostras de plasma e fígado. Em **a** placas de Petri contendo as amostras a serem analisadas juntamente com a tampa perfurada contendo as gotas de NaOH; em **b** o HMDS é adicionado e então as placas são seladas com vaselina; em **c** as gotas de NaOH são unidas após a difusão; em **d**, a leitura com auxílio de um eletrodo íon específico 9409 acoplado a um eletrodo calomelano de referência.

4.3.2 Fígados

Após pesagem, os fígados foram homogeneizados em água ultrapura na proporção de 200 mg de tecido para 0,5 mL de água, utilizando o Homogenizador Marconi, modelo MA 102. A homogenização foi conduzida por 2 min como demonstrado na figura 2. Para análise de fluoreto no fígado, foi utilizado um volume da amostra correspondente a 500 mg de tecido hepático. Esses volumes foram pipetados em uma placa de Petri (Falcon 1007) e foram submetidos à difusão facilitada por HMDS como descrito para o plasma, porém sem a realização da pré-difusão.

Figura 2. Homogeneização do tecido hepático para determinação da concentração de fluoreto.

4.4 Processamento histotécnico

Após a determinação da massa do órgão, os fígados ($n = 6/\text{grupo}$) foram fixados em solução de formalina 10% tamponada, por 1 semana, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em água corrente e processados histologicamente com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec (parafina + resina plástica).

Cortes longitudinais de 5 μm de espessura foram obtidos dos fígados em micrótomo da marca Microm, modelo HM 340 E, com um intervalo de 100 μm entre os cortes. As lâminas ficaram aproximadamente 3 h na estufa a 60°C e depois foram coradas com soluções de Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968).

4.4.1 Determinações estereológicas nos cortes histológicos para a microscopia de luz

4.4.1.1 Casualização dos campos microscópicos

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos – estatísticos, derivados da probabilidade em que imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto central nestes métodos está na casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste (Lóbulo Direito), a qual deve ser realizada por meio de um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem. Isto é conseguido

pela aplicação do procedimento de casualização em todos os estágios do experimento, desde a escolha dos animais, secção da amostra e inclusão (Lóbulo foi dividido em 3 fragmentos conforme esquema da Figura 3), seleção das lâmina e, principalmente, da seleção dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações.

Figura 3. Lâmina de vidro contendo os 3 fragmentos obtidos para o lóbulo direito do fígado

De cada lóbulo direito, foram obtidas 6 lâminas, contendo um corte semi-seriado (distância de cada corte foi de 100 μ m). Por meio de sorteio, foi escolhida uma lâmina.

Para a escolha dos 30 campos microscópicos por fragmento (90 campos/lóbulo), foi utilizado um esquema de casualização sistemática (Figura 4) segundo as indicações de Weibel (1969). Nesse esquema, os campos microscópicos são escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico sejam representadas.

4.4.1.2 Avaliação morfométrica da densidade de volume (vvi), das estruturas glandulares e da densidade de volume nuclear (pn) e citoplasmático (pcit) do hepatócito.

Esses parâmetros histológicos foram avaliados com uma objetiva de imersão de 100X e um graticulo de integração II Zeiss® (Figura 4) colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo é superposta, sucessivamente, a 90

campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969), e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (P_i) que caíram sobre as estruturas hepáticas (hepatócito, veia centro lobular, sinusóide, espaço porta e infiltrado do espaço porta e outras estruturas) (i) e sobre o lóbulo inteiro (P); b) número de pontos que caíram sobre o núcleo (P_n) e sobre o citoplasma (P_{cit}) dos hepatócitos.

A partir destes dados, foram calculadas as seguintes dimensões morfométricas para as estruturas (WEIBEL, 1969): a) densidade de volume (V_{vi}), $V_{vi} = P_i/P$; e c) densidade de volume dos núcleos (p_n), $p_n = P_n/(P_n + P_{cit})$ e do citoplasma (p_{cit}), $p_{cit} = 100\% - p_n$.

O coeficiente de variação da média, ou “erro”, associado à avaliação da densidade de volume (V_{vi}), foi determinado pela aplicação da relação Schaefer (1970), a saber: $e = 1 - V_{vi}/P \times V_{vi}$.

Figura 4 - Graticulo de integração II Zeiss® sobre a imagem de um corte histológico

Para análises de morfometria, foi utilizado um microscópio de fluorescência Diaplan Leitz- Wetzlar- Alemanha (Figura 5).

Figura 5 microscópio de fluorescência Diaplan Leitz- Wetzlar- Alemanha

As fotomicrografias foram obtidas no Fotomicroscopio Olympus BX50 acoplado ao microcomputador Pentium III.

4.5 Análise Proteômica

4.5.1 Extração de proteínas do fígado

Previamente à extração das proteínas, as amostras foram homogeneizadas em moinho criogênico, modelo 6770 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, EUA) (figura 6 - A). Para isso, as amostras foram fracionadas em fragmentos de um centímetro de acordo com a orientação dos fabricantes, colocadas em tubos de policarbonato (figura 6 - B), nos quais os fragmentos foram triturados com 15 batimentos por segundo, 3 ciclos de 2 min com 1 min de intervalo e um pré-congelamento inicial de 1 min proporcionado pelo N₂

que previne a degradação de componentes da amostra e a mantém em baixa temperatura (figura 6 - C e D). Ao final do processo, obtiveram-se amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo.

Figura 6 - Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A – Moinho criogênico; B – Tubo de policarbonato; C – Colocação da amostra no moinho criogênico; D – Colocação do N₂.

Após homogeneização, foi adicionado um tampão de extração contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, ditiotretitol (DTT) 1%, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e um coquetel de inibidores de proteases. Após 1 h de incubação em gelo, misturando ocasionalmente, o homogenato foi centrifugado a 15 000 rpm por 30 min a 4°C (Sorvall) e o sobrenadante coletado.

Para remover o excesso de sais, açúcar, ácido nucléico e lipídeos, utilizou-se o *PlusOne 2D Clean-up kit*, contendo precipitante, co-precipitante, *wash buffer* e *wash additive* (GE Healthcare). Todas as etapas foram realizadas com os tubos em gelo. O *wash buffer* foi resfriado a -20°C por pelo

menos 1 h. Foi utilizado um volume de amostra de 200 μ L, seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante.

Após precipitação e limpeza, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 μ L de solução de re-hidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e 0,002 % de azul de bromofenol, e no momento do uso, foram adicionados 7 mg de DTT para cada 2,5 mL de tampão de re-hidratação.

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o kit *Biorad Protein Assay* (Biorad) baseado no método de Bradford (BRADFORD 1976) em triplicata. Para cada reação utilizaram-se 2 μ L de amostra e 1,0 mL do reagente de coloração. Após homogeneização, cada reação foi transferida para cubetas de vidro, seguida de leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O valor obtido foi então interpolado em uma curva de calibração, previamente estabelecida, utilizando-se da mesma metodologia para concentrações conhecidas da proteína padrão BSA (albumina do soro bovino). A concentração de proteína em μ g/ μ L encontrada para cada amostra do fígado está demonstrada na terceira coluna da tabela 7.

Após quantificação, cerca de 1000 μ g de proteínas de cada um dos seis animais de cada grupo foram combinadas para formar um *pool*, totalizando 3 amostras. Cada uma delas foi novamente quantificada, com o intuito de se obter um volume contendo 1000 μ g em cada *pool*, a serem carregadas na eletroforese bidimensional (tabela 8). Tal procedimento foi realizado para minimizar a variabilidade individual (TILTON, et al. 2007).

Tabela 7. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em 2 μL de homogenato hepático e volume equivalente a 1000 μg de proteínas para confecção do *pool* proteico.

Grupos	[proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Vol. (μL) equivalente a 1000 μg
0mg/L	34,45	58,05
	37,15	53,84
	40,97	48,82
	39,87	50,17
	23,04	86,79
5mg/L	35,04	57,07
	37,47	53,38
	37,12	53,87
	45,58	43,88
	25,44	78,60
	42,50	47,06
50mg/L	38,18	52,39
	40,37	49,54
	27,71	72,18
	33,40	59,88
	37,47	53,38
	38,56	51,86

Tabela 8. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no *pool* dos homogenatos hepáticos e volume (μL) equivalente a 1000 μg de proteínas, a serem carregadas na eletroforese bidimensional.

Grupos	[proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Vol. (μL) equivalente a 1000 μg
0 mg/L	34,22	58,44
5 mg/L	47,99	41,67
50 mg/L	37,97	52,68

4.5.2 Eletroforese bi-dimensional

As amostras foram corridas em tiras IPG de 24 cm (GE Healthcare), e os géis da segunda dimensão corridos no sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare), proporcionando maior agilidade e precisão nas análises, uma vez que o aparelho permite a corrida de até seis géis distintos, minimizando as diferenças verificadas quando géis 2-DE são obtidos individualmente ou em duplicatas.

4.5.2.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (GE Healthcare), como mostrado na figura 7. A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com tiras IPG de 24 cm e gradiente de pH 3-10 linear.

As tiras IPG foram re-hidratadas durante 15 h a 20°C em 400 μL de solução de re-hidratação contendo aproximadamente 1000 μg de proteínas. Sobre as fitas IPG acrescentaram-se 3 mL de óleo mineral (*cover Fluid*, GE Healthcare) para evitar evaporação dos reagentes durante a re-hidratação. A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 10000 V até atingir 40000 V.

Figura 7. Focalização isoeétrica no Ettan IPGphor 3 e o *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (GE Healthcare).

4.5.2.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Após a focalização, as tiras foram removidas do *manifold*, lavadas com água deionizada e equilibradas em uma solução tampão contendo DTT 1 % (p/v) por 15 min, e em seguida, para alquilação, no mesmo tampão contendo iodoacetamida 2,5 % (p/v) por 15 min.

A segunda dimensão foi conduzida no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare) em géis SDS-PAGE 12,5% (255 mm X 200 mm X 1,5 mm), como mostrado na figura 8. Foi utilizado padrão de ampla faixa de massa molecular (14 a 200 KD, *Broad range molecular weight*, Bio-rad). Inicialmente foi realizada uma pré-corrida com 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 h, para migração das proteínas da tira IPG para o gel, e em seguida uma corrida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel.

Figura 8- Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare).

4.5.3 Visualização e digitalização dos géis

As proteínas separadas por 2DE foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250* (USB, Cleveland, OH, EUA), realizada de acordo com o protocolo de Candiano e colaboradores (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE, 2004). Para isso, ao fim da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora contendo ácido fosfórico 1,3% e metanol 20% durante 1 h, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e lavar os anfólitos. Então, os mesmos foram lavados com água deionizada e deixados por 24 h em solução de coloração contendo 10% de ácido fosfórico, 10% de sulfato de amônio, 0,12% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20% de metanol. Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 7%. Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan 6.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no *ImageScannerTM III* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Para a análise das imagens, foi adotado o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

A detecção dos *spots* e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros: *smooth* = 2, área mínima = 6 e *saliência* = 300. Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o “*match gels*”, uma comparação entre os *spots* das réplicas de cada grupo.

Após esse passo, foram realizadas correções com a adição e remoção manual dos *spots*. Com as correções devidamente efetuadas, procedeu-se à análise das classes, que forneceu a diferença estatística entre os grupos experimentais.

Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para determinar diferenças na expressão proteica, foram consideradas as alterações no valor de % de volume. O uso da % de volume implica na normalização do *spot*, pois para calcular a % de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

4.5.4 Preparo das amostras para espectrometria de massa

Após análise pelo *software*, os *spots* de interesse foram excisados dos géis e preparados para espectrometria de massas de acordo com Andrade (ANDRADE, 2006). Para isso, duas folhas brancas de EVA foram coladas sobre uma bancada com boa iluminação, e em cima destas, foram posicionadas três placas de vidro. As triplicatas de cada grupo foram então posicionadas sobre cada placa e com o auxílio de ponteiros universais de 1000 μL e 200 μL , das quais as pontas foram retiradas em diferentes alturas para proporcionar diferentes diâmetros, os *spots* foram excisados (figura 9). As peças excisadas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5% e armazenadas a 4°C até o passo seguinte.

Figura 9- Excisão e recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa. Os *spots* provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com lâmina de bisturi.

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

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos a redução e alquilação. Para isso, foram inicialmente reidratados com DTT 20 mM em AMBIC 50 mM sob incubação por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por iodoacetamida (IAA) 55 mM em AMBIC 50 mM. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 min para

que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37 °C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi um ULTRA-SOM de banho (Branson, modelo 2510, Danbury, CT, EUA) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então o tubo foi armazenado a -20 °C até a realização do sequenciamento,

4.5.5 Sequenciamento das proteínas nos espectrometro de massa

sequenciamento das proteínas de interesse foi realizado na plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Q-TOF Ultima API (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado ao sistema nanoAcquity Ultra Performace LC (Waters, Milford, MA, EUA). Para isso, os peptídeos foram solubilizados em 12 µL de ácido fórmico a 0,1%, transferidos para os tubos específicos e levados ao equipamento. Uma alíquota de 4,5 µL da mistura de peptídeos resultante foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) numo nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplado ao espectrômetro de massas com fonte nanoelectrospray a um fluxo de 0.6 mL/min. O gradiente foi 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% por 10 minutos. O equipamento foi operado no modo “top three”, no qual é obtido um espectro de massa seguido pr MS/MS dos 3 picos mais intensos detectados. Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx v.4.1 e os arquivos brutos foram convertidos para o formato mgf através do software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) e submetidos à base de dados Rat International Protein Database (IPI) v. 3.73 (release 2010, June; 39711 sequences; 21109946 residues) usando a ferramenta de busca

MASCOT v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), tendo como modificação fixa a carbamidometilação e modificação variável a oxidação da metionina, um resíduo perdido da clivagem por tripsina e tolerância de 0,1 Da tanto para os resíduos precursores quanto para os resíduos já fragmentados (HANNA et al., 2000).

4.5.6 Identificação das proteínas

Os espectros gerados no massa para os peptídeos referente a cada amostra foram analisados utilizando o algoritmo do programa MASCOT MS/MS Ion Search v.1.9. (matrixscience.com). O princípio da análise é a comparação dos espectros dos peptídeos com as sequências de aminoácidos de proteínas que estão relacionadas em bancos de dados.

4.6 Análise estatística

Para análise de fluoreto no plasma e fígado, foi utilizado o software *GraphPad InStat* versão 3.01 para Windows. Inicialmente foi checada a normalidade (teste de *Kolmogorov-Smirnov*) e a homogeneidade dos dados (teste de *Bartlett*). Para o plasma, os dados passaram no teste de normalidade, mas não no teste de homogeneidade. Após transformação logarítmica, os dados foram analisados por ANOVA, seguida pelo teste de *Tukey* para comparações individuais. No caso do fígado, os dados passaram tanto no teste de normalidade e homogeneidade e foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* para comparações individuais. O nível de significância adotado em todos os casos foi 5%.

Para verificar a diferença estatística entre os *spots* foi realizado o teste de ANOVA através do programa *ImageMaster 2D platinum* versão 7.0. O nível de significância adotado também foi de 5%.

Resultados e Discussão

5. REULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de facilitar a sua compreensão, este capítulo será dividido em diferentes tópicos, a saber:

5.1 Análise de fluoreto

5.2 Análise Histológica

5.3 Análise proteômica

5.3.1 Análise das imagens

5.3.2 Análise comparativa entre os grupos

5.3.3 Proteínas identificadas

5.3.3.1. Proteínas relacionadas ao transporte

5.3.3.2 Proteínas relacionadas à estrutura e organização estrutural

5.3.3.3 Proteínas relacionadas aos processos celulares

5.3.3.4 Proteínas relacionadas às vias de informação

5.3.3.5 Proteínas relacionadas ao metabolismo

5.3.3.5.1 Metabolismo de carboidratos

5.3.3.5.2 Metabolismo de lipídios

5.3.3.5.3 Metabolismo de aminoácidos

5.3.3.5.4 Metabolismo energético

5.3.3.5.5 Miscelânea

5.1 Análise de fluoreto

A tabela 9 mostra os valores da concentração média de fluoreto encontrada no plasma e nos fígados dos animais, em função da concentração de fluoreto administrada.

Para o plasma, foi observado um efeito dose-resposta após a administração de fluoreto. As concentrações médias de fluoreto ($\pm$ DP) encontradas foram: $0,019 \pm 0,001$, $0,026 \pm 0,007$ e $0,072 \pm 0,013$ $\mu\text{g/mL}$ para os grupos controle, 5 e 50

mg/L fluoreto, respectivamente. A ANOVA, após transformação logarítmica, revelou diferenças significativas entre os grupos (fluoreto=83,631, $p<0,0001$). O teste de *Tukey* encontrou diferenças significativas para todas as comparações ($p<0,05$), ou seja, grupo controle x grupo 5 mg/L fluoreto, grupo controle x grupo 50 mg/L fluoreto e grupo 5 mg/L fluoreto x grupo 50 mg/L fluoreto. Kobayashi et al. (2009), num estudo com protocolo de tratamento dos animais semelhante ao utilizado no presente trabalho, não encontrou diferença significativa entre os grupos controle e 5 mg/L fluoreto, embora este tenha apresentado o dobro da concentração de fluoreto quando comparado àquele. A ausência de diferença significativa na concentração de fluoreto encontrada no plasma entre o grupo controle e o grupo que recebeu baixa concentração de fluoreto através da água também foi observado por Carvalho; Oliveira; Buzalaf (2006) e Leite et al. (2007). Entretanto, nestes dois últimos estudos esta ausência de diferença significativa foi relacionada à utilização de uma ração comercial da marca Purina, que continha altos níveis de fluoreto, ou seja, concentração superior a 20 mg/Kg (BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2005).

