UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARINA GUIMARÃES DE SOUZA MELO

**Avaliação da inervação entérica e análise proteômica do intestino delgado
de ratos expostos à dose aguda ou crônica de fluoreto**

BAURU
2015

CARINA GUIMARÃES DE SOUZA MELO

**Avaliação da inervação entérica e análise proteômica do intestino delgado
de ratos expostos à dose aguda ou crônica de fluoreto**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de
Estomatologia e Biologia Oral

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

**BAURU
2015**

M491a Melo, Carina Guimarães de Souza
Avaliação da inervação entérica e análise proteômica do
intestino delgado de ratos expostos à dose aguda ou crônica
de fluoreto/ Carina Guimarães de Souza Melo – Bauru, 2015.
464 p. : il. 37; 31 cm.

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

Orientadora: Prof. Dra. 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/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº 014/2011
Data 28/06/2011

DEDICATÓRIA

A DEUS

Por me dar a vida e por estar presente em minha vida. Por me guardar todos os dias, por ter guiado os meus passos, por toda a provisão e por permitir que eu chegasse até aqui. Ao único que era, é e sempre será. Ao Rei dos reis, o Senhor dos senhores, seja dada toda honra, toda glória e todo louvor, por esta conquista. A Deus, primeiramente, dedico a conclusão do meu Doutorado. Sem Deus, eu nada seria. Sem Deus, eu nada serei.

Aos Meus Pais, Dario e Maria Lúcia

Por uma vida inteira juntos de muito trabalho e muita dedicação à nossa família. A vocês, que sempre lutaram por mim, com muito amor e respeito, e que me deram apoio em todos os momentos. Em especial, nestes últimos anos, ao meu pai, pela sua honra, serenidade e dignidade. Agradeço a Deus pelos teus cuidados com a minha mãe e pelo teu amor incansável. Sem ter você, não chegaria até aqui. Agradeço a Deus por ter você em minha vida. A sua vida é uma das razões pelas quais eu existo. Sem você e seu amor, nada seria possível. Graças a Deus tenho você em minha vida. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida! Amo você.

Ao meu irmão, Ulisses

Por todo amor, atenção, carinho e por tantos momentos felizes juntos. Te agradeço pelo apoio nos momentos difíceis e por estar ao meu lado para que eu conseguisse concluir mais esta etapa da minha vida. Te agradeço também por me ajudar a imprimir esta tese. Sem você não seria possível concluir este trabalho. Graças a Deus tenho você em minha vida. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida! Amo você.

Ao meu irmão, Caio

Por toda atenção, carinho e por tantos momentos felizes juntos. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida! Amo você.

À minha cunhada, Fernanda e meu sobrinho, João Pedro

Pelo seu amor e carinho por terem me proporcionado muitos momentos de alegria. Graças a Deus tenho vocês em minha vida. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Amo vocês.

A todos meus amigos

Pelo apoio, amor, carinho e atenção em tantos momentos. Sem os amigos a vida seria muito mais difícil. Sem seu apoio, eu não teria conseguido. Sem sua companhia não teria graça. Sei que não tenho muitos, mas sei que os amigos que tenho são os que preciso. Graças a Deus tenho vocês em minha vida. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Amo vocês.

Aos meus queridos familiares

Pelo apoio, amor, carinho e atenção em tantos momentos. A família é um presente de Deus. Graças a Deus tenho vocês em minha vida. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Por me receber como sua orientada, mesmo me conhecendo tão pouco. Por me ajudar a vencer o desafio de realizar um trabalho diferenciado, na realidade uma verdadeira odisséia. Te agradeço por compartilhar seus conhecimentos, pelo aprendizado recebido a respeito da prática do ensino, mas, especialmente, pelos anos de atenção, apoio e ajuda. Estar ao seu lado me fez desejar ser ainda melhor, não somente como profissional, mas também como pessoa. Os teus elogios acalmavam o coração, alegravam a minha alma e me enchiam de expectativa. A tua ajuda me fazia seguir sempre em frente. Sem o teu apoio, este trabalho não seria possível. Com você pude aprender não somente sobre a linha de pesquisa, mas sobre valores que transcendem o profissionalismo, e que carregarei sempre comigo. Peço a Deus pela tua vida, para que você e sua família, sempre tenham muita saúde, paz e alegrias. Para agradecer por tudo, me faltam palavras. Peço a Deus que me ajude a ser, pelo menos em parte (pois não tenho a pretensão de copiá-la), um reflexo do que você significa como profissional. Realmente posso dizer que você é sensacional. Ter realizado este projeto debaixo da sua orientação, foi a realização de um sonho. A você, fica o meu reconhecimento, eterna admiração e carinho. Sempre estarei com você em meu pensamento e coração. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Muito Obrigada por tudo! Você é uma inspiração!