As concentrações médias ($\pm$ DP) de fluoreto encontradas no tecido hepático foram $0,042\pm0,016$, $0,034\pm0,021$ e $0,059\pm0,006$ μ g/g para os grupos controle, 5 e 50 mg/L fluoreto, respectivamente (Tabela 9). A ANOVA detectou diferenças significativas entre os grupos ($F=3,783$, $p=0,047$) e o teste de *Tukey* revelou que a diferença só foi significativa para o grupo 5 mg/L fluoreto comparado ao 50 mg/L fluoreto, que apresentaram o menor e o maior valor, respectivamente. Dentre as possíveis causas para uma ausência de dose-resposta nas concentrações hepáticas de fluoreto poder-se-ia pensar em problemas analíticos, mas este não foi o caso, uma vez que as curvas de calibração estavam adequadas, bem como a repetibilidade (análises em duplicata) e a reprodutibilidade das leituras. Por outro lado, as concentrações hepáticas de fluoreto refletem o nível plasmático, mas são em geral 50% inferiores a este (WHITFORD, 1996), o que poderia ajudar a explicar a ausência de diferenças significativas entre os grupos. Tsunoda et al. (2005) também não encontraram diferença significativa entre as concentrações de fluoreto encontradas no fígado dos animais do grupo controle e daqueles que receberam 5 e 25 mg/L fluoreto através da água durante 1 mês. Os autores só observaram aumento significativo neste parâmetro quando foi administrada uma concentração de fluoreto de 125 mg/L, bem maior que a empregada no presente estudo. Também

Inkielewicz & Krechniak (2003) não encontraram diferença significativa na concentração de fluoreto encontrada no tecido hepático entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam 5 ou 25 mg/L fluoreto através da água durante 2, 4 ou 12 semanas. Deve ser ressaltado que a dose-resposta observada na concentração de fluoreto observada no plasma dos animais confirma que o tratamento dos mesmos com a água fluoretada foi efetivo.

Tabela 9. Concentração média ($\pm$ DP) de fluoreto no plasma e fígado dos animais, após administração de fluoreto

Dose de fluoreto administrada (mg/L)	[Fluoreto] no plasma $\mu\text{g/mL}$	[Fluoreto] no fígado $\mu\text{g/g}$
Controle	0,019 $\pm$ 0,001 ^a	0,042 $\pm$ 0,016 ^{ab}
5	0,026 $\pm$ 0,007 ^b	0,034 $\pm$ 0,021 ^a
50	0,072 $\pm$ 0,013 ^c	0,059 $\pm$ 0,006 ^b

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA após transformação logarítmica para o plasma e ANOVA para o fígado, $p < 0,05$) $n=6$.

5.2 Análise Histológica

Com o intuito de se verificarem possíveis alterações histológicas induzidas pelo fluoreto, as lâminas de tecido hepático obtidas foram submetidas a análise morfométrica (Tabela 10). Na comparação entre os grupos, onde cada estrutura foi analisada separadamente, a ANOVA não detectou diferenças significativas nas porcentagens de hepatócitos ($F=0,009$, $p=0,990$), veia centro lobular ($F=0,623$, $p=0,549$), infiltrado do espaço porta ($F=0,750$, $p=0,437$), espaço porta ($F=0,417$, $p=0,666$), sinusoides ($F=0,333$, $p=0,722$) e outras estruturas ($F=1,124$, $p=0,351$) existentes no tecido. Foi observada uma pequena redução dose-dependente na porcentagem de núcleo existente nos hepatócitos, e ao mesmo tempo um aumento dose-dependente na porcentagem de citoplasma nestas células. Isto resultou em uma diminuição dose-dependente na relação núcleo/citoplasma (Tabela 11), entretanto, sem diferenças significativas entre os grupos ($F=2,879$, $p=0,087$). Talvez um aumento no número amostral (no presente trabalho o n foi igual a 6) em trabalhos futuros permita que sejam detectadas diferenças significativas para este

parâmetro. Na literatura não foram encontrados estudos relacionando o volume ocupado pelo núcleo e pelo citoplasma em hepatócitos. Entretanto, um estudo feito com cultura de secções dentárias de ratos observou uma diminuição na relação citoplasma/núcleo dos odontoblastos quando foi feito tratamento com 6 mM (114 ppm) de fluoreto por 14 dias (MOSELEY et al., 2003). As diferenças entre estes resultados e aqueles encontrados no presente trabalho podem ser devidas ao diferente tipo celular avaliado (odontoblastos X hepatócitos), bem como à alta dose (114 ppm de fluoreto) empregada no estudo com cultura de células. As doses utilizadas em sistemas de culturas de células deveriam mimetizar as doses que são encontradas no fluido extra-celular, que são, em geral, similares às aquelas observadas no plasma (WHITFORD, 1996).

Shanthakumari, Seshachalam e Subramanian (2004) relataram a presença de infiltração e inflamação e uma necrose local nos fígados de ratos tratados com 25 mg/L de fluoreto por 8 semanas. No entanto, no presente trabalho, nas concentrações de 5 mg/L e 50mg/L fluoreto administrado aos animais por período de tempo semelhante, não foram encontradas as alterações acima citadas, como pode ser corroborado nas fotomicrografias (Figuras 10 e 11). No presente estudo, os animais utilizados possuíam 21 dias quando a administração de fluoreto foi iniciada e no trabalho de Shanthakumari; Seshachalam e Subramanian (2004) a idade dos animais quando do início do tratamento com fluoreto não foi relatada. Dabrowska; Letko e Balunowska (2006), ao estudarem as mudanças histológicas nos fígados dos ratos tratados com 10,6 mg/L de fluoreto desde a vida intra-uterina, relataram que ratos com idade entre 60 e 90 dias quando os fígados foram coletados para análise, apresentavam uma estrutura deste órgão normal. Já quando os fígados foram coletados quando os animais tinham 30 dias, foram encontrados vacúolos degenerados e necrose, assim como nos animais de 120 dias, nos quais se verificou uma degeneração vacuolar persistente, principalmente nos hepatócitos da periferia. De acordo com os autores, para o período de 60 e 90 dias houve uma diminuição das mudanças morfológicas no fígado dos ratos que receberam continuamente NaF, possivelmente resultado de um mecanismo de adaptação do organismo ao fluoreto. Também tem sido relatado que concentrações mais altas de fluoreto são necessárias para reduzir o número de células senescentes viáveis quando comparadas a células mais jovens, indicando que, com o envelhecimento, as células

se tornam resistentes à citotoxicidade induzida pelo fluoreto (SATO et al., 2005). Estes achados poderiam ajudar a explicar o fato de, no presente trabalho, não ter sido observada alteração estrutural nos hepatócitos, já que os animais tinham aproximadamente 80 dias de vida no momento da coleta dos fígados.

Tabela 10. Comparação das porcentagens médias ($\pm$ DP) de cada estrutura avaliada através de análise morfométrica nos diferentes grupos ($n=6$)

Grupo	Hepatócitos	Sin	EP	IEP	VCL	Outros
0 mg/L	71,9 $\pm$ 6,1	12,1 $\pm$ 3,3	8,6 $\pm$ 3,6	0,2 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 3,0	2,2 $\pm$ 0,5
5 mg/L	72,3 $\pm$ 5,5	11,0 $\pm$ 1,4	8,6 $\pm$ 3,4	0,2 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 3,5	2,2 $\pm$ 0,5
50 mg/L	72,1 $\pm$ 4,4	11,2 $\pm$ 2,2	7,2 $\pm$ 1,6	0,3 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 3,9	1,9 $\pm$ 0,4

Tabela 11. Comparação das porcentagens média ($\pm$ DP) do núcleo e citoplasma no hepatócito, avaliadas através de análise morfométrica nos diferentes grupos ($n=6$)

Grupo	%Núcleo	%Citop	Relação N/C Hepatócito
0 mg/L	9,8 $\pm$ 1,8	90,2 $\pm$ 1,8	0,114 $\pm$ 0,020
5 mg/L	8,5 $\pm$ 1,4	91,5 $\pm$ 1,4	0,096 $\pm$ 0,019
50 mg/L	7,9 $\pm$ 1,5	92,2 $\pm$ 1,5	0,086 $\pm$ 0,020

Figura 10. Fotomicrografia dos fígados de ratos tratados cronicamente com água contendo diferentes concentrações de fluoreto visão panorâmica das estruturas EP (espaço porta), S (sinusóides) e H (Hepatócitos). indicando morfologia normal em **A** -, grupo controle, **B** - grupo de 5mgF/L e **C** - grupo de 50mgF/L.

Figura 11. Fotomicrografia dos fígados de ratos tratados cronicamente com água contendo diferentes concentrações de fluoreto visão panorâmica da estrutura VC (veia centro lobular) indicando morfologia sem alterações nos grupos: **A** - grupo controle, **B** - grupo de 5 mgF/L e **C** - grupo de 50 mgF/L.

Um achado histológico bastante interessante, particularmente quando associado aos achados proteômicos que serão descritos a seguir, foi a observação, embora rara, de inclusões lipídicas (esteatose macrovesicular) sem ocorrência de inflamação no grupo que recebeu 5 mg/L de fluoreto. Estas inclusões foram encontradas em maior quantidade em algumas regiões no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto (Figura 12). Shanthakumari, Seshachalam e Subramanian (2004) também encontraram inclusões lipídicas (bolhas com presença de inflamação) nos hepatócitos após um período de 16 semanas de administração de água de beber com 25 mg/L de fluoreto, classificadas como esteato-hepatite não alcoólica. O espectro histológico da doença de gordura no fígado não alcoólica inclui formas diversas de esteatose macrovesicular na forma de gotas pequenas e grandes, com ou sem inflamação lobular e no espaço porta (caso encontrado no presente estudo), seguida por esteato-hepatite, caracterizada por esteatose, inflamação e injúria celular, ou seja, esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Acredita-se que a progressão da fibrose e remodelação arquitetural ocorra em 10-15% dos casos de NASH, e cirrose em cerca de 15-25%, a qual pode levar a carcinoma hepatocelular (BRUNT; TINIAKOS, 2010; BUGIANESI et al., 2002; PALEKAR et al., 2006; HÜBSCHER, 2006).

O acúmulo de lipídio pode ser resultado de um distúrbio de um balanço entre o fornecimento, formação, consumo e oxidação hepática ou eliminação de triglicerídeos (PASCHOS; PALETAS, 2009). Esta alteração está intimamente relacionada a distúrbios no metabolismo, principalmente aqueles envolvendo estresse oxidativo e, conseqüentemente, peroxidação lipídica (PASCHOS; PALETAS, 2009; HÜBSCHER, 2006). Tem sido relatado aumento de peroxidação lipídica em fígado e rins de ratos expostos cronicamente ao fluoreto (KARAOZ et al., 2004; SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004). Em adição, estudos proteômicos de tecido renal têm relatado aumento na expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos (*propionyl-CoA carboxylase* e *enoyl coenzyme A hydratase*) em ratos submetidos cronicamente a altas doses de fluoreto através da água (50 a 100 ppm) (KOBAYASHI et al., 2009; XU et al., 2005). A expressão aumentada destas enzimas em tecido renal poderia estar relacionada a um aumento no

metabolismo de ácidos graxos, o que poderia estar ocorrendo também no fígado, ajudando a explicar estes achados histológicos.

Figura 12. Fotomicrografias de fígado de ratos apresentando inclusões lipídicas (IL) nos grupos de 5 mg F/L (**B**) e 50 mg F/L (**C**). No grupo controle (**A**) não se observam estas inclusões.

5.3 Análise proteômica

5.3.1 Análise das imagens

A boa reprodutibilidade dos géis bidimensionais, ou seja, a semelhança do perfil proteico entre as réplicas é essencial para a análise comparativa dos mesmos, pois possibilita a visualização dos perfis proteicos diferentes e facilita a sobreposição das imagens feitas no programa de análise dos géis. De maneira geral, o protocolo de extração escolhido foi bastante satisfatório e apesar de ser um método longo e laborioso, possibilitou a remoção de uma grande quantidade de interferentes, garantindo géis de boa qualidade, o que pode ser observado através da presença de proteínas ácidas, básicas, de alta e de baixa massa molecular. Ainda no intuito de se obterem boas réplicas, foi feita uma combinação de amostras de seis animais diferentes, como sugerido por Tilton et al. (2007), o que possibilitou a obtenção de géis bastante semelhantes. Obtiveram-se um total de 12 géis, dos quais foram separados para análise, 3 géis de cada condição (Figura 13).

Figura 13 – Perfil proteico representativos de proteínas hepáticas de ratos dos grupos controle (I), grupo tratado com 5 mg/L de fluoreto (II) e grupo tratado com 50 mg/L de fluoreto (III). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.

Após a detecção automática realizada pelo *software Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*, que resultou em um total de 440 *spots* detectados para o grupo I, 401 para o grupo II e 405 para o grupo III. Depois de realizada a detecção, foram efetuadas três comparações (*matches*) sendo uma entre os grupos I e II, uma entre I e III e por fim a comparação entre II e III. Foi observada uma boa correlação entre os géis (tabela 12), sendo um reflexo positivo de todos os cuidados tomados com o preparo dos mesmos.

Tabela 12. Coeficiente de correlação entre os géis de cada grupo.

Tipo de comparação	Correlação
Grp I vs Grp II	$r = 0,80$
Grp I vs Grp III	$r = 0,88$
Grp II vs Grp III	$r = 0,84$

5.3.2 Análise comparativa entre os grupos

Durante a análise diferencial, foi possível verificar que 398 *spots* foram coincidentes entre os grupos I (controle) e II (5 mg/L de fluoreto). A Figura 14 apresenta os *spots* de ambos os tratamentos sobrepostos, sendo o grupo I em vermelho e o II em azul. Dentre estes *spots* comuns aos dois grupos, a ANOVA revelou que 33 encontravam-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (Figura 15). A análise qualitativa revelou que 42 *spots* estavam presentes apenas no grupo I (Figura 16) e outros 3 estavam presentes apenas no grupo II (Figura 17).

Figura 14. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em vermelho estão representados os *spots* do grupo I (controle) e em azul os *spots* pertencentes ao grupo II (5 mg/L de fluoreto).

Figura 15 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos I (A, controle) e II (B, 5 mg/L de fluoreto).

Figura 16 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo I (A, controle) quando comparado ao II (B, 5 mg/L de fluoreto).

Figura 17 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo II (A, 5 mg/L de fluoreto) quando comparado ao I (B, controle).

A análise diferencial entre os grupos I (controle) e III (50 mg/L de fluoreto) revelou que 398 *spots* foram coincidentes entre os grupos I e III. A Figura 18 apresenta os *spots* de ambos os tratamentos sobrepostos, sendo o grupo I em vermelho e o III em azul. Dentre estes *spots* comuns aos dois grupos, a ANOVA revelou que 44 encontravam-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (Figura 19). A análise qualitativa revelou que 42 *spots* estavam presentes apenas no grupo I (Figura 20) e outros 7 estavam presentes apenas no grupo III (Figura 21).

Figura 18. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em vermelho estão representados os *spots* do grupo I (controle) e em azul os *spots* pertencentes ao grupo III (50 mg/L de fluoreto).

Figura 19 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos I (A, controle) e III (B, 50 mg/L de fluoreto).

Figura 20 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo I (A, controle) quando comparado ao III (B, 50 mg/L de fluoreto).

Figura 21 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo III (A, 50 mg/L de fluoreto) quando comparado ao I (B, controle).

Por fim, ao se compararem as imagens dos grupos II e III, 379 *spots* estavam presentes em ambos os grupos (Figura 22). Destes, a ANOVA revelou que 29 *spots* mostraram-se com expressão diferencial ($p < 0,05$, Figura 23). A análise qualitativa entre esses grupos revelou ainda que 21 *spots* estavam ausentes no grupo III (Figura 24). Foi ainda observado que o grupo II apresentava 26 *spots* ausentes em relação ao grupo III ($p < 0,05$, Figura 25). Cinco *spots* ausentes no grupo II também não foram encontrados no grupo controle, indicando que são *spots* exclusivos do grupo III. O número de *spots* encontrados exclusivamente nos grupos I e II foi de 18 e 1, respectivamente.

A Tabela 13 mostra a razão entre as porcentagens de alteração de volume entre os diferentes grupos.

Tabela 13. Razão dos spots protéicos com porcentagens de alterações de volume entre os diferentes grupos. Valores positivo e negativo indicam maior ou menor expressão da proteína, respectivamente. Foi considerada expressão diferencial apenas os valores com alterações significativas ($p < 0,05$).

Spot	Controle	5 mg/L F
47	-2,02	+2,02
51	+2,76	-2,76
65	+1,30	-1,30
103	-6,66	+6,66
154	-1,50	+1,50
166	+1,10	-1,10
187	4,42	-4,42
204	-1,91	+1,91
226	-3,10	+3,10
281	+2,60	-2,60
282	+2,26	-2,26
295	+3,28	-3,28
318	+1,28	-1,28
320	-1,35	+1,35
334	+2,09	-2,09
345	+1,59	-1,59
357	-4,94	+4,94
373	-1,93	+1,93
402	+4,50	-4,50
413	-5,52	+5,52
Spot	Controle	50 mg/L F
35	+1,41	-1,41

43	-1,62	+1,62
45	+1,34	-1,34
71	-1,35	+1,35
93	-1,28	+1,28
109	-1,30	+1,30
117	-1,72	+1,72
128	-1,09	+1,09
140	-1,31	1,31
154	-1,50	+1,50
158	-1,22	+1,22
175	-1,21	+1,21
178	+1,11	-1,11
196	-1,39	+1,39
226	-2,26	+2,26
238	-1,50	+1,50
259	-1,69	+1,69
270	-1,70	+1,70
271	-2,88	+2,88
279	-1,45	+1,45
281	+2,04	-2,04
302	-2,38	+2,38
305	-1,76	+1,76
328	-1,78	+1,78
343	+1,83	-1,83
345	+1,79	-1,79
351	-1,48	+1,48
368	-1,57	+1,57
410	+2,03	-2,03
413	-1,66	+1,66
Spot	5 mg/L F	50 mg/L F
20	+1,39	-1,39
35	+1,36	-1,36
43	-1,67	+1,67
117	-2,20	+2,20
139	+1,54	-1,54
187	-6,78	+6,78
216	+1,41	-1,41
302	-2,28	+2,28
305	-1,77	+1,77
318	-2,08	+2,08
320	-1,67	+1,67
343	+2,39	-2,39
359	-1,65	+1,65

A Tabela 14 mostra os *spots* protéicos presentes ou ausentes nos grupos

experimentais em relação ao controle.

Tabela 14. Spots protéicos presentes ou ausentes nos diferentes grupos. Valores positivo e negativo indicam presença e ausência, respectivamente

spot	controle	5 mg/L F	50 mg/L F
6	+	-	+
136	+	-	+
147	+	-	+
173	+	-	+
181	+	-	+
205	+	-	+
286	-	+	+
291	+	+	-
312	+	+	-
317	+	+	-
321	+	+	-
336	+	+	-
338	+	+	-
356	+	+	-
358	+	+	-
372	+	+	-
374	+	+	-
380	+	+	-
383	+	-	+
385	+	-	+
387	+	-	+
400	+	-	+
405	+	-	+
416	+	+	-
417	+	+	-
418	+	+	-
419	-	-	+
421	+	-	-
422	+	-	-
424	+	-	-
425	+	-	-
426	+	-	-
427	+	-	-
429	+	-	-
430	+	-	-
431	+	-	-
432	+	-	-
433	+	-	-
436	+	-	-

437	+	-	-
438	+	+	-
439	+	-	-
441	+	-	-
443	-	-	+
445	-	-	+
446	-	-	+

As Tabelas 15 e 16 resumem as diferenças qualitativas e quantitativas, respectivamente, em relação aos *spots* proteicos encontrados nos diferentes grupos experimentais, de acordo com a análise realizada através do *software Image Master 2D Platinum 7.0*.