À minha co-orientadora, Profª Drª Jacqueline Nelisis Zanoni

Pelo seu carinho, ajuda e atenção. Te agradeço, imensamente, por me receber como sua orientada, quase sem me conhecer e por me apoiar neste projeto. Agradeço a Deus pela tua paciência e por se comprometer a me ajudar nesta empreitada. Poder estar ao teu lado, saber que você fez parte da minha vida, me trazem uma profunda alegria ao coração. Peço a Deus que consiga ser apenas um pouco do que você é como pessoa e profissional. Te agradeço por me proporcionar oportunidades que eu jamais sonharia em alcançar, por me ajudar a realizar tantos sonhos em minha vida. A você, fica o meu reconhecimento, eterna admiração e carinho. Sempre estarei com você em meu pensamento e coração. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Muito Obrigada por tudo! Você é uma inspiração!

À minha amiga, Profª Drª Juliana Vanessa Colombo Martins Perles

Por ser minha grande companheira neste projeto. Te agradeço por me ajudar desde antes desse projeto existir, desde quando era apenas um sonho. Te agradeço, pois desde o início você contribuiu de todas as formas possíveis. Especialmente, te agradeço pelo teu amor, carinho e atenção. Sem teu apoio, teu esforço incansável e teu companheirismo, este projeto não teria sido realizado. Ter você na minha vida, me faz querer ser melhor. Você consegue reunir tantas qualidades, que é difícil enumerá-las. A tua vida reflete tudo que você representa como pessoa e profissional, uma pessoa sensacional! Não existem palavras suficientes pra te agradecer por tudo. Você não somente me ajudou em todo o trabalho, como também me recebeu na sua casa, se preocupando com a minha estadia e alimentação. Carinho assim, só se recebe de pessoas especiais. Não tenho a pretensão de ser como você, mas tenho muita gratidão a Deus por estar ao teu lado. Você me ensinou tantas coisas, desde as mais básicas, até as mais complexas. Tenho certeza que você realmente nasceu pra fazer o que faz, pois tua excelência pode ser vista em tudo. Quero caminhar sempre contigo, enquanto eu existir. Te guardo em meu coração. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Muito Obrigada por tudo! Você é uma inspiração!

À minha amiga, Sara Raquel Garcia de Souza

Agradeço não somente pela ajuda na execução deste projeto, mas por tudo que fez por mim. Agradeço a Deus por ter você em minha vida, a tua amizade me faz querer ser melhor. Quando penso na palavra “organização” me lembro de você. Deus te colocou na minha vida pra me mostrar como trabalhar da melhor maneira possível. A tua decência, honestidade, caráter e sinceridade, fazem de você uma pessoa especial, você é um exemplo de força e determinação. Agradeço a Deus pela tua amizade sincera e companheirismo. Nas horas mais difíceis, vemos quem nos ama de verdade. Acredito que ser amigo é respeitar, amar, ajudar, socorrer e amparar aquele que não tem nenhum laço com você, mas que você escolheu, de coração, para ter em sua vida. Te considero minha amiga, e te ter ao meu lado é motivo de orgulho. Tenho certeza que Deus tem preparado muitas coisas maravilhosas pra você, que ainda estão por vir. Te guardo em meu coração. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Muito Obrigada por tudo! Você é especial!

À minha querida amiga, Raquel Muccio Malmonge

Pela sua amizade, atenção, amor e carinho. Agradeço a Deus pelo teu apoio e companheirismo nos momentos mais difíceis, sem os quais seria impossível concluir esta etapa da minha vida. Te guardo em meu coração. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Muito Obrigada por tudo! Você é especial!