Tabela 15. Perfil qualitativo de *spots* proteicos encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto, de acordo com a análise realizada através do *software Image Master 2D Platinum 7.0*.

Grupos	Exclusivos*	I x II**	I x III**	II x III**	Total***
Controle (I)	18	42	42		440
5 mgF/L (II)	1	3		21	401
50 mgF/L (III)	5		7	26	405

* Número de *spots* encontrados exclusivamente em cada um dos grupos analisados.

** Número de *spots* encontrados em um dos grupos comparado ao outro.

*** Número total de *spots* proteicos detectados em cada grupo experimental.

Tabela 16. Perfil quantitativo de *spots* protéicos encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto, de acordo com a análise realizada através do *software Image Master 2D Platinum 7.0*.

Comparações	Coincidentes*	Diferença de expressão**
I x II	398	33
I x III	398	44
II x III	379	29

* Número total de *spots* proteicos presentes em ambos os grupos analisados.

** Número de *spots* proteicos com expressão diferencial entre os grupos analisados.

Figura 22. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em vermelho estão representados os *spots* do grupo II (5 mg/L de fluoreto) e em azul os *spots* pertencentes ao grupo III (50 mg/L de fluoreto).

Figura 23 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos II (A, 5 mg/L de fluoreto) e III (B, 50 mg/L de fluoreto).

Figura 24 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo II (A, 5 mg/L de fluoreto) quando comparado ao III (B, 50 mg/L de fluoreto).

Figura 25 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde apresentaram-se exclusivamente no grupo III (A, 50 mg/L de fluoreto) quando comparado ao II (B, 5 mg/L de fluoreto).

5.3.3 Proteínas identificadas

Todas as proteínas que na análise com o *software* apresentaram diferença de expressão significativa ($p < 0,05$) conforme a ANOVA ou estavam ausentes em um grupo e presentes em outro, foram submetidas à espectrometria de massa, totalizando 130 (Tabelas 13 e 14). Deste total cerca de 94 proteínas (72,3 %) possuíam similaridade com os bancos de dados IPI e SWISS PROT e atingiram um *score* mínimo de 60, o que foi considerado necessário para uma identificação satisfatória. As proteínas identificadas apresentaram similaridade com a espécie *Rattus norvegicus*.

Os espectros resultantes da espectrometria de massa foram analisados individualmente utilizando o algoritmo do programa MASCOT, o qual proporciona um resultado na forma de *score*, que indica a probabilidade daquele *match* não apresentar um evento ao acaso. O programa disponibiliza um gráfico com os valores de *score*, o qual nos fornece um valor limite acima do qual os valores são considerados significativos, ou seja, têm baixa probabilidade de serem randômicos ($p < 0,05$). Neste trabalho, o *score* limite considerado foi 60. Na figura 26, pode-se observar um gráfico obtido a partir deste programa referente ao *spot* 173, o qual aponta o *score* limite de 60 indicado pela área sombreada.

Figura 26. Gráfico resultante dos score referente a cada espectro analisado pelo programa Mascot do spot 173, salientando na área sombreada o limite de 60.

As proteínas identificadas (94), que apresentaram score acima de 60, foram divididas em categorias funcionais de acordo com Rison; Hodgman e Thornton (2000) (Figura 27).

A categoria “metabolismo” reuniu a maior parte das proteínas identificadas (52% ou 49 proteínas), assim como foi observado nos trabalhos de Leite (2010), Kobayashi et al. (2009) e Xu et al. (2005) para rins de ratos.

Na categoria “vias da informação”, que abriga proteínas envolvidas nos processos de síntese e degradação de DNA e RNA, foram identificadas 17 proteínas (18%).

Na categoria “estrutura e organização estrutural”, que reúne proteínas com funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular, identificadas 11% das proteínas ($n=10$).

Na categoria “Processos celulares”, abrigando proteínas cuja função envolve defesa do organismo e regulação intracelular, foram identificadas 12% das proteínas ($n=11$).

Por fim, na categoria “transporte”, envolvendo proteínas relacionadas ao transporte de macromoléculas ou pequenas moléculas e íons, foram identificadas 7 proteínas (7%).

A fim de facilitar a compreensão dos achados, os mesmos serão relatados e discutidos de acordo com as categorias funcionais acima descritas.

Figura 27. Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas em fígado de ratos tratados ou não cronicamente com fluoreto, de acordo com Rison; Hodgman e Thornton (2000)

5.3.3.1. Proteínas relacionadas ao transporte

Foram identificadas 7 proteínas nesta categoria (Tabela 17). De uma forma geral, nos grupos experimentais houve uma redução na expressão de proteínas desta categoria quando comparados ao controle ou mesmo ausência *spot*.

Barbier; Arreola-Mendoza e Razo, (2010) relataram que o fluoreto tem um importante efeito na atividade, localização e expressão de proteínas de transporte. Dentre estas proteínas destaca-se a ação do fluoreto nas proteínas envolvidas no transporte de cálcio. No presente trabalho, a proteína *Annexin A*, também conhecida como *Calcium-binding protein 65/67*, estava com expressão reduzida no grupo 50 mg/L de fluoreto quando comparado ao de 5 mg/L de fluoreto. Esta proteína está relacionada à liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares, com importante implicação nas vias de sinalização celular em que este elemento atua como segundo mensageiro (NELSON; COX, 2002). A redução da sua expressão, como foi observado no grupo de 50 mg/L de fluoreto, poderia levar a uma retenção intracelular de cálcio, que tem sido

descrita em alguns tecidos em casos de exposição ao fluoreto (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010).

A *Fatty acid-binding protein, liver* (L-FABP) teve expressão reduzida no grupo de 5 mg/L de fluoreto em comparação ao controle. Trata-se de uma proteína envolvida no transporte de ácidos graxos de cadeia longa da membrana plasmática para os sítios de β -oxidação, detectada em tecidos com metabolismo ativo de ácidos graxos, como fígado, intestino, coração e rins (KIMURA et al., 1991). Em acréscimo, a FABP tem um importante papel na redução do estresse oxidativo, na ligação a produtos de oxidação de ácidos graxos e na limitação dos efeitos tóxicos de intermediários oxidativos nas membranas (WANG et al., 2005; PELSERS; WIN e JAN, 2005). Suas propriedades antioxidantes despertaram interesse na utilização das mesmas como potenciais marcadores de injúria tecidual. Leite (2010) também encontrou subexpressão de uma proteína da mesma família, a H-FABP (de coração), em rins de ratos submetidos a intoxicação aguda com 50mgF/kg de peso corporal quando comparado com o grupo controle, indicando um prejuízo na obtenção de energia e no combate ao estresse oxidativo. À semelhança dos achados do presente trabalho, não houve redução na expressão desta proteína no grupo que recebeu a dose mais alta de fluoreto (100 mg/Kg de peso corporal).

Foram encontradas ainda alterações na expressão de 4 proteínas da família das globinas, as quais estão envolvidas no transporte de oxigênio, a saber: *Hemoglobin subunit β 1*, *Zero β -1 globin*, *hemoglobin, beta* e *Hemoglobin α -2 chain*. Em geral, houve uma redução na expressão destas proteínas nos grupos tratados com fluoreto quando comparados ao controle com exceção de uma que aumentou nos grupos experimentais em relação ao controle (*hemoglobin, beta*). Achados similares foram observados em rins de ratos submetidos a tratamento agudo com fluoreto, tendo sido observada uma redução na expressão das proteínas (*Zero β -2 globin* e *Hemoglobin subunit α -1/2*) nos grupos tratados em relação ao controle (LEITE, 2010). Esta redução na expressão de proteínas da família das globinas poderia estar relacionada a um prejuízo no aporte de oxigênio aos tecidos quando da exposição ao fluoreto.

A *Apolipoprotein E* (APO-E) não foi encontrada nos grupos experimentais. As apolipoproteínas constituem a parte proteica das lipoproteínas e agem como sinalizadoras, dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos e ativando enzimas que agem sobre elas. Existem pelo menos 9 apolipoproteínas diferentes, dentre elas a APO-E, que está associada aos quilomícrons, VLDL e HDL e tem como função iniciar a retirada dos remanescentes dos quilomícrons e VLDL (NELSON; COX, 2002). Os quilomícrons são as maiores lipoproteínas e as menos densas, com alta proporção de triacilgliceróis. São sintetizados no retículo endoplasmático das células epiteliais que revestem a superfície interna do intestino delgado e transportada, através do sistema linfático, entrando na corrente sanguínea. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a APO-B48, APO-C II e a APO-E. A APO-C II ativa a lipase lipoproteica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco e músculo esquelético, permitindo a liberação de ácidos graxos livres para estes tecidos. Os remanescentes dos quilomícrons movem-se então da corrente sanguínea até o fígado, onde os receptores que se ligam à APO-E nos remanescentes dos quilomícrons e promovem sua absorção por endocitose. No fígado, eles liberam o colesterol e são degradados nos lisossomos. De acordo com Bonomini et al. (2010), a deficiência de APO-E está relacionada à indução de estresse oxidativo e aumento de depósitos de gordura nos hepatócitos, o que ajuda a explicar as inclusões lipídicas observadas nos cortes histológicos de fígado no presente trabalho (Figura 12).

Tabela 17. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Transporte” em fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

Spot	Proteína	Score	Número de Acesso	pI /PM teórico	pI/PM experimental	Expressao	Função Biológica
216	Annexin A6	147	IPI00421888	5,2/75,75		↓ 50 mg/L em comparação ao grupo e 5 mg/L	Regulação de liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares
431	Apolipoprotein E	85	IPI00190701	4,9/ 35,7	4,9/ 35,0	Ausente nos grupos experimentais	Media a ligação, internalização, e catabolismo de partículas de lipoproteínas. Serve como receptor de LDL (apo B/E) e como receptor específico de ApoE (quilomicrons remanescentes) do tecido hepático
334	Fatty acid-binding protein , liver	161	IPI00190790	8,4/14,3	8,3/13,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Relacionada ao metabolismo intracelular de lipídios e ao transporte de ácidos graxos
410	Hemoglobin alpha- 2 chain	887	IPI00205036	8,5/15,4	9,1/13,0	↓ 50 mg/L em comparação ao controle	Transporte de oxigênio
413	hemoglobin, beta	333	IPI00951116	8,2/15,9	9,4/37,0	↑ Experimentais em comparação ao controle	Transporte de oxigênio
343	Hemoglobin subunit beta-1	388	IPI00230897	8,3/15,9	8,7/13,0	↓ 50 mg/L em comparação ao grupo 5 mg/L e controle	Transporte de oxigênio
345	Zero beta-1 globin	75	IPI00207146	8,5/ 16,0	8,1/13,0	↓ 5 e 50 mg/L em comparação ao controle	Transporte de oxigênio

↓ Expressão reduzida

5.3.3.2 Proteínas relacionadas à estrutura e organização estrutural

Dez proteínas foram classificadas nesta categoria, muitas das quais estão relacionadas ligadas ao citoesqueleto, tanto em relação à deformação celular quanto em relação à composição dos filamentos e organização (Tabela 18).

O citoesqueleto consiste em várias redes de bastões estruturais altamente organizados. A rede pode ser formada por três tipos de bastões, a saber: filamentos intermediários formados nos tecidos mesenquimais pela vimentina, microfilamentos formados pela actina ou microtúbulos formados pela tubulina (GRIFFITHS et al., 2008).

Foi observado que a proteína *Actin, cytoplasmic 1* apresentou expressão reduzida no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto em comparação ao 5 mg/L enquanto que a *Actin-related protein 3* teve expressão aumentada no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto em comparação ao 5 mg/L. Isto sugere que a diminuição de um dos tipos de actina poderia estar sendo compensada pelo aumento na expressão de outro tipo de actina quando da ingestão da dose elevada de fluoreto. As proteínas *Tropomyosin alpha-1 chain*, *Tropomyosin Beta chain*, *Miosyn Light chain 1/3*, *muscle skelet* estavam ausentes nos grupos experimentais, e a *Actin, alpha skeletal muscle*, e a *Radixin* tiveram uma maior expressão nos grupos experimentais quando comparados ao controle, enquanto que a *Tubulin alpha-1B chain* teve expressão aumentada apenas no grupo 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Todas essas proteínas estão relacionadas à estrutura ou organização dos filamentos de actina no citoesqueleto, o que está intimamente ligado à movimentação celular, a qual pode ocorrer pelo arranjo do citoesqueleto de actina. Estes filamentos são componentes estruturais celulares que têm como papel chave determinar a forma e a mobilidade celular. A polimerização e despolimerização destas fibras de actina estão envolvidas na regulação da migração celular (ZIGMOND, 1996). Em adição, heterodímeros de tubulina formados de α - e β -tubulina (cada uma com cerca de 50 kDa) são os componentes estruturais básicos que constituem os microtúbulos, com aproximadamente 25 nm de diâmetro que radiam a partir do centro organizador de microtúbulos localizado no centróssomo no citoplasma de células em interfase. Os microtúbulos estão

envolvidos em vários processos celulares, que também incluem movimentação celular, transporte intracelular e divisão celular (VERHEY; GAETIG, 2007). Neste trabalho foi observado que proteínas que estão relacionadas a estas atividades tiveram sua expressão alterada, o que possivelmente provocou alterações nestes mecanismos. Barbier; Arreola-Mendoza e Razo (2010) relataram em sua revisão que o fluoreto pode provocar alterações no citoesqueleto, bem como na mobilidade e proliferação celular. No presente trabalho, foi verificado que algumas proteínas relacionadas à estrutura ou à migração celular tiveram alterações tanto direcionadas para o aumento de expressão como para a diminuição de expressão nos grupos experimentais em relação ao controle. De acordo com Zigmond (1996), alterações nestes processos são complexas e necessitam ser mais esclarecidas. Leite (2010) encontrou alterações em 3 cadeias de α -tubulina, que se apresentaram subexpressas mediante tratamento agudo com fluoreto. A autora concluiu que a exposição aguda ao fluoreto, especialmente na dose mais alta, foi capaz de alterar a expressão de diferentes proteínas relacionadas à estrutura e organização celular. No entanto, no presente trabalho foi observado o contrário, ou seja, houve um aumento na expressão de um tipo de β -tubulina no grupo 5 mg/L de fluoreto em comparação ao controle, o que também foi relatado por Xu et al. (2005) no rim de ratos tratados com 100 mg/L de fluoreto o que foi relacionado a uma proliferação secundária no rim.

Foram identificadas com expressão alterada duas proteínas responsáveis pela estrutura do ribossomo, a saber: a *60S acidic ribosomal protein P0*, com expressão aumentada no grupo 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle e a *Ribosomal protein S27a* que faz parte da constituição da subunidade 40S do ribossomo, cuja expressão só foi detectada no grupo 50 mg/L de fluoreto. O número de ribossomos aumenta na medida em que a velocidade do crescimento celular aumenta. Assim, um aumento na expressão destas proteínas nos grupos experimentais poderia ser um indício de aumento na síntese protéica (NELSON; COX, 2002) que ocorreria em casos de aumento na proliferação celular induzida pelo fluoreto (XU et al., 2005; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010).

Tabela 18. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Estrutura e organização estrutural” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressao	Função Biológica
103	60S acidic ribosomal protein P0	484	IPI00200147	6,1/34,2	5,8/37	↑ 5 mg/L em comparação ao controle	Componente estrutural do ribossomo (subunidade 60S)
154	Actin, alpha skeletal muscle	66	IPI00189813	5,0/42,0	5/52,0	↑ experimentais em comparação ao controle	Proteína envolvida na mobilidade celular, relacionada à organização e estrutura
139	Actin, cytoplasmic 1	488	IPI00189819	5,1/41,7	5,2/45,0	↓ 50 mg/L em relação ao 5 mg/L	Proteína envolvida na mobilidade celular
318	Actin-related protein 3	139	IPI00363828	6,2/47,2	5,7/52,0	↑ 50mg/L e controle em comparação ao 5 mg/L	Regulação positiva de polimerização ou despolimerização de filamentos de actina. Organização dos filamentos de actina do citoesqueleto
421	Miosyn Light chain 1/3, muscle skelet	98	IPI00190606	4,7/20,7	4,9/24,0	Ausente nos grupos experimentais	Componente estrutural da fibra muscular
226	Radixin	79	IPI00369635	5,8/68,39	6,5/81,0	↑ experimentais em comparação ao controle	Proteína que se liga à actina do citoesqueleto
419	Ribossomal protein S27a	70	IPI00190240	10,2/17,9	7/12,0	Presente apenas no grupo de 50 mg/L	Constituição estrutural do ribossomo como componente da subunidade ribossomal 40S
321	Tropomyosin alpha-1 chain	139	IPI00187731	4,4/32,5	4,3/38,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Liga-se aos filamentos de actina e está relacionada à estabilidade dos mesmos no citoesqueleto
436	Tropomyosin Beta chain	277	IPI00230775	4,3/32,7	4,3/40,0	Ausente nos	Liga-se aos filamentos de actina e

						experimentais	está relacionada à estabilidade dos
							mesmos no citoesqueleto
357	Tubulin alpha-1B chain	271	IPI00362927	4,7/50,1	4,8/60,0	↑ 5 mg/L em comparação ao controle	É o maior constituinte de microtúbulos

↓ Expressão reduzida ↑ Expressão aumentada

5.3.3.3 Proteínas relacionadas aos processos celulares

Foram identificadas 11 proteínas nesta categoria (Tabela 19). De uma forma geral, quase todas elas, com exceção de uma, tiveram expressão reduzida ou não foram encontradas nos grupos experimentais.

Observou-se que 3 proteínas relacionadas ao sistema de oxidação celular apresentaram alterações no grupo de 50 mg/L de fluoreto, a saber: a *Perodoxiredoxin-1* e a *Perodoxiredoxin-5, mitochondrial* estavam ausentes no grupo 50 mg/L de fluoreto, enquanto que a *Peroxiredoxin-4* estava presente apenas no grupo 50 mg/L de fluoreto. As peroxirredoxinas (PRDX, EC. 1.11.1.15) têm a função de proteção celular contra estresse oxidativo, além de modular as vias de sinalização intracelular. Catalisam a redução de H_2O_2 e hidroxiperoxido em água e álcool (HOFMANN et al., 2002). Assim, alterações nestas proteínas poderiam ter ligação ao estresse oxidativo induzido pelo fluoreto (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010; STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010; ZHAN et al., 2006). As diferenças de expressão observadas podem estar ligadas à distribuição diferencial dos diferentes tipos de enzimas dentro das células. As PRDX1, 2, e 4 estão localizadas no citoplasma. A PRDX1 também está localizada no núcleo. A PRDX4 é localizada no retículo endoplasmático, sendo também secretada extracelularmente, enquanto que a PRDX5 está localizada na mitocôndria e peroxissomos. As PRDXs possuem diferenças catalíticas, não são redundantes funcionalmente e PRDXs individuais podem proteger contra diferentes tipos de estresses (WANG et al., 2009; HOFMANN et al., 2002). As diferenças de expressão observadas no presente trabalho poderiam significar que está ocorrendo um menor proteção na mitocôndria e no núcleo, devido à diminuição da *Peroxiredoxin-1* e *Peroxiredoxin-5*, respectivamente. Leite (2010) também encontrou alterações em uma proteína desta família a *Peroxiredoxin-2* no rim de ratos submetidos à intoxicação aguda pelo fluoreto, tendo sido detectada presença da proteína apenas no grupo que recebeu maior ingestão aguda de fluoreto, assim como foi observado para a *Peroxiredoxin-4* neste trabalho. Nestes casos, o aumento na expressão destas proteínas poderia indicar uma tentativa de se combater o estresse oxidativo no citoplasma.

A proteína G faz parte de uma grande família de proteínas heterotriméricas (subunidades α , β e γ) de ligação do GTP. Trata-se de proteína relacionada à transdução de sinal, que tem a capacidade de transformar sinais moleculares externos em sinais intracelulares (MARZZOCO; TORRES, 2007). No presente trabalho, foi observada ausência da *Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(s)/G(T) subunit beta-2* nos grupos experimentais, sendo esta subunidade essencial para a atividade GTPase da proteína G. Tem sido relatado que, após atravessar a membrana celular, o fluoreto pode se ligar à subunidade α da proteína G, ativando-a por modificar sua conformação (THRANE et al., 2001; REFSNES et al., 2003). Como resultado, a transdução de sinal mediada pela proteína G é estimulada de modo não convencional por um falso mensageiro (STRUNECKA et al., 2007) e isto tem sido considerado um mecanismo pelo qual o fluoreto induz apoptose. A ausência da subunidade β -2 da proteína G no presente trabalho poderia ser uma adaptação do organismo a fim de evitar a estimulação exacerbada da proteína G na presença de fluoreto. Ge et al. (2011) também observaram baixa expressão da *Guanine nucleotide-binding protein* em cérebro de ratos expostos a água de beber contendo 100 mg/L de fluoreto, o que vem de encontro aos achados do presente trabalho. Outra proteína diretamente envolvida nos processos acima descritos que teve sua expressão alterada no presente trabalho foi a PEBP-1, também conhecida como *Raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP)*, que é um membro da família *Phosphatidylethanolamine-binding protein* (Keller; Fu; Brennan, 2004). Esta proteína se liga à Raf-1, inibindo a fosforilação da MEK mediada pela Raf-1. Por outro lado, a proteína quinase C (PKC) fosforila a RKIP, liberando Raf-1 e resultando em ativação da MEK e ERK. Entretanto, a RKIP fosforilada se liga ao receptor quinase acoplado à proteína G, mantendo a sinalização mediada pela proteína G (KELLER; FU; BRENNAN, 2004). No presente trabalho, houve uma diminuição de expressão desta proteína no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação aos grupos controle e 5 mg/L de fluoreto, o que, à semelhança da ausência de expressão da *Guanine nucleotide-binding protein*, poderia ter a função de reduzir as cascatas de sinalização mediadas pela proteína G.

As proteínas 14-3-3 são uma família de proteínas ácidas altamente conservadas, composta por sete isoformas em mamíferos, que podem interagir

com mais de 200 proteínas através de ligações a resíduos de fosfoserina e fosfotreonina. Sua natureza dimérica permite que elas atuem como pontes intermoleculares, colocalizando proteínas de maneira dependente de fosforilação (FORREST; GABRIELLI, 2001). Agem em vias de sinalização, estando envolvidas no controle ciclo de celular, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, migração e propagação (MHAWECH, 2005). Foram observadas no presente trabalho alterações na expressão de 4 proteínas desta família. Duas delas não tiveram seus *spots* protéicos expressos no grupo 50 mg/L de fluoreto (*14-3-3 protein zeta/delta* e *14-3-3 protein épsilon*). Durante a interfase, estas duas isoformas $14-3-3 \zeta$ e ϵ (*14-3-3 protein zeta/delta* e *14-3-3 protein épsilon*, respectivamente) ligam-se à Cdc25C, que é um membro da família de proteínas fosfatases Cdc25, as quais têm a função de avançar o ciclo celular da fase G2 para fase M. A ligação destas isoformas a esta fosfatase resultaria na retirada desta proteína do citoplasma, levando à sua desativação e impedindo a ativação prematura do ciclo celular. Assim, a ausência destas isoformas poderia provocar esta ativação prematura (FORREST; GABRIELLI, 2001; MHAWECH, 2005), levando à proliferação celular, que pode ocorrer na presença de fluoreto (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010). Já a isoforma *14-3-3 beta*, a qual apresentou uma maior expressão nos grupos experimentais, está ligada ao controle de migração e propagação celular através da regulação de integrinas, uma família de glicoproteínas de superfície que ligam a matriz extracelular com o citoesqueleto de actina. A superexpressão desta isoforma beta estimula a migração, sobrevivência e a propagação celular (HAN et al., 2002; MHAWECH, 2005). Também a *14-3-3 protein gama* teve sua expressão aumentada no grupo 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Esta isoforma, em conjunto com a beta e a épsilon, está envolvida na regulação do ciclo celular via complexo TSC1/TSC2 (esclerose tuberosa ½), que desempenha um papel importante em inibir o crescimento celular e em controlar o tamanho da célula através da regulação na transição da fase G1 a fase S (HENGSTCHLAGER et al., 2003). Assim, alterações nestas proteínas poderiam provocar alterações neste controle.

A *Carboximethylenebutenolidase homolog* (EC 3.1.1.45), também conhecida como *Liver regeneration-related protein*, tem atividade de hidrolase

atuando nas ligações éster, podendo agir no metabolismo de xenobióticos. Durante muito tempo sua função biológica permaneceu desconhecida e recentemente foi demonstrado que ela atua na bioconversão de uma pró-droga, o *olmesartan medoxomil*, amplamente prescrito como agente anti-hipertensivo. O transcrito desta enzima foi identificado em vários tecidos humanos, mas a maior concentração estava presente no fígado (ISHIZUKA et al., 2010). No presente trabalho, a enzima apresentou uma expressão reduzida no grupo de 5 mg/L de fluoreto em comparação ao controle, mas pelo fato de a informação acerca da sua função biológica no organismo ser recente, é arriscado no momento fazer qualquer inferência ao significado deste achado frente à exposição ao fluoreto. Com base nestes achados, poder-se-ia supor, que a bioconversão do *olmesartan medoxomil* poderia ser prejudicada em indivíduos expostos à água fluoretada, o que deveria ser investigado em trabalhos futuros.

A função mais importante da Haptoglobina (Hp) é se ligar à hemoglobina e, assim, evitar danos oxidativos aos tecidos induzidos pela hemoglobina. Esta função antioxidante da Hp é mediada, em parte, pela sua capacidade de evitar a liberação de ferro de hemoglobina (ASLEH et al., 2005). A *isoform 2 of Haptoglobin* não estava presente nos grupos experimentais em relação ao controle, indicando que estes animais estariam mais suscetíveis a um dano oxidativo, que tem sido relatado em inúmeros trabalhos quando da exposição excessiva ao fluoreto (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010; STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010; ZHAN et al., 2006).

A *C-reactive protein* não foi encontrada expressa nos grupos experimentais em relação ao controle. A proteína C-reativa é sintetizada pelos hepatócitos, sendo uma proteína pentamérica composta por cinco subunidades idênticas ligadas covalentemente. Sua produção é estimulada por citocinas especialmente IL-6, IL-1 e fator de necrose tumoral, em resposta à inflamação ou infecção dos tecidos (CLYNE; OLSHAKER, 1999). A sua redução ocorre após o término do processo inflamatório ou lesão tecidual. Entretanto, a razão para a sua ausência nos grupos experimentais no presente trabalho é desconhecida.

Tabela 19. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Processos celulares” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressao	Função Biológica
270	14-3-3 protein beta/alpha	217	IPI00230837	4,5/ 28,0	4,5/30,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Relacionada à regulação de vias de sinalização e controle do ciclo celular
338	14-3-3 protein epsilon	411	IPI00325135	4,4/29,2	4,2/32,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Relacionada à regulação de vias de sinalização e controle do ciclo celular
271	14-3-3 protein gama	240	IPI00230835	4,5/ 28,3	4,5/30,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Relacionada à regulação de vias de sinalização e controle do ciclo celular
336	14-3-3 protein zeta/delta	263	IPI00324893	4,4/27,8	4,4/30,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Relacionada à regulação de vias de sinalização e controle do ciclo celular
51	Carboximethylenebutenolidase homolog	118	IPI00214052	6,7/27,9	6,4/28,0	↓ 5mg/L em comparação ao controle	Atividade de hidrolase; age nas ligações éster
429	C-reactive protein	68	IPI00188225	4,6/ 25,5	4,3/ 31,0	Ausente nos grupos experimentais	Atua no processo inflamatório
425	Guanine necleotide-binding protein G(I)/G(s)/G(T) subunit beta-2	138	IPI00212658	5,8/37,3	5,5/ 37,0	Ausente nos grupos experimentais	Relacionada à transdução de sinal
424	isoform 2 of Haptoglobin	123	IPI00382202	6,5/ 42,5	5,6/ 38,0,0	Ausente nos gupos experiemntais	Responsável pela blindagem da hemoglobina (processo de adaptação)
416	Perodoxiredoxin-1	158	IPI00211779	8,3/ 22,1	9,17/25,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Age como antioxidante

372	Perodoxiredoxin-5, mitochondrial	79	IPI00205745	8,9/22,2	7,7/17,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Age como antioxidante
445	Peroxiredoxin-4	61	IPI00208209	8,31/22,1	8,4/25,0	Presente apenas no 50 mg/L	Age como antioxidante
35	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	286	IPI00230937	5,6/20,8	5,3/2,04	↓ 50 mg/L em Comparação ao ontrole e 5 mg/L	Relacionada à regulação de cascatas de sinalização relacionadas a proteínas de fosforilação

↓ Expressão reduzida ↑ Expressão aumentada

5.3.3.4 Proteínas relacionadas às vias de informação

Nesta categoria foram identificadas 17 proteínas (Tabela 20).

As proteínas assistentes (chaperonas moleculares) interagem com polipeptídios parcialmente enovelados, facilitando as vias corretas de enovelamento ou fornecendo microambientes nos quais o enovelamento possa ocorrer. Além disso, também impedem o enovelamento de proteínas que devem permanecer desenoveladas até serem levadas através da membrana (NELSON; COX, 2002). Foi observado que algumas proteínas que atuam como chaperonas estavam ausentes no grupo que recebeu 5 mg/L de fluoreto, como a *T complex protein 1 subunit gamma*, que está relacionada ao dobramento de actina e tubulina do citoesqueleto (ALTSCHULER; WILLISON, 2008) e a *Heme binding protein 1, isoform CRA-a*, enquanto que a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPI, EC.5.2.1.8)*, que catalisa a interconversão dos isômeros cis e trans de ligações peptídicas da prolina, estava ausente em ambos os grupos experimentais. Estes achados poderiam estar relacionados a uma dificuldade de conclusão do processo de síntese proteica na presença de fluoreto. Entretanto, outra chaperona, a *60 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp60)* teve sua expressão aumentada no grupo 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle. A *Hsp60 mitochondrial*, como o próprio nome sugere, atua como chaperona de proteínas mitocondriais. Faz parte de uma classe de proteínas que pode se ligar a regiões de polipeptídeos desenovelados, que são ricas em resíduos hidrofóbicos, prevenindo a agregação e assim protegendo as proteínas que foram desnaturadas pelo calor e os peptídeos que estão sendo sintetizados. O aumento da sua expressão no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto pode ser uma tentativa de reduzir o estresse oxidativo mitocondrial (RANFORD; HENDERSON, 2002). Xu; Jing; Li (2008) também encontraram um aumento na expressão de uma proteína da mesma família, a *Heat shock 70-kDa protein (Hsp 70)*, em cultura de osteoblastos expostos ao fluoreto, sugerindo um aumento da reação de dobramento oxidativo mediante exposição ao fluoreto. É bem conhecido que toda proteína depende do dobramento oxidativo para a sua maturação e função, o que depende de uma reação redox e uma consequência do dobramento oxidativo é a produção de espécies reativas de oxigênio (TU;

WEISSMAN, 2004). Barbier; Arreola-Mendoza; Razo (2010) também relataram em sua revisão que a Hsp 70 é rapidamente ativada durante o processo de resposta celular ao estresse do meio ambiente, sugerindo que proteínas desta família seriam um possível mediador contra a intoxicação crônica pelo fluoreto. Expressão aumentada da Hsp 70 também foi relatada em cultura de células tumorais de cérebro tratadas com fluoreto (NaF 5 mM por 2 h) (CHENG et al., 1998).

A *Protein disulfide-Isomerase A4 (PDI, EC.5.3.4.1)* catalisa o embaralhamento ou a troca interna das pontes dissulfeto, até que as ligações da conformação nativa sejam formadas. Além disso, catalisa a eliminação de intermediários de enovelamento com ligações cruzadas dissulfeto inapropriadas (NELSON; COX, 2002). No presente trabalho, a PDI estava ausente no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto, o que, associado à diminuição da expressão da PPI e da *T complex protein 1* poderia levar a um desarranjo estrutural tanto das proteínas do citoesqueleto quanto em outras que necessitassem da ação da PPI e PDI, já que a ausência destas enzimas poderia deixar mais lento o enovelamento de proteínas que contenham resíduos de prolina e pontes dissulfeto (NELSON; COX, 2002).

A *Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein* (EC. 5.1--) apresentou uma expressão aumentada no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto em comparação ao controle. Trata-se de uma isomerase que tem alta afinidade por proteínas serina-treonina quinases associadas a receptor, que participa em interações levando à inibição da ativação da transcrição mediada por sinalização envolvendo TGF- β que poderia promover o crescimento celular levando à tomorigênese (LONG et al., 2010).

A *78 glucose –regulated protein (GRP78)* estava presente apenas nos grupos experimentais. Está envolvida com a montagem de complexos protéicos dentro do retículo endoplasmático, sendo que sua expressão é induzida por estresses fisiológicos que afetam a glicosilação de proteínas (WOODEN et al., 1991). Os achados deste trabalho estão de acordo com os relatos de Cheng et al. (1998), os quais observaram que a síntese de GRP78 teve um aumento significativo em cultura de células tumorais de cérebro tratadas com fluoreto (NaF 5 mM por 2 h). Logo o aumento observado nos grupos experimentais poderia estar ligado ao aumento do estresse oxidativo provocado pelo fluoreto.

Os proteossomos são complexos de diversas proteases que levam proteínas marcadas para a destruição pela união com a ubiquitina. As moléculas de ubiquitina se ligam a um resíduo de lisina da proteína a ser degradada e outras moléculas de ubiquitina se prendem à primeira, formando assim um complexo que é reconhecido pela partícula reguladora, a qual tem uma ATPase que usa a energia do ATP para desenrolar a proteína e introduzi-la no proteossomo, onde a mesma será quebrada em peptídeos com oito aminoácidos. Essa degradação se faz necessária para que o organismo possa remover excessos de enzimas e outras proteínas após o desenvolvimento da sua função. Além disso, os proteossomos também destroem proteínas com defeitos estruturais e as codificadas por vírus (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No presente trabalho, diferentes proteínas associadas a proteossomos foram identificadas com expressão alterada pelo fluoreto, mas sem um padrão característico. A *Proteasome subunit alpha type-3* (EC.3.4.25.1) teve sua expressão aumentada no grupo experimental de 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Ge et al. (2011) também observaram aumento de expressão desta proteína no cérebro de ratos exposto a altas doses de fluoreto. Os autores sugeriram que a elevada expressão desta poderia resultar na destruição da coordenação entre o proteossoma e a ubiquitina, e este aumento de função do proteossoma poderia aumentar a decomposição de proteínas normais sem a combinação com a ubiquitina devido a um desalinhamento funcional entre o proteossoma e a ubiquitina. De acordo com esta suposição e tendo em mente que no presente trabalho a *Ubiquitin Carrier protein*, que faz parte deste complexo, não estava presente nos grupos experimentais, este balanço estaria alterado no grupo de 50 mg/L de fluoreto para a *Proteasome subunit alpha type-3*. No entanto as outras subunidades, *Proteasome subunit beta type -4* (EC.3.4.25.1) teve sua expressão reduzida no grupo 50 mg/L de fluoreto em comparação ao controle, enquanto que a *Proteasome subunit alpha type 5*, estava ausente nos grupos experimentais, indicando possivelmente uma diminuição no processo de degradação de proteínas, principalmente se aliarmos estes achados à ausência da *Ubiquitin Carrier protein* nos grupos experimentais. De encontro a estes achados vem também a ausência de expressão da *Fumarylacetoacetate hydrolase domain-*

containing protein 1 (EC. 3 ---) no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto. Esta enzima catalisa a hidrólise de diferentes tipos de ligação, como C-O, C-N e C-C e a sua ausência no grupo de 50mg/L indica diminuição na degradação de proteínas.