À minha querida amiga, Carolina Ortigosa Cunha

Pela sua amizade, atenção, amor e carinho. Agradeço a Deus pela tua amizade sincera e companheirismo. Nas horas mais difíceis, você esteve ao meu lado. Sem o teu apoio, seria impossível chegar até aqui. Você é especial! Te guardo em meu coração.

À minha querida amiga, Sandra Matsuda

Pela sua amizade, atenção, e carinho. Por me apoiar nos momentos difíceis e por me ajudar a enxergar a realidade e as possibilidades. Por não me deixar me entregar e por me ajudar a seguir em frente nos momentos mais difíceis. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Te guardo em meu coração. Muito Obrigada por tudo! Você é especial!

Ao meu amigo, Rafael de Oliveira Braga

Pela sua amizade, atenção, e carinho. Por me ajudar a superar as dificuldades que apresentei com a minha condição física tão debilitada e por compreender as minhas limitações. Mas te agradeço acima de tudo, não somente por me apoiar e me incentivar a melhorar a minha condição física como também por me ajudar a superar os momentos difíceis. Sem o teu apoio e o teu trabalho eu não teria chegado até aqui. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Te guardo em meu coração. Você é especial!

To my loved friend, Tina Cardamone

For your friendship, love, patience, attention, and for all the good moments together. Thank you very much for your support in all the difficult moments. Your friendship means a lot to me. I will never forget you. I keep you in my heart. God bless you every day of your life!! You are amazing!

To my loved friend, Maria Schoberl

For your friendship, attention, love, and for all the good moments together. Thank you very much for your support in all the difficult moments, and also for all the good laughs in the good moments. Thank you for bringing happiness to my life in 15 days with your company, and for helping me to forget the sad moments. Thank you for the best holidays of my life, for the funny moments and for the long talks. Thank you for changing my life with your friendship! Thanks God I have you as a friend!! I keep you in my heart!! God bless you every day of your life !! You are amazing!!

To my dear friend, Amanda Bryan

For your friendship, love, attention, and all the good moments together. I keep you in my heart. God bless you every day of your life !! You are amazing!!

To my dear friend, Therriz Mae P. Mamerto

For your friendship, attention, and all the good moments. Thanks God I have you as a friend!! I keep you in my heart. You are amazing!!

To all the amazing people that I met in Melbourne (Australia): Aida Garcia, Ana Ludmila Brown, Arunadevi Sathiaselan, Atla Kvaem, B. Florah Mwilambwe, Cecilia Liando, Cheryl Raniah, Chesley Ryder, Enakshi Ambani, Fan Liu, Florian Weittenhiller, Laura Leone, Lincon Stamp, Linda Fothergill, Louise Pontell, Manami Yumoto, Maria Carolina Andrada, Pallovi Sinha, Rafaela Perez, Renee Pasqualino, Ruslan Pustovit, Tatiana Bispo, Wakiuru Wohoro

For your pleasant company in Melbourne. I keep you in my heart. God bless you all!! You are awesome!!

Às minhas queridas amigas Élcia Silveira, Andréia Vieira e Cláudia Bigueti

Pela sua amizade, amor, apoio e tantos bons momentos juntas. Estou sempre com vocês no pensamento e as trago em meu coração. Obrigada pela ajuda e pela atenção nos momentos difíceis. Sem vocês seria impossível chegar até aqui. Que Deus as abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

***Às minhas queridas amigas brasileiras que conheci na cidade de Melbourne (Austrália):
Clarice Ramos da Cunha, Fabiana Barros e Carolina de Oliveira***

Pela sua amizade, amor, apoio, atenção e tantos momentos juntas. Estou sempre com vocês no pensamento e as trago em meu coração. Que Deus as abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

***Às minhas amigas da disciplina de bioquímica Thelma Lopes da Silva, Fernanda Zucki,
Maria Cecília de Freitas Ferreira, Josilene Duarte e Lúgia Subitoni Antonio***

Pela amizade, carinho, atenção e apoio em tantos momentos. Que Deus as abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

Ao meu querido