As proteínas que estão relacionadas à síntese protéica, como é o caso dos fatores de alongamento (EF), promovem a ligação GTP-dependente de um aminoacil-tRNA ao ribossomo (HERSHEY, 1991). A sequência de aminoácidos das proteínas desta família é altamente conservada entre as diferentes espécies, sendo a metade N-terminal a porção mais conservada, uma vez que se trata da região de ligação do GTP (DEVER; GLYNIAS; MERRICK, 1987; WOOLLEY; CLARK, 1989). O processo de elongação inicia-se com a ligação do aminoacil-tRNA ao complexo GTP-EF, gerando um complexo aminoacil-tRNA-EF-GTP que se ligará ao sítio A (aminoacil) do ribossomo. Essa ligação é acompanhada pela hidrólise do GTP em GDP + Pi, liberando assim o complexo EF-GDP. Além de participar da tradução, o EF-1- α -1 forma complexos com outros componentes celulares como tubulina e actina (BEKTAS et al., 1994; CONDEELIS, 1995) e atua em processos celulares, incluindo a embriogênese, senescência, transformação oncogênica, proliferação e organização do citoesqueleto celular (GANGWANI et al., 1998). Foi relatada a superexpressão de RNAm do EF-1- α -1 em células com potencial metastático, quando comparadas a células não metastáticas. Foi proposto que uma fraca associação do EF-1- α -1 com a actina poderia estar relacionada com o potencial metastático, uma vez que alteraria a organização da actina do citoesqueleto e a tradução do RNAm (EDMONDS et al., 1996). Recentemente, foi demonstrado o envolvimento do EF-1- α -1 em eventos apoptóticos induzidos por estresse oxidativo. Tal envolvimento foi demonstrado em linhagem de cardiomiócitos, onde os níveis de EF-1- α -1 aumentaram sobremaneira após o tratamento com peróxido de hidrogênio, sugerindo que a superexpressão da EF-1- α -1 desempenha um importante papel na execução da morte programada em resposta ao estresse oxidativo (DUTTAROY et al., 1998; CHEN et al., 2000). Foi observado neste trabalho que *Elongation factor 1-alpha 1* (EF-1- α -1) e a *Elongation factor 2* (EF-2) estavam com expressão aumentada no grupo de 50 mg/L de fluoreto tanto em relação ao controle quanto ao 5 mg/L fluoreto respectivamente. Leite (2010) também observou aumento de expressão da EF-

1- α -1 no grupo que recebeu a maior concentração de fluoreto (100 mg/Kg de peso corporal) e concluiu que aumento da expressão destas proteínas poderia acarretar no aumento de eventos apoptóticos no tecido renal. No presente trabalho ainda foi observado que o *Eucaryotic translation elongation factor 1 beta 2* não foi detectado nos grupos experimentais. Assim como os outros fatores de alongamento, este também está relacionado ao ciclo celular, sendo que alterações em sua expressão são observadas durante a senescência celular (BYUN et al., 2009).

A *Spliceosome RNA helicase bat 1* (BAT 1 EC. 3.6.4.13) é uma proteína que está relacionada à hidrólise de ATP durante o *splicing* do pré-mRNA, sendo um fator de *splicing* essencial para associação de pequenas proteínas nucleares ribonucleicas com pré-mRNA. Também desempenha um papel importante na exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma. Ela teve sua expressão diminuída nos grupos experimentais em relação ao controle, indicando assim possíveis alterações no processo transcrição induzidas pelo fluoreto. Tem sido relatado, de fato, que o fluoreto é um modulador da transcrição para vários tipos celulares (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010).

A *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (hnRNP K) é uma proteína conservada de ligação com DNA/RNA que está envolvida em várias etapas que compõem a transdução de sinal e expressão gênica. Tem a capacidade de interagir diretamente não só com ácidos nucleicos, mas também com quinases, fatores de transcrição e cromatina, estando envolvida no *splicing* e tradução (MIKULA et al., 2006). Mikula et al. (2006) observaram no fígado que a insulina altera a interação da hnRNP K com o DNA e o RNA. Wei et al., (2006) também demonstraram *in vitro* e *in vivo* que o aumento de glicose e insulina inibe a expressão de hnRNP K nas células tubulares proximais de rim de ratos (WEI et al., 2006). Estudos recentes têm reportado que exposição ao fluoreto pode regular a expressão do gene da insulina em células pancreáticas de murinos, resultando em redução de insulina (GARCIA-MONTALVO et al., 2009). No presente trabalho, foi observada um aumento na expressão desta proteína no grupo de 5 mg/L de fluoreto em comparação ao controle. Seria interessante investigar se há alterações nas concentrações de glicose e insulina neste grupo experimental, o que poderia alterar a expressão da hnRNP K.

Tabela 20. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Vias da informação” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressao	Função biológica
196	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	79	IPI00339148	5,9/60,9	5,3/ 63,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Atua como uma chaperona nas proteínas mitocondriais, impede os desdobramentos incorretos dos polipeptídeos em condições de estresse na matriz mitocondrial.
286	78 glucose – regulated protein	133	IPI00206624	4,8/72,3	4,3/84,0	Presente apenas nos experimentais	Montagem de complexos protéicos multiméricos dentro do retículo endoplasmático
359	Elongation factor 1 alpha 1	80	IPI00195372	9,4/50,1	9,7/54,0	↑ 50 mg/L em comparação ao 5 mg/L	Relacionado à síntese de proteína; Atua no ciclo celular e apoptose em resposta ao estresse oxidativo
238	Elongation factor 2	72	IPI00203214	6,8/95,2	7,3/96,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Relacionado à síntese de proteína; Atua no ciclo celular e apoptose em resposta ao estresse oxidativo
430	Eucaryotic translation elongation factor 1 beta 2	82	IPI00476899	4,3/ 24,6	4,3/ 30,0	Ausente nos grupos experimentais	Relacionado à síntese de proteína e ao ciclo celular
374	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1	333	IPI00368708	7,9/24,6	7,9/29,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Hidrolase, degradação de proteínas
405	Heme binding protein 1, isoform CRA-a	108	IPI00358461	5,0/ 21,1	5/26,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Atua como chaperona do heme, regulando sua incorporação
204	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	155	IPI00194974	4,9/51,0	5,4/66,0	↑ 5 mg/L em Comparação ao controle	Relacionada ao processo de transcrição, envolvida no processo de splicing
427	Peptidyl-prolyl cis-	503	IPI00213644	10,2/23,8	9,8/ 23,0	Ausente nos grupos	Função de chaperona, acelera o dobramento

	trans isomerase B						experimentais	de proteínas. Cataliza a isomerização cis-trans de prolinas
351	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	321	IPI00200041	6,2/31,7	6,3/32,0	↑	50 mg/L em comparação ao controle	Isomerase
422	Proteasome subunit alpha type 5	140	IPI00191502	4,4/ 26,4	4,3/29,0		Ausente nos grupos experimentais	Relacionada à degradação de proteínas no proteossoma; quebra de ligação peptídica
45	Proteasome subunit beta type -4	176	IPI00191505	5,7/29,2	6,0/27,0	↓	50mg/L em comparação ao controle	Relacionada à degradação de proteínas no proteossoma; quebra de ligação peptídica
291	Protein disulfide-Isomerase A4	435	IPI00212220	4,8/ 72,7	4,9/78,0		Ausente no grupo 50 mg/L	Envolvida na catalisação de pontes dissulfeto
71	Proteasome subunit alpha type-3	334	IPI00476178	5,1/28,4	5,0/31,0	↑	50 mg/L em comparação ao controle	Relacionada à degradação de proteínas no proteossoma; quebra de ligação peptídica
281	Spliceosome Rna helicase bat 1	107	IPI00215291	5,4/49,0	5,6/56,0	↓	experimentais em comparação aos controle	Relacionado ao processo de transcrição (splicing)
205	T complex protein 1 subunit gama	65	IPI00372388	6,6/60,6	6,4/67,0		Ausente no grupo 5 mg/L	Chaperona molecular que auxilia o dobramento de proteínas após a hidrólise do ATP. Conhecida por ter ação chaperona nas moléculas de actina e tubulina.
426	Ubiquitin Carrier protein	137	IPI00557167	8,8/17,9	9,3/19,0		Ausente nos grupos experimentais	Modificação de proteína, regulação de ativação de proteína

↓ Expressão reduzida ↑ Expressão aumentada

5.3.3.5 Proteínas relacionadas ao metabolismo

Foram identificadas 49 proteínas nesta categoria (Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25). Para facilitar a compreensão dos resultados, bem como sua discussão, este tópico foi dividido em: metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídios, metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético e miscelânea.

5.3.3.5.1 Metabolismo de carboidratos

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo, 9 estavam relacionadas ao metabolismo de carboidratos (Tabela 21). A *mitochondrial, Malate dehydrogenase* (EC.1.1.1.37) estava ausente no grupo de 50 mg/L de fluoreto. A Malato desidrogenase é uma importante enzima que funciona em duas vias metabólicas, na gliconeogênese e no ciclo do ácido cítrico, convertendo a Oxaloacetato em L-Malato na gliconeogênese ou L-Malato em Oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico (NELSON; COX, 2002). De acordo com Barbier; Arreola-Mendoza; Razo (2010) o fluoreto tem um efeito inibitório na atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico.

A *Sedoheptulokinase* (EC.2.7.1.14) normalmente converte sedoheptulose em sedoheptulose-7-fosfato, que é metabolizada pelas enzimas da via das pentoses-fosfato (KARDON et al., 2008). A *Xylulose Kinase* (EC.2.7.1.17) é responsável pela reação $\text{ATP} + \text{D-xylulose} = \text{ADP} + \text{D-xylulose 5-phosphate}$. Já a *L-xylulose reductase* catalisa (EC. 1.1.1.10) a reação $\text{Xylitol} + \text{NADP}^+ = \text{L-xylulose} + \text{NADPH}$. Esta redução é NADPH-dependente, participando da metabolização de várias pentoses, tetroses, trioses, compostos de alfa-dicarbonila e L-xylulose. Estas enzimas têm relação com a via das pentoses fosfato, que é responsável pela produção de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH é um redutor quase universal nas vias metabólicas, sendo que nos mamíferos essa função é muito importante nos tecidos ativamente envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e esteróides, particularmente no fígado. Outra função da via é a de gerar as pentoses, especialmente a D-ribose, que é empregada na biossíntese dos ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2002). Foi observada a ausência destas enzimas no grupo de 5 mg/L de fluoreto, o que poderia acarretar alterações na via das pentoses fosfato no fígado.

A *L-lactate dehydrogenase A chain* (EC. 1.1.1.27) é uma enzima que converte o piruvato em Lactato com regeneração de NAD em NADH. É uma via alternativa para suprir a falta de oxigênio para a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos na glicólise (NELSON; COX, 2002). Xiong, et al. (2007) encontraram uma relação dose-resposta entre os níveis de fluoreto na água e danos na função hepática de crianças. Os autores observaram um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH), dosada a partir do soro de crianças que ingeriam água contendo mais que 2 mg/L de fluoreto. Ge et al.(2011) encontraram também uma superexpressão desta enzima em cérebro de ratos tratados com fluoreto, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, onde ela não foi encontrada nos grupos experimentais. A diminuição da expressão da *L-lactate dehydrogenase A chain*, relacionada à via do lactato, bem como de enzimas relacionadas ao ciclo das pentoses relatadas acima poderia indicar que na presença de fluoreto no fígado estas vias estariam sendo alteradas e isso poderia ter alguma relação com o fato de as enzimas da via glicolítica terem sido superexpressas como será relatado em seguida, sugerindo, possivelmente, um mecanismo de compensação.

Fructose-bisphosphate aldolase B (EC.4.1.2.13) teve sua expressão aumentada no grupo de 50 mg/L de fluoreto, o que também foi observado no trabalho de Kobayashi et al. (2009), que relatou uma superexpressão de aldolase nos rins dos ratos que receberam 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Esta enzima participa da fase preparatória da via glicolítica, clivando a frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (NELSON; COX, 2002). De acordo com Kobayashi et al.(2009) esse aumento poderia ser um sinal de início de alterações metabólicas das células. O fluoreto é capaz de inibir a enolase e esse aumento da expressão da aldolase (*upstream* em relação à enolase na via glicolítica) poderia ser uma tentativa da célula de garantir a eficiência dessa via (KOBAYASHI et al.2009; WARBURG; CHRISTIAN, 1941). A *Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial* catalisa a conversão do piruvato em acetil-CoA e CO₂, regulando, desta maneira, o fluxo metabólico (NELSON; COX, 2002). Leite (2010) encontrou alteração em proteína semelhante, a *Pyruvate dehydrogenase complex component E2* (PDC-E2). Foi observada uma redução significativa e

dose-dependente da atividade da PDC-E2 nos rins de ratos tratados com doses agudas de fluoreto, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, ou seja, um aumento de expressão no grupo de 50 mg/L de fluoreto em comparação ao controle. A *isoform R-type of Piruvate kinase isozymes R/L* (EC.2.7.1.40) teve sua expressão aumentada no grupo 5 mg/L de fluoreto. A Piruvato quinase é uma importante enzima da via glicolítica, sendo responsável pela conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato e ainda é um importante sítio de regulação (NELSON; COX, 2002). Como se pode observar, várias enzimas relacionadas à glicólise tiveram sua expressão aumentada no fígado nos grupos experimentais, indicando que, diferentemente do que foi observado para o rim, o fluoreto possivelmente não gerou uma inibição e sim intensificação da via e em contrapartida uma diminuição da via alternativa do lactato e também da via das pentoses fosfato.

Tabela 21 Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de carboidrato” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressão	Função Biológica
432	Afmid aryformamidase	84	IPI00882532	5,1/34,4	5,7/37,0	Ausente nos grupos experimentais	Metabolismo de carboidratos
305	Fructose-bisphosphate aldolase B	84	IPI00471911	8,5/39,5	9,3/ 42,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle e 5 mg/L	Metabolismo de carboidratos
433	L-lactate dehydrogenase A chain	649	IPI00197711	8,4/36,4	8,5/ 37,0	Ausente nos grupos experimentais	Metabolismo de carboidratos
6	L-xylulose reductase	172	IPI00200794	/25,7	6,9/30,0	Ausente no grupo de 5 mg/L	Ciclo das pentoses, metabolismo de carboidratos
356	Malate dehydrogenase	156	IPI00197696	8,9/ 35,7	9,1/39,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Metabolismo de carboidratos, gliconeogênese e ciclo do ácido cítrico
187	isoform R-type of Piruvate kinase isozymes R/L	91	IPi00202549	6,9/6 2,2	6,4/63,0	↓ 5mg/L em comparação ao controle e 50 mg/L	Metabolismo de carboidratos
93	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	66	IPI00194324	6,6/38,9	5,4/37,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de carboidratos
400	Sedoheptulokinase	158	IPI00369973	5,8/50,6	5,6/50,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Atividade de quinase, via das pentoses fosfato
181	Xylulose Kinase	67	IPI00371141	6,7/59,6	6,8/61,0	Ausente no grupo de 5 mg/L	Quinase relacionada com o ciclo das pentoses

↑ Expressão aumentada ↓ Expressão reduzida

5.3.3.5.2 Metabolismo de lipídios

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo, 9 estavam envolvidas no metabolismo de lipídios (Tabela 22). A *Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial* e estava ausente no grupo 50 mg/L de fluoreto, enquanto que a *3-Ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial* (EC.2.3.1.16) estava com a expressão aumentada no grupo 50 mg/L de fluoreto em relação ao grupo de 5 mg/L de fluoreto. Ambas fazem parte da beta oxidação de ácidos graxos. A *Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial* (VLCAD, EC.1.3.99) é uma flavoproteína e tem o FAD como grupo prostético. Participa do primeiro passo da beta oxidação, sendo específica para um dado intervalo de comprimento da cadeia carbônica do acil-CoA graxo, agindo sobre os ácidos graxos de 12 a 18 átomos de carbono. Já a *3-Ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial* está envolvida no quarto e último passo da via (Nelson e Cox, 2002). Com esse resultado, poder-se-ia supor que a produção de ácidos graxos de cadeia longa poderia estar comprometidos pela ausência da VLCAD, enquanto que a produção de ácidos graxos de cadeias menores estaria aumentada, já que a tiolase apresentou aumento de expressão no grupo 50 mg/L de fluoreto.

A *Isoform 1 Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1* (EC.1.3.3.6) e a *Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase* (EC.1.3.1.38), que teve sua expressão aumentada no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle, *acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1^a*, que estava ausente no grupo de 50 mg/L de fluoreto e a *3-Ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal*, (EC.2.3.1.16) que estava ausente nos grupos experimentais em relação ao controle, também participam na β -oxidação, mas nos peroxissomos, que são compartimentos celulares enclausurados por membranas. Neles, a β -oxidação ocorre de forma similar tendo, no entanto algumas diferenças, como a produção de H_2O_2 , que é então decomposto pela catalase (NELSON; COX, 2002; HIJIKATA et al. 1987). Assim como foi observado para a β -oxidação na mitocôndria, proteínas relacionadas à primeira e à quarta etapa tiveram sua expressão alterada. Contrariamente ao observado para as enzimas mitocondriais, houve um aumento na expressão de proteínas relacionadas à primeira etapa (*Isoform 1 Peroxisomal acyl-coenzyme*

A *oxidase 1* e *Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase*) e uma diminuição das proteínas relacionadas à quarta etapa (*3-Ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal* e a *acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1a*) nos grupos experimentais em relação ao controle. Kobayashi et al. (2009) também observaram alterações nas células renais em uma proteína relacionada à β -oxidação de lipídios. Foi observado um aumento na expressão da *enoyl coenzyme A hydratase*, que participa da segunda etapa da β -oxidação no rim do grupo tratado com 50 mg/L de fluoreto, em relação ao controle. Xu et al., (2005) observaram, no entanto uma super expressão da enzima *propionyl-CoA carboxylase* (enzima também relacionada ao metabolismo de ácidos graxos) na presença de 100 mg/L de fluoreto em rins de ratos, sugerindo um vigoroso estado de metabolismo dos ácidos graxos.

A *Carboxylesterase 3*, que está envolvida na síntese de ácidos graxos, estava ausente no grupo de 5 mg/L de fluoreto. Isto, associado à ausência de 3 enzimas da via das pentoses fosfato observada no mesmo grupo experimental poderia prejudicar a biossíntese de ácidos graxos no fígado. O prejuízo na biossíntese de ácidos graxos também poderia ser causado pela presença da *Estrogen sulfotransferase isoform 3 (EST, EC.2.8.2.4)*, encontrada apenas no grupo de 50 mg/L de fluoreto. Sulfatação é um processo importante na modulação da atividade de transporte e excreção de hidroxiesteróides e estrógenos. Isso porque os esteróides conjugados de sulfato não podem ativar os receptores de esteróides devido à adição do grupo carregado de sulfonato, são mais solúveis em água e, portanto, mais facilmente eliminado do que as formas não conjugadas. Além disso, os esteróides sulfatos podem servir como formas de transporte de esteróides (FALANY et al., 1995). O estrogênio regula a massa e distribuição de gordura e o metabolismo da glicose. Foi relatado que a superexpressão da EST diminui a diferenciação dos adipócitos primários, o que está associado com redução na síntese de ácidos graxos (KHOR et al., 2010).

A *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial* (HMG-CoA sintase, EC.2.3.3.10) estava ausente no grupo de 50 mg/L de fluoreto e a *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic* estava ausente no grupo de 5 mg/L de fluoreto. Estas enzimas catalisam a condensação acetil-CoA e acetoacetyl-CoA para 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (EC 2.3.3.10). Estão

localizadas na matriz mitocondrial e no citoplasma dos hepatócitos, respectivamente. A enzima mitocondrial é necessária para a síntese de corpos cetônicos, (3-hidroxibutirato e acetoacetato,) que são combustíveis importantes durante o jejum, tanto para o cérebro quanto para os tecidos periféricos. Eles são sintetizados no fígado, utilizando acetil-CoA produzida pela β -oxidação dos ácidos graxos, embora possam ser derivados de certos aminoácidos, como a leucina. Duas moléculas de acetil-CoA se condensam para formar acetoacetil-CoA, que reage com água e uma terceira molécula de acetil-CoA para formar HMG-CoA. Este é clivado a acetil-CoA e acetoacetato, que pode ser reduzido para 3-hidroxibutirato (MORRIS et al., 1998). Deficiências nestas enzimas podem levar a severa hipoglicemia hipotética, hepatomegalia leve e levar ao acúmulo de gordura no fígado (MORRIS et al., 1998; ALEDO et al., 2006). Assim, a ausência desta proteínas nos grupos experimentais poderia ser mais uma justificativa para as inclusões lipídicas encontradas nas análises histológicas do fígado dos grupos que receberam 5 e 50 mg/L de fluoreto no presente trabalho (Figuras 12 B e C, respectivamente).

Tabela 22 Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Lipídios” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressão	Função Biológica
439	3-Ketoacyl- CoA thiolase B, peroxisomal	296	IPI00370596	9,2/43,8	8,4/43,0	Ausente nos grupos experimentais	Metabolismo de lipídios, acetil-CoA C-aciltransferase
312	<i>acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A</i>	129	IPI00565330	8,4/31,1	8,4/41,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Envolvida na beta oxidação dos ácidos graxos
302	3-Ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	154	IPI00201413	8,27/41,8	9,1/45,0	↑ 50mg/L em Comparação ao controle e 5 mg/L	Metabolismo de lipídios, beta oxidação
358	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	364	IPI00213057	9,2/70,8	8,2/72,0	Ausente no grupo de 50 mg/L	Envolvida na formação de cadeias longas e muito longas de ácidos graxos
279	Isoform 1 Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	123	IPI00211510	7,9/69,3	7,6/55,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Relacionada ao metabolismo de lipídios, beta oxidação
383	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	64	IPI00188158	5,6/57,4	5,6/ 53,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Metabolismo de lipídios, formação de corpos cetônicos
317	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	258	IPI00210444	8,3/53,1	8/55,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Metabolismo lipídios, formação de corpos cetônicos
328	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	321	IPI00326195	8,9/32,4	9,5/36,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de lipídios, catabolismo, transporte e processos celulares
443	Estrogen sulfotransferase isoform 3	170	IPI00198376	5,9/	5,9/35,0	Presente no grupo 50	Metabolismo de lipídios ,

	35,4	mg/L	síntese de esteróide
<hr/>			
↑	Expressão aumentada		

5.3.3.5.3 Metabolismo de aminoácidos

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo, 20 estavam relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (Tabela 23).

A *Glutathione S transferase alpha1*, a *Glutathione S-transferase theta-2* e a *Glutathione S-Transferase Mu1* (GSTM1) fazem parte de uma família de proteínas relacionadas à degradação de aminoácidos, mas também com o metabolismo de xenobióticos. Sua função biológica é conjugar a glutathione reduzida para um grande número de eletrófilos hidrofóbicos exógenos e endógenos. De acordo com Wilce e Parker (1994) as Glutathione S-transferases (GSTs) (EC 2.5.1.18) são uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na detoxificação celular e excreção de muitos xenobióticos e substâncias fisiológicas. Chattopadhyay et al. (2010) relataram que as GSTs contribuem para a biotransformação de xenobióticos conjugados, que são compostos muitas vezes eletrofílicos e pouco lipofílicos por natureza. A conjugação com glutathione reduzida facilita a dissolução na parte aquosa presente no interior ou fora da célula, facilitando sua remoção do organismo, promovendo assim atividade desintoxicante de compostos endógenos, tais como lipídios peroxidados, bem como de xenobióticos diferentes. Todas as proteínas identificadas pertencentes a esta família apresentaram um aumento na expressão mediante exposição ao fluoreto, sendo que a *Glutathione S transferase alpha1* teve sua expressão aumentada no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle e ao 5 mg/L de fluoreto, enquanto que a GSTM1 estava presente apenas no grupo 50 mg/L de fluoreto e a *Glutathione S-transferase theta-2* estava aumentada no grupo 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Aumento significativo na atividade da GST no fígado de ratos tratados com água de beber com concentrações de 15 e 150 mg/L de NaF por 30 dias e 15 mg/L de NaF por 60 dias foi observado recentemente (CHATTOPADHYAY et al., 2010) e os autores relacionaram esse aumento de atividade, concomitantemente com o aumento nas dosagens de antioxidantes, com uma tentativa de reduzir o estresse oxidativo causado pela exposição ao fluoreto. Os autores concluíram ainda que a exposição a altas doses de fluoreto induz hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em

camundongos, o que foi evidenciado pelo estresse oxidativo e alterações histopatológicas no fígado e nos rins. No presente trabalho, o aumento observado na expressão desta família de proteínas parece indicar uma tentativa de combater o estresse oxidativo que ocorre em função da intoxicação pelo fluoreto (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010; STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010; ZHAN et al., 2006).

A proteína *2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial* teve um aumento na expressão no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle e a *2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial* estava ausente no grupo de 5 mg/L de fluoreto. A família dos complexos enzimáticos das 2-oxo desidrogenases (EC.1.2.4.4) catalisa a conversão de alfacetoácidos para acil-CoA e CO₂. Contém múltiplas cópias de 3 grandes componentes enzimáticos: *branched-chain alpha-keto acid decarboxylase* (E1), *lipoamide acyltransferase* (E2) e *lipoamide dehydrogenase* (E3). Estas proteínas são homodiméricas (α_2) ou heterotetraméricas ($\alpha_2\beta_2$) e como parte deste complexo enzimático (E1) estão envolvidas na degradação de aminoácidos (ÆVARSSON et al., 1999). O aumento de expressão da 2-oxoisovalerato desidrogenase pode ser o resultado da ativação de mecanismos compensatórios para superar um bloqueio na β -oxidação de ácidos graxos (MENESES-LORENTE et al., 2004). Meneses-Lorente et al. (2004) utilizaram análise proteômica com intuito de achar biomarcadores para esteatose hepatocelular em ratos. As mudanças proteômicas foram observados precocemente, e muitas delas poderiam ser associadas com conhecidos mecanismos toxicológicos envolvidos na esteatose hepática. Isto incluiu um aumento da expressão da piruvato desidrogenase, fenilalanina hidroxilase, e 2-oxoisovalerato desidrogenase, que estão envolvidas na produção de acetil-CoA, e baixa expressão de sulfito oxidase, que poderia desempenhar um papel no acúmulo de triglicérides. Além disso, a baixa expressão de chaperonas e da *glucose-regulated protein 78*, foi consistente com a expressão diminuída da *paraoxonase* secretora de proteínas séricas, albumina, e peroxiredoxina IV. A associação dessas alterações de proteínas com dados clínicos e histológicos e sua ocorrência antes do início das mudanças bioquímicas sugerem que eles podem servir como biomarcadores preditivos de compostos com uma

propensão para induzir a esteatose hepática. Esses achados estão de acordo com os resultados do presente trabalho, onde foi observada uma diminuição da expressão de chaperonas, GRP78 e *peroxiredoxin* nos grupos experimentais, principalmente no grupo de 50 mg/L de fluoreto e alta expressão de piruvato desidrogenase e *2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta* no grupo de 50 mg/L de fluoreto. Isso ajuda a explicar a presença de inclusões lipídicas no fígado dos ratos tratados com 50 mg/L de fluoreto (Figura 12, C).

A *Arginase – liver type* estava com expressão reduzida no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação ao grupo de 5 mg/L de fluoreto. Participa do metabolismo da Arginina catalisando a seguinte reação: $\text{L-arginine} + \text{H}_2\text{O} = \text{L-ornithine} + \text{urea}$ (EC 3.5.3.1). Esta proteína é um importante marcador para injúria no fígado, pois ela é específica deste órgão e participa do ciclo da uréia. Após testes e comparações com outras enzimas, o aumento desta foi o mais sensível para indicar danos hepáticos (IKEMOTO et al., 2001). Assim, o aumento na expressão desta enzima no grupo de 50 mg/L de fluoreto poderia ser um indicativo de danos hepáticos, que é sabido ocorrerem mediante exposição a altas doses de fluoreto (XIONG et al., 2007; SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004).

A *Argininosuccinate synthase* (EC 6.3.4.5) participa da biossíntese da L-arginina, catalisando a seguinte reação: $\text{ATP} + \text{L-citrulline} + \text{L-aspartate} = \text{AMP} + \text{diphosphate} + \text{N(omega)-(L-arginino)succinate}$, como também do ciclo do ácido cítrico. A *Carbamoyl-phosphate syntase (ammonial), mitochondrial* (EC 6.3.4.5) está envolvida no ciclo da ureia, tendo um importante papel na remoção do excesso de amônia das células. A *Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial* (EC 1.4.1.3) está envolvida no metabolismo de aminoácidos e necessita de NAD ou NADP como aceptor. A *Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial* (EC 1.3.99.10), que está relacionada à degradação de aminoácidos, tem como cofator a FAD. A *Serine hydroxymethyltransferase* (EC:2.1.2.1) atua no metabolismo de aminoácido da glicina, treonina e serina. Todas as enzimas descritas acima tiveram expressão aumentada no grupo de 50 mg/L de fluoreto em comparação ao controle. Já a *Dimethyglycine dehydrogenase, mitochondrial* (EC=1.5.99.2), que está relacionada com a degradação de aminoácidos, teve sua expressão aumentada no grupo de 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Xu et al. (2005) também observaram

aumento de expressão das proteínas *Argininosuccinate synthase* e *glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial* no rim de ratos tratados com 100 mg /L de fluoreto. Os autores relataram que o aumento de expressão de enzimas que estão relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e ureia indica um estado vigoroso do metabolismo de proteínas.

A *Aryformamidase* (EC 3.5.1.9) estava ausente nos grupos experimentais. É uma hidrolase que atua em pontes de carbono-nitrogênio e em outras pontes de peptídios. Atua no metabolismo de aminoácidos, mais especificamente no metabolismo do triptofano. A *Formimidoyltransferase-cyclodeaminase* teve sua expressão reduzida no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle.

A *Aspartate aminotransferase, mitochondrial* (EC.2.6.1.1) estava com expressão diminuída no grupo 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Esta enzima facilita a conversão de aspartato e alfa cetoglutarato em oxaloacetato e glutamato. A *Dihydrodipicolinate synthase-like, mitochondrial* (DHDPSL) estava ausente no grupo de 50 mg/L de fluoreto. Esta enzima catalisa a etapa final da via metabólica de hidroxiprolina, lançando produtos glioxilato e piruvato, estando presente apenas no fígado e nos rins (BELOSTOTSKY et al., 2010). A *Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial* (MMSDH, EC 1.2.1.27) estava com expressão reduzida no grupo de 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. A MMSDH catalisa uma descarboxilação irreversível oxidativa do malonato e *methylmalonate-semialdehydes* para acetil e propionil-CoA, respectivamente, em precursores metabólicos de valina e pirimidina. Esta atividade é regulada pelo NAD, NADH e CoA (KEDISHVILI et al., 1991). Todas estas proteínas que tiveram a sua expressão diminuída nos grupos experimentais participam do metabolismo de aminoácidos e estão relacionadas à mitocôndria. Tem sido amplamente descrito que a exposição a altas doses de fluoreto pode provocar alterações mitocondriais (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010).

A *choline dehydrogenase* (CHDH, EC 1.1.99.1) estava ausente nos grupos experimentais. É uma oxirredutase que participa do metabolismo de aminoácido glicina, serina e treonina. A diminuição da atividade desta enzima no fígado está associada a uma diminuição do conteúdo de ATP mitocondrial (JOHNSON et al., 2010). A ausência desta enzima nos grupos experimentais

poderia indicar um prejuízo função mitocondrial, levando a um déficit de ATP, o que é condizente também com a expressão diminuída de ATP sintase descrita mais a frente.

A *Homogentisate 1, 2-dioxygenase* (HGO, EC.1.13.11.5) é uma enzima que catalisa a conversão de *homogentisate* a *4-maleylacetoacetate*, clivando o anel aromático durante a degradação metabólica de Phe e Tyr (TITUS et al., 2000). Deficiência na HGO causa *alkaptonuria* (AKU), devido à incapacidade do organismo para lidar com *homogentisate*, que quando oxidado pelo organismo produzem um composto conhecido como o pigmento ocrônico, o que provoca uma cor preta. Neste caso, o sangue torna-se oxidado (enegrecido), devido ao excesso de pigmento ocrônico, o qual pode se acumular levando à artrite degenerativa e a urina também pode ficar escurecida (ZATKOVA et al., 2000). Esta enzima não foi detectada no grupo de 5 mg/L de fluoreto, sugerindo deficiência de conversão do *homogentisate*.

A *Alanine glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial* (AGT2, EC.2.6.1.44) catalisa as seguintes reações: L-alanine + glyoxylate = pyruvate + glycine e (R)-3-amino-2-methylpropanoate + pyruvate = 2-methyl-3-oxopropanoate + L-alanine. É uma aminotransferase piridoxal. AGT2, também pode utilizar dimetilarginina assimétrica (ADMA) como um doador de aminoácidos, levando à formação de α -keto- δ -N,N-dimethylguanidino valeric acid (DMGV). Concentrações sanguíneas elevadas de (ADMA), um inibidor endógeno do óxido nítrico (NO) sintase, são encontradas em associação com diabetes, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, e aterosclerose. A ADMA pode ser regulada por uma via alternativa de alanina aminotransferase-glioxilato 2 (RODIONOV et al., 2009). A superexpressão de AGT2 humana no fígado de camundongos, utilizando vetores, produziu reduções significativas nos níveis de ADMA no plasma e no fígado. Logo a AGT2 humana é capaz de metabolizar efetivamente ADMA *in vivo*, resultando em diminuição dos níveis de ADMA e aumentando a produção de NO endotelial (RODIONOV et al., 2009). Consequentemente, a ausência desta enzima no grupo de 5 mg/L de fluoreto poderia ter provocado alterações na produção de NO.

Tabela 23. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Aminoácidos” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressão	Função Biológica
385	Alanine glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	74	IPI00213584	8,2/57,2	7,6/55,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Metabolismo de aminoácidos, aminotransferase, enzima mitocondrial
166	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	176	IPI00205018	8,3/57,7	7,7/57,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos
117	Arginase – liver type	204	IPI00327518	7,3/34,9	7,2/ 42,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle e 5 mg/L	Metabolismo de aminoácidos Metabolismo de nitrogênio
140	Argininosuccinate synthase	120	IPI00211127	7,9/46,5	7,7/49,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos
147	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	110	IPI00365663	7,9/50,6	6,2/48,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Metabolismo de aminoácidos
109	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	79	IPI00201636	6,8/42,8	5,4/40,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos
173	Carboxylesterase 3	193	IPI00326972	6,5/62,1	6,6/60,0	Ausente no grupo de 5 mg/L	Metabolismo de lipídios
441	choline dehydrogenase	169	IPI00358005	8,6/66,4	8,3/38,0	Ausente nos grupos experimentais	Metabolismo de aminoácidos
259	Carbamoyl-phosphate syntase (ammonial), mitochondrial	447	IPI00210644	6,5/161,6	6/134,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos e eliminação de amônia
418	dihydrodipicolinate synthase-like, mitochondrial	121	IPI00560967	8,3/34,5	7,9/38	Ausente no grupo 50 mg/L	Metabolismo de aminoácidos (Belostotsky et al., 2010)

373	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	164	IPI00207941	7,2/95,9	6,5/ 87,0	↑ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos
178	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	89	IPI00211392	5,9/ 58,9	5,9/58,0	↓ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos (histidina)
175	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	162	IPI00324633	8,1/61,4	7,260,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos ou nitrogênio
402	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	634	IPI00210920	9,4/47,3	9,6/44,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos, aminotransferase
43	Glutathione S transferase alpha1	75	IPI00231638	9,2/25,6	9,5/27,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle e 5 mg/L	Metabolismo de aminoácidos, degradação de aminoácidos, e metabolismo de xenobióticos
446	Glutathione S-Transferase Mu1	486	IPI00231639	8,0/25,9	8,73/ 27,0	Presente no grupo 50mg/L	Metabolismo de aminoácidos, degradação de aminoácidos, e metabolismo de xenobióticos
47	Glutathione S-transferase theta-2	315	IPI00231858	8,1/ 27,4	8,6/27,0	↑ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos, degradação de aminoácidos, e metabolismo de xenobióticos
387	homogentisate 1, 2-dioxygenase	100	IPI00556987	7,1/49,8	7,1/55,0	Ausente no grupo 5 mg/L	Relacionada ao metabolismo de aminoácidos (tirosina e fenilalanina)
128	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	66	IPI00193716	7,99/46,4	6,5/45	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos, Degradação
158	Serine hydroxymethyltransferase	107	IPI00421364	7,9/ 75,3	6,7/62,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de aminoácidos (glicina, valina e treonina)

↑ Expressão aumentada ↓ Expressão reduzida

5.3.3.5.4 Metabolismo energético

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo, 6 estavam relacionadas ao metabolismo energético (Tabela 24).

A *ATP synthase mitochondrial* (EC 3.6.3.14) é uma ATPase composta por dois domínios estruturais do tipo F (F_0F_1). A porção F_0 é um complexo integral de membrana localizado na membrana interna mitocondrial, envolvido na translocação dos prótons provenientes da cadeia respiratória. Já a porção F_1 é um complexo extramembranar voltado para a matriz mitocondrial, formado por nove subunidades de 5 tipos diferentes, com composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (WALKER et al., 1985; COLLINSON et al., 1994; NELSON; COX, 2002). As subunidades α e β são estruturalmente similares, dispostas de modo a formar uma estrutura similar aos gomos de uma laranja. Cada subunidade apresenta 3 domínios: um N-terminal pequeno, um domínio de ligação a nucleotídeo e um domínio C-terminal helicoidal. Porém, apenas a subunidade β apresenta mudanças conformacionais, designadas β -vazia, β -ADP e β -ATP, sendo essas mudanças cruciais para a síntese de ATP, uma vez que as unidades α e β giram, catalisando, assim a formação do ATP. O mecanismo proposto é que uma subunidade β começa na conformação β -ADP, que tem afinidade pelo ADP e P_i presente no meio, que quando se ligam, mudam a conformação para β -ATP, o qual, por sua vez, liga firmemente e estabiliza o ATP, promovendo assim o equilíbrio do $ADP+P_i$ com o ATP na superfície da enzima. Por fim, a subunidade muda para a conformação β -vazia, que possui uma baixa afinidade ao ATP o qual então deixa a superfície da enzima. O giro das subunidades é impulsionado pelo fluxo de prótons que passam através de F_0 (NELSON; COX, 2002; LEYVA; BIANCHET; AMZEL, 2003). No presente trabalho, foram identificadas a *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial* com expressão reduzida no grupo 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle, a *ATP synthase subunit beta, mitochondrial*, que estava ausente nos grupos experimentais, e a *ATP syntase gamma chain*, que estava ausente no grupo 50 mg/L de fluoreto. Portanto, de forma geral, foi observada uma redução na expressão de ATP sintase nos grupos experimentais. Leite (2010) identificou as subunidades α e β (F_1) e O (F_0) as quais tiveram também uma diminuição de expressão nos grupos experimentais quando comparados ao controle, sugerindo que a exposição aguda a altas doses de fluoreto levaria a uma redução na síntese de

ATP, acarretando em prejuízos energéticos ao organismo, e consequentemente afetando todas as funções celulares ATP-dependentes. Redução na produção de ATP mediante exposição a altas doses de fluoreto tem sido constantemente descrita na literatura (STRUNECKA et al., 2007; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010).

O *Cytocrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial* (EC.1.10.2.2) e o *Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial* são proteínas solúveis do espaço intermembranas das mitocôndrias, que fazem parte dos complexos III e IV, respectivamente, da cadeia transportadora de elétrons durante a fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2002). Foi observada uma diminuição de expressão no grupo 50 mg/L de fluoreto em relação ao grupo 5 mg/L de fluoreto para o citocromo c, enquanto que para o citocromo b-c1 foi observada uma dose resposta ao tratamento do fluoreto (50>5>controle). Lee et al. (2008) relataram que o NaF resultou em um aumento no nível de citocromo c liberado da mitocôndria para o citosol de maneira dose-dependente em fibroblasto gengival humano. De acordo com Barbier; Arreola-Mendoza e Razo (2010), a inibição do citocromo c causa diminuição de produção de ATP e aumento celular de nível de ADP, AMP, GDP e Pi, e a longo prazo esta inibição é tóxica para a célula por reduzir a produção de ATP, necessário para suprir os requerimentos energéticos celulares. Com a persistência desta inibição, ocorre uma produção endógena e ativação de óxido nítrico, o qual leva à inibição da respiração mitocondrial pela aparente inibição da afinidade do citocromo c por oxigênio. O aumento na dose-dependente na expressão de citocromo b-c1, “upstream” ao citocromo c, poderia ser uma tentativa da célula em regular o fluxo energético em função da redução da expressão de citocromo c, localizado em um ponto abaixo na cadeia transportadora de elétrons.

Uma proteína ainda não caracterizada, cujo gene correspondente é descrito na base de dados RGD como RGD1306809 estava ausente no grupo de 5 mg/L de fluoreto. A quinase de NAD(+) catalisa a seguinte reação: $ATP + NAD(+) = ADP + 2 H(+) + NADP(+)$ (GO:0003951). A sua ausência no grupo experimental poderia estar relacionado à baixa produção de ATP, substrato da reação catalisada, conforme descrito anteriormente. Deve ser ressaltado não há informações adicionais sobre esta proteína na literatura, o que indica que seu papel biológico deve ainda ser melhor elucidado.

Tabela 24 Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Metabolismo de Energético” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressão	Função Biológica
282	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	660	IPI00396910	9,7/59,8	8,8/ 59,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo energético
437	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	100	IPI00551812	4,9/56,3	4,8/52,0	Ausente nos grupos experimentais	Metabolismo energético
380	ATP syntase gamma chain	152	IPI00948302	9,5/ 32,9	4,3/32,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Metabolismo energético
136	RGD1306809	225	IPI00212104	7,5/48,1	6,2/46,0	Ausentes no grupo 5mg/L	Catalisa reação de ATP+ NAD=ADP+2H(+). Kinase
20	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	203	IPI00192246	6,5/16,1	4,9/16,0	↓ 50 mg/L em comparação ao 5 mg/L	Metabolismo energético, fosforilação oxidativa
320	Cytocrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	77	IPI00471577	5,7/52,8	5,3/50,0	↑ 5 mg/L em comparação ao controle ↑ 50 mg/L em comparação ao 5 mg/L	Metabolismo energético, fosforilação oxidativa

↑ Expressão aumentada ↓ Expressão reduzida

5.3.3.5.5 Miscelânea

Cinco proteínas que não puderam ser classificadas nas categorias de metabolismo descritas acima, ou que estariam classificadas em mais de uma delas, foram agrupadas na presente categoria (Tabela 25).

A enzima *Inosine triphosphatase* (EC 3.6.1.19) catalisa a hidrólise de inosina trifosfato e deoxyinosine trifosfato para nucleotídeos monofosfatados e difosfato. No presente trabalho, esta enzima teve expressão aumentada no grupo 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle. É sabido que a quantidade total de nucleotídeos nas células (excluindo o ATP) é muito pequena (1% ou menos da quantidade requerida para a síntese de DNA celular). Portanto, a síntese de nucleotídeos precisa continuar ocorrendo durante a síntese dos ácidos nucleicos e, em alguns casos, pode limitar as velocidades de replicação e transcrição do DNA. Existem dois tipos de vias que levam até os nucleotídeos: as vias “de novo” e as vias de recuperação. A partir do inosinato monofosfato (IMP) é possível formar adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP) (NELSON; COX, 2002). A expressão aumentada da *Inosine triphosphatase* no grupo de 50 mg/L de fluoreto em relação ao controle poderia refletir a necessidade celular de suprir a demanda por nucleotídeos devido à exposição à alta dose de fluoreto.

A *Retinal dehydrogenase I* (RALDH 1, EC 1.2.1.36), enzima envolvida na biossíntese de vitaminas e co-fatores, teve sua expressão reduzida no grupo 5mg/L de fluoreto em comparação ao controle. É capaz de converter o retinol 9-cis e todos retinois trans em ácido retinóico com alta eficiência. O Ácido retinóico (RA) constitui o principal ingrediente ativo de vitamina A e é necessário para diversos processos biológicos. O nível tecidual de RA é mantido através de uma cascata de reações metabólicas onde atuam desidrogenases retinais (RALDHs). Os metabólitos de colesterol ativam a expressão do gene *raldh* (HUQ et al., 2006). As alterações no metabolismo de lipídios observadas no presente trabalho poderiam ter levado a uma diminuição na expressão desta proteína.

A *Thiosulfate sulfurtransferase* (EC 2.8.1.1), também conhecida como *rhodanese*, estava ausente no grupo 50mg/L de fluoreto. Esta enzima está

envolvida na formação de complexos ferro-enxofre, desintoxicação por cianeto ou modificação de enzimas com enxofre. Foi relatada uma expressão aumentada no rim de ratos submetidos a 100 mg/L de fluoreto (XU et al., 2005), contrariamente observado no presente trabalho para a dose de 50 mg/L de fluoreto, que levou à ausência de expressão da enzima. É sabido que a *rhodanese* auxilia na manutenção de um estado ambiental oxidado, que é necessário para o *folding* oxidativo de proteínas, para que as mesmas sofram processo de maturação. Entretanto, a manutenção deste estado oxidado gera espécies reativas de oxigênio (TU; WEISSMAN, 2004). Assim, a ausência de expressão da *rhodanese* no grupo de 50 mg/L de fluoreto no presente trabalho poderia ser uma adaptação do organismo para reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio, o que não estaria ocorrendo em doses ainda maiores de fluoreto como as utilizadas por Xu et al. (2005), quando alterações teciduais mais severas já estariam presentes.

A *Carbonic anhydrase 3* (EC=4.2.1.1), enzima que catalisa a hidratação reversível de dióxido de carbono e que também participa na resposta do fígado ao estresse oxidativo, teve uma expressão reduzida no grupo de 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Esta enzima também pode servir como um removedor de espécies reativas de oxigênio, para proteger hepatócitos de danos oxidativos e a redução na sua expressão pode permitir a produção de radicais livres nos hepatócitos (WONG et al. 2010). O estresse oxidativo tem sido observado como um efeito da intoxicação pelo fluoreto (SHANTHAKUMARI; SESHACHALAM; SUBRAMANIAN, 2004; BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; RAZO, 2010; STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010; ZHAN et al., 2006).

Outra enzima identificada no presente estudo foi a *Alcohol dehydrogenase 1* (EC.1.1.1.1), também conhecida como aldeído redutase. Esta enzima catalisa a redução NADPH-dependente de uma variedade de aldeídos aromáticos e alifáticos aos álcoois correspondentes. Também catalisa a redução do mevaldato ao ácido mevalônico, do gliceraldeído ao glicerol e a reação de redução NADPH-dependente do 3-deoxyglucosone (3-DG), agindo, portanto, sobre diferentes substratos. Esta enzima foi bastante estudada por sua importância no processo de diabetes, onde podem ocorrer modificações de proteínas pelo excesso de glicose. Os resíduos metabólicos provenientes do

metabolismo da glicose e frutose podem se unir a proteínas, modificando-as ou levando à formação de ligações cruzadas entre as cadeias moleculares de proteínas poliméricas, originando os produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (MONNIER; CERAMI, 1981; TAKAHASHI et al., 1995; KUSUNOKI et al., 2003). A glicosilação e a formação de ligações cruzadas entre as cadeias moleculares das proteínas reduzem sua flexibilidade, sua elasticidade e a sua funcionalidade. Além disso, as modificações químicas resultantes da glicosilação e das ligações cruzadas, podem disparar reações inflamatórias e auto-imunes. O 3-DG é um potente agente glicosilador e formador de ligações cruzadas, produzido através da degradação dos produtos de Amadori provenientes da reação da Maillard (KATO; SHIN; HAYASE, 1987; TAKAHASHI et al., 1995). Tem, portanto, propriedades altamente tóxicas para as células e está associado a complicações severas do diabetes, incluindo nefropatia, retinopatia e neuropatias (RAHBAR et al., 1999). Daí a importância da ADH, uma vez que esta enzima catalisa a redução do 3-DG, promovendo assim a desintoxicação do organismo (TAKAHASHI et al., 1995). No estudo de Kobayashi et al. (2009) foi observada uma diminuição na expressão da ADH em rins de ratos submetidos cronicamente a 50 ppm de fluoreto através da água de beber quando comparados ao controle. No presente estudo também foi observada alteração no grupo de 50mg/L de fluoreto, onde a ADH não foi expressa. Leite (2010), no entanto observou um aumento da expressão nos grupos tratados, de maneira dose-dependente, e relatou que no caso de uma exposição aguda ao fluoreto, o aumento na expressão da ADH poderia estar relacionado a uma tentativa de desintoxicação do organismo.

Em síntese, pode-se observar que a exposição ao fluoreto pode alterar a expressão a nível hepático de proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais, com predominância daquelas relacionadas ao metabolismo. De maneira geral, as alterações foram bem mais pronunciadas no grupo que recebeu a dose mais alta de fluoreto (50 mg/L) através da água de beber. Apesar de estes achados terem sido obtidos em modelo animal, com base em diferenças nos níveis de fluoreto presentes no sangue de animais e humanos submetidos a diferentes doses de fluoreto, indicam que é necessário evitar a exposição endêmica a altos níveis deste elemento. Uma vez que se trata do

primeiro trabalho envolvendo análise proteômica de fígado de animais expostos a diferentes doses de fluoreto, estes achados apontam importantes vias e processos celulares afetados no fígado pela exposição ao fluoreto, os quais devem ser melhor analisados em estudos futuros. Também proteínas que tiveram sua expressão ausente mediante exposição ao fluoreto ou que tiveram sua expressão induzida por este elemento são potenciais biomarcadores para este tipo de exposição e devem ser melhor investigadas.

Tabela 25. Relação de proteínas com expressão significativamente alterada ($p < 0,05$) identificadas na categoria “Miscelânea” no fígado de ratos tratados cronicamente ou não com diferentes doses de fluoreto.

Spot	Proteína	Score	Número de acesso	pI /PM teórico	pI/PM Experimental	Expressão	Função Biológica
438	Alcohol dehydrogenase 1	417	IPI00331983	8,2/40,0	8,6/43,0	Ausente no grupo 50 mg/L	Metabolismo de carboidratos, lipídio ou aminoácido
368	inosine triphosphatase	93	IPI00364474	5,3/22,0	5,3/27,0	↑ 50 mg/L em comparação ao controle	Relacionada ao metabolismo de nucleotídeos, hidrolase
417	Thiosulfate sulfurtransferase	144	IPI00366293	7,9/33,4	8,3/37,0	Ausente no grupo 50mg/L	Relacionada ao metabolismo de S
295	retinal dehydrogenase 1	86	IPI00332042	7,9/54,4	8,4/59,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Biossíntese de vitaminas e co-fatores
65	Carbonic anhydrase 3	124	IPI00230788	7,4/29,4	7,7/30,0	↓ 5 mg/L em comparação ao controle	Metabolismo de nitrogênio, participante na resposta do fígado ao estresse oxidativo
↓ Expressão reduzida ↑ Expressão aumentada							

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que:

- A administração crônica de fluoreto a ratos através da água de beber provoca um aumento significativo, dose-dependente, nas concentrações plasmáticas de fluoreto, embora os níveis hepáticos deste elemento só tenham sido significativamente mais elevados no grupo que recebeu 50 mg/L de fluoreto, quando comparado àquele que recebeu 5 mg/L de fluoreto;
- A administração crônica de fluoreto a ratos através da água de beber, mesmo em altas doses (50 mg/L) não altera a porcentagem ocupada por hepatócitos, veia centro lobular, infiltrado do espaço porta, espaço porta, sinusoides e outras estruturas existentes no tecido, além de não provocar inflamação nem necrose tecidual. Entretanto, foi observada a presença de inclusões lipídicas (esteatose macrovesicular) no grupo que recebeu 5 mg/L de fluoreto, as quais foram intensificadas no grupos que recebeu 50 mg/L de fluoreto.
- A administração crônica de fluoreto a ratos através da água de beber altera a expressão a nível hepático de proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais, com predominância daquelas relacionadas ao metabolismo. De maneira geral, as alterações são mais pronunciadas no grupo que recebeu a dose mais alta de fluoreto (50 mg/L).

Referências

REFERÊNCIAS

- Adachi K, Dote T, Dote E, Mitsui G, Kono K. Strong acute toxicity, severe hepatic damage, renal injury and abnormal serum electrolytes after intravenous administration of cadmium fluoride in rats. *J Occup Health*. 2007; 49:235-41.
- Andrade A. Sequenciamento, identificação e análise das proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*. PAULO, U. D. S. 2006.
- Ævarsson A, Seger K, Turley S, Sokatch JR, Hol WGJ. Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Dehydronature . Struct. Biol*. 1999; 6(8): 785-92.
- Aledo R, Mir C, Dalton RN, Turner C, Pié J, Hegardt FG, et al. Refining the diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29(1):207-11.
- Altschuler GM, Willison KR. Development of free-energy-based models for chaperonin containing TCP-1 mediated folding of actin. *J. R. Soc. Interface*. 2008; 5:1391–408.
- Amacher DE, Adler R, Herath A, Townsend RR. Use of Proteomic Methods to Identify serum biomarkers associated with rat liver toxicity or hypertrophy. *Clin Chem*. 2005; 51(10):1796-803.
- Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(2):136-53.
- Arthur JM, Thongboonkerd V, Scherzer J A, Cai J, Pierce WM, Klein JB. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int*. 2002; 62(4):1314-21.
- Asleh R, Guetta J, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin Genotype– and Diabetes-Dependent Differences in Iron-Mediated Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *Circ Res*. 2005;96:435-41.
- Bantscheff M, Schirte M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 389:1017-31.

Barbier; O, Arreola-Mendoza L, Razo LMD. Molecular mechanism of fluoride toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 2010; 188:319-33.

Baykov AA, Alexandrov AP, Smirnova IN. A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 294(1):238-43.

Baykov AA; Alexandrov AP; Smirnova IN. A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 294(1):238-43.

Bektas M, Nurten R, Gürel Z, Sayers Z, Bermek E. Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Lett.* 1994; 356(1): 89-93.

Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, et al. Mutations in DHAPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *Am J Hum Genet.* 2010; 87(3):392-9.

Bonomini F, Filippini F, Hayek T, Aviram M, Keidar S, Rodella LF, et al. Apolipoprotein E and its role in aging and survival. *Exp. gerontol.* 2010; 45: 149-57.

Briancon D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. *Orthop Clin North Am.* 1981;12:629-48.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease *World J Gastroenterol.* 2010; 16(42):5286-96.

Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2002; 123(1):134-40.

Buzalaf MAR, Salvadori DMF, Marques MEA, Caroselli EE, Leite A L., Camargo EA, et al. Absence of DNA Damage in Multiple Organs after Oral Exposure to Fluoride in Wistar Rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2006; 77:700–706.

Buzalaf MAR. Fluoretos e Saúde Bucal. São Paulo:Livraria Santos Editora;2008.

Buzalaf MAR; Caroselli EE; Cardoso VES; Oliveira RC; Granjeiro JM; Whitford GM. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. J Anal Toxicol. 2005 ; 29(8):810-3.

Buzalaf MAR; Caroselli EE; Oliveira RC; Granjeiro JM; Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. J Anal Toxicol. 2004; 28: 249-52.

Byun H-k, Han N-K, Lee H-J, Kim K-B, Ko Y-G, Yoon G, et al. Cathepsin D and Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 as Promising Markers of Cellular Senescence. Cancer Res. 2009; 69(11):4638-47.

Carvalho JG, Oliveira RC, Buzalaf MA. Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. J Appl Oral Sci. 2006; 14(4):238-41.

Chattopadhyay A, Podder S, Agarwal S, Bhattacharya S. Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice. Arch Toxicol. 2010. DOI 10.1007/s00204-010-0588-7.

Chen E, Proestou G, Bourbeau D, Wang E. "Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis." Exp Cell Res. 2000; 259(1): 140-8.

Cheng T-J, Chen T-M, Chen C-H, Lai Y-K. Induction of Stress Response and Differential Expression of 70 kDa Stress Proteins by Sodium Fluoride in HeLa and Rat Brain Tumor 9L Cells. J Cell Biochem. 1998; 69:221–231.

Chioca LR, Losso EM, Andratini R. Efeitos da intoxicação co flúor no sistema nervoso central. Neurobiologia. 2009; 72(2):117-26.

Cittanova ML; Lelongt B; Verpont MC; Geniteau-Legendre M; Wahbe F; Prie D, et al. Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. Anesthesiology. 1996; 84(2): 428-35.

Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. The Journal of Emergency Medicine. 1999; 17(6):1019-25.

Collinson Ir, Fearnley IM, Skehel JM, Runswick MJ, Walker JE. "ATP synthase from bovine heart mitochondria: identification by proteolysis of sites in F₀ exposed by removal of F₁ and the oligomycin-sensitivity conferral protein." *Biochem J.* 1994; 303 (Pt 2): 639-45.

Condeelis J. "Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(5): 169-70.

Dąbrowska 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.* 2006; 51(suppl 1):93-5.

Dever TE, Glynias Mj, Merrick Wc. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(7): 1814-8.

Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL, Wang E. "Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha." *Exp Cell Res* 1998; 238(1): 168-76.

Edmonds B T, Wyckoff J, Yeung YG, Wang Y, Stanley ER, Jones J, et al. "Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma." *J Cell Sci.* 1996; 109 (Pt 11): 2705-14.

Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2002;123: 134-140.

Falany JL, Krasnykh V, Mikheeva G, Falany CN. Isolation and expression of an isoform of rat estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 52(1):35-44.

Ferjerskov O, Richards A, DenBesten P. The effect of fluoride on tooth mineralization. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry.* 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

Forrest A, Gabrielli B. Cdc25B activity is regulated by 14-3-3. *Oncogene.* 2001; 20: 4393 -401.

Gangwani L, Mikrut M, Galcheva-Gargova Z, Davis RJ. Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. *J Cell Biol.* 1998; 143(6): 1471-84.

García-Montalvo EA, Reyes-Pérez H, Del Razo LM. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*. 2009; 263(2-3):75-83.

Ge Y, Niu R, Zhang J, Wang J. Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine. *Arch Toxicol*. 2011; 85:27–33.

Griffiths AJF, Susan RW, Richard CL, William MG, David TS. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: GUANABARA-KOOGAN. 2008.

Grucka-Mamczar E, Birkner E, Zalejska-Fiolka J, Machoy Z, Kasperczyk S, Błaszczyk I. Influence of extended exposure to sodium fluoride and caffeine on the activity of carbohydrate metabolism enzymes in rat blood serum and liver. *Fluoride*. 2007; 40(1):62–6.

Han DC, Shen T-L, Miao H, Wang B, Guan J-L. EphB1 Associates with Grb7 and Regulates Cell Migration. *J Biol Chem*. 2002; 277(47 Issue 22):45655–61.

Hanna, S. L., Sherman, N. E., Kinter, M. T., Goldberg, J. B. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology*, 2000, 146, 2495-2508.

He L-F, Chen J-G. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rats oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(7):1144-48.

Hengstschläger M, Rosner M, Fountoulakis M, Lubec G. Tuberous sclerosis genes regulate cellular 14-3-3 protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003; 312:676-83.

Hershey JW. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 1991; 60: 717-55.

Hijikata Y, Fujinami S, Shiozaki Y, Sameshima Y. Changes in plasma amino acids during the oral glucose tolerance test in hepatic diseases. *Hepatogastroenterology*. 1987; 34(1):16-8.

Hofmann B, Hecht H-J, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem*. 2002; 383: 347 -64.

Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006; 49: 450–65.

Ikemoto M, Tsunekawa S, Toda Y, Totani M. Liver-Type Arginase Is a Highly Sensitive Marker for Hepatocellular Damage in Rats. *Clin Chem*. 2001; 47(5):946-8.

Inkielewicz I, Krechniak J. Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride*. 2003; 36(4); 263-6.

Ishizuka T, Fujimori I, Kato M, Noji-Sakikawa C, Saito M, Yoshigae Y, et al. Human carboxymethylenebutenolidase as a bioactivating hydrolase of olmesartan medoxomil in liver and intestine. *J Biol Chem*. 2010; 285(16):11892-902.

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

Johnson AR, Craciunescu CN, Guo Z, Teng Y-W, Thresher RJ, Blusztajn JK, et al. Deletion of murine choline dehydrogenase results in diminished sperm motility. *The FASEB Journal*. 2010; 24:2752-61.

Junqueira, LC; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Ed. 10. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN S. A; 2004.

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

Kardon T, Stroobant V, Viegada-da-Cunha M, Schaftingen EV. Characterization of mammalian sedoheptulokinase and mechanism of formation of erythritol in sedoheptulokinase deficiency. *FEBS Letters*. 2008; 582:3330-4.

Kato H, Shin Db, Hayase F. "3-Deoxyglucosone crosslinks proteins under physiological conditions." *Agr Biol Chem*. 1987; 51: 2009-11.

Kedishvili NY, Popov KM, Rougraff PM, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA. CoA-dependent Methylmalonate-Semialdehyde Dehydrogenase, a Unique Member of the Aldehyde Dehydrogenase Superfamily. *J Biol Chem*. 1992; 267(27): 19724-29.

Keller ET, Fu Z, Brennan M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 1049-53.

Kennedy S. The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers.* 2002; 7(4):269-90.

Khor VK, Dhir R, Yin X, Ahima RS, Song WC. Estrogen sulfotransferase regulates body fat and glucose homeostasis in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(4):E657-64.

Kleerekoper M. Non-Dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994; 8(1):32-8.
Kobayashi CAN, Leite AdL, Silva TLd, Santos LDd, Nogueira FCS, Santos KS, et al. Proteomic analysis of urine in rats chronically exposed to fluoride. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2011;25(1):8-14.

Kobayashi CAN, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FCS, Oliveira RC, et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem. Biol. Interact.* 2009;180:305-11.

Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, Liu Bf, Uriuhara A, Kojima H. "Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy." *Diabetes Care.* 2003; 26(6): 1889-94.

Leite AL, Júnior JFS, Levy FM, Maria AG, Fernandes MS, Salvadori DMF, et al. Absence of DNA damage in multiple organs (blood, liver, kidney, thyroid gland and urinary bladder) after acute fluoride exposure in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2007; 26:435–40.

Leite AL. A análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2010.

Leite AL; Caroselli EE; Maria AG; Fernandes MS; Buzalaf MAR. Kinetics of Fluoride Removal from Plasma and Bone of Rats After Chronic Intake of Fluoride. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008; 30(3):209-14.

Leyva JA, Bianchet MA, Amzel LM. "Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review)." *Mol Membr Biol.* 2003; 20(1): 27-33.

- Li Y, Liang C, Slemenda C, 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; 16(5):932-9.
- Long J, Lang Z-W, Wang H-G, Wang T-L, Wang B-E, Liu S-Q. Glutamine synthetase as an early marker for hepatocellular carcinoma based on proteomic analysis of resected small hepatocellular carcinomas. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010; 9(3):296-305.
- López, JI, Marina A, Vazquez J, Alvarez G. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Marine biology.* 2002;141(2):217-223.
- Mamma P, Sinha M, Sil PC. A 43 kD protein isolated from the Herb *Cajanus indicus* L attenuates sodium fluoride-induced hepatic and renal disorders in vivo. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2007; 40(3):382-95.
- Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica básica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
- McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, et al. Systematic review of water fluoridation. *BMJ.* 2000; 321(7265):855-9.
- MD Mostaqul Huq, Nien-Pei Tsai, Pawan Gupta and Li-Na Wei. Regulation of retinal dehydrogenases and retinoic acid synthesis by cholesterol metabolites. *The EMBO Journal.* 2006; 25:3203–13.
- Mello LC, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. *Rev. Nutr.* 2005; 18(5):593-600.
- Mello LCP, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. *Rev Nutr.* 2005; 18(5):593-600.
- Mendoza-Schulz A, Solano-Agama C, Arreola-Mendoza L, Reyes-Márquez B, Barbier O, Razo LMD, et al. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett.* 2009; 190:179-86.

Meneses-Lorente G, Guest PC, Lawrence J, Muniappa N, Knowles MR, Skynner HA, et al. A proteomic investigation of drug-induced steatosis in rat liver. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(5):605-12.

Merrick BA. Toxicoproteomics in Liver Injury and Inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1076:707–17.

Meunier PJ, Sebert J-L, Reginster J-Y, Briancon D, Appelboom T, Netter P. Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium–vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the favostudy. *Osteoporos Int*. 1998; 8:4–12.

Mhaweche P. 14-3-3 proteins-an update. *Cell Research*. 2005;15(4):228-36.

Michael M, Barot VV, Chinoy NJ. Investigation of soft tissue functions in fluorotic individuals of north Gujarat. *Fluoride*. 1996; 29:63–71.

Mikula M, Dzwonek A, Karczmarski J, Rubel T, Dadlez M, Wyrwicz LS, Bomsztyk K, Ostrowski J. Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics*. 2006; 6(8):2395-406.

Monnier, V M, Cerami A. "Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins." *Science*. 1981; 211(4481): 491-3.

Morris AA, Lascelles CV, Olpin SE, Lake BD, Leonard JV, Quant PA. Hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a synthase deficiency. *Pediatr Res*. 1998; 44(3):392-6.

Moseley R, Sloan AJ, Waddington RJ, Smith AJ, Hall RC, Embery G. The influence of fluoride on the cellular morphology and synthetic activity of the rat dentine-pulp complex in vitro. *Arch Oral Biol*. 2003; 48(1):39-46.

Moseley R, Sloan AJ, Waddington RJ, Smith AJ, Hall RC, Embery G. The influence of fluoride on the cellular morphology and synthetic activity of the rat dentine-pulp complex in vitro. *Arch Oral Biol*. 2003; 48(1):39-46.

Mullenix PJ, Dendesten PK, Shunior A, Kemans WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol teratol*. 1995; 17:169-77.

Newton BW, Russell WK, Russeli DH, Ramaiah SK, Jayaraman A. Liver proteome analysis in a Rodent model of alcoholic steatosis. *J. Proteome Res*. 2009; 8: 1663-71.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The J. Biol. Chem.* 1975; 250(10):4007-4021.

Ogilvie AL. Histologic findings in the kidney, liver, pancreas, adrenal, and thyroid glands of the rat following sodium fluoride administration. *J Dental Research.* 1953; 32(3):386-397.

Okazoe T. Overview on the history of organofluorine chemistry from the viewpoint of material industry. *Proc Jpn Acad.* 2009;85:276-89.

Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2006; 26(2):151-6.

Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009; 13(1): 9-19.

Peixoto EMA. "Elemento químico flúor". *Química Nova.* 1998;8:43.

Pelsers MM, Wim TH, Jan FCG. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta.* 2005; 352(1-2): 15-35.

Peng J, Gygi SP. Proteomics: The move to mixtures. *J Mass Spect.* 2001; 36: 1083–91.

Pennington SR, Dunn MJ. *Proteomics: from protein sequence to function.* New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers; 2001.

Pierce WM, Cai J. Applications of mass spectrometry in proteomics. *Contrib Nephrol.* 2004; 141: 40-58.

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; 38(31): 9926-36.

Rahbar S, Nadler JL. "Novel inhibitors of advanced glycation endproducts." *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 262(3): 651-6.

Ranford JC, Henderson B. Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments. *Mol Pathol.* 2002; 55(4):209-13.

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; 22:111-123.

Reginster JY, Dethor M, Dewe W, Albert A. *Int J Gynecol Obstet.* 1998;63:21-8.

Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon, Chao EYS, Wahner HW, Muhs JM, et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 1990; 322(12):802-9.

Rison SC, Hodgman TC, Thornton JM. "Comparison of functional annotation schemes for genomes." *Funct Integr Genomics.* 2000;1(1): 56-69.

Rodionov RN, Murry DJ, Vaulman SF, Stevens JW, Lentz SR. Human Alanine-Glyoxylate Aminotransferase 2 Lowers Asymmetric Dimethylarginine and Protects from Inhibition of Nitric Oxide Production. *J Biol Chem.* 2010; 285(8): 5385–91.

Savato F, Carvalho MCG. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciênc. rural.* 2010; 40(3):727-34.

Satoh R, Kishino K, Morshed SR, Takayama F, Otsuki S, Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Yasui T, Sakagami H. Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. *Anticancer Res.* 2005; 25(3B):2085-90.

Sechi S. Mass spectrometric approaches to quantitative proteomics. *Contrib Nephrol.* 2004; 141:59-78.

Shanthakumari D, Seshachalam S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology.* 2004; 204(2-3):219-28.

Sharma A, Chinoy NJ. Role of free radicals in fluoride-induced toxicity in liver and kidney of mice and its reversal. *Fluoride*. 1998;31(3):S26.

Shashi A, Thapar a SP. Histopathology of fluoride-induced hepatotoxicity in rabbits. *Fluoride*. 2000; 34(1):34-42.

Stirnemann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. 2010; doi:10.4414/smw.2010.13080.

Strunecka A, Patocka J, Blaylock RL, Chinoy NJ. Fluoride interactions: from molecules to disease. *Current Signal Transduction Therapy*. 2007; 2(3):190-213.

Takahashi MF, Fujii J, Teshima T, Suzuki D, Shiba T, Taiguchi N. In vivo glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme: identification of glycation sites. *Biochemistry*. 1995; 34(4):1433-8.

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; 81(7):2570-8.

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; 81(7):2570-8.

Thongboonkerd V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am J Nephrol*. 2004; 24(3):360-78.

Thrane EV, Refsnes M, Thoresen GH, Lag M, Schwarze. Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK. *Toxicol. Sci*. 2001;61:83-91.

Tilton RG, , Haidacher SJ, Lejeune WS, Zhang X, Zhao Y, Kurosky A, et al. "Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics*. 2007; 7(10): 1729-42.

Titus GP, Mueller HÁ, Burgner J, Rodríguez CS, Peñalva MA, Timm DE. "Crystal structure of human homogentisate dioxygenase". *Nat. Struct. Biol*. 2000; 7 (7):542–6.

Tsunoda M, Aizawa Y, Nakano K, Liu Y, Horiuchi T, Itai K, et al. Changes in fluoride levels in the liver, kidney, and brain and in neurotransmitters of mice after subacute administration of fluoride. *Fluoride*. 2005; 38(4):284–92.

Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*. 2004; 164:341–6.

Verhey KJ, Gaertig J. "The tubulin code." *Cell Cycle*. 2007; 6(17): 2152-60.

Walker JE, Fearnley IM, Gay NJ, Gibson BW, Northrop FD, Powell SJ. "Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria." *J Mol Biol*. 1985; 184(4): 677-701.

Wang G, Gong Y, Anderson J, Sun D, Minuk G, Roberts MS, et al. Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology*. 2005; 42(4): 871-9.

Wang HQ, Du ZX, Liu BQ, Gao YY, Meng X, Guan Y, Zhang HY. TNF-related apoptosis-inducing ligand suppresses PRDX4 expression. *FEBS Lett*. 2009; 583(9):1511-5.

Warburg O, Christian W. Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochem Z*. 1941; 310: 384-421.

Wei C-C, Zhang S-L, Chen Y-W, Guo D-F, Ingelfinger JR, Bomsztyk K, et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Modulates Angiotensinogen Gene Expression in Kidney Cells. *J Biol Chem*. 2006; 281(35):25344–55.

Whitford GM. Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res*. 1992; 71(5):1249-54.
Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci*. 1996; 16(2):1-153.

Wilce MC, Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1205(1):1-18.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996; 13:19-50.

Wong MCM, Clarkson J, Glenny A-M, Lo ECM, Marinho VCC, Tsang BWK, et al. Cochrane Reviews on the Benefits/Risks of Fluoride Toothpastes. *J Dent Res*. 2011. DOI: 10.1177/0022034510393346.

Wooden SK, Li LJ, Navarro D, Qadri I, Pereira L, Lee AS. Transactivation of the grp78 promoter by malfolded proteins, glycosylation block, and calcium ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF- κ B. *Mol Cell Biol*. 1991; 11(11):5612-23.

WOOLLEY P, CLARK, BFC. "Homologies in the structure of G-binding proteins : an analysis based on elongation factor EFTU." *Bio-technology*. 1989; 7: 913-20.

Xiong X, Liu J, He W, Xia T, He P, Chen X, et al. Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ. res*. 2007;103:112-6.

Xu H, Hu L-S, Chang M, Jing L, Zhang X-Y, Li GS. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. *Toxic Letters*. 2005; 160(1):69-75.

Xu H, Jing L, Li G-S. Proteomic Analysis of Osteoblasts Exposed to Fluoride In Vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2008; 123:91–97.

Yamamoto T, Kikkawa R, Yamada H, Horii I. Investigation of proteomic biomarkers in in vivo hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants. *J Toxicol Sci*. 2006; 31(1) 49-60.

Zager RA, Iwata M. Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability. *Am J Pathol*. 1997; 150(2): 735-45.

Zatkova A, Bernabe DBV, Poláková H, Zvarík M, Eva Feráková, Vladimír Bosák, et al. High Frequency of Alkaptonuria in Slovakia: Evidence for the Appearance of Multiple Mutations in HGO Involving Different Mutational Hot Spots. *Am. J. Hum. Genet*. 2000; 67:1333–9.

Zhan XAn, Wang M, Xu ZR, Li WF, Li JX . Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2006; 20:83–87.

Zigmond SH. Signal transduction and actin filament organization. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1996;8:66-73

Anexo

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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 001/2009

Bauru, 30 de janeiro de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição crônica ao flúor"**, de autoria de Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira, 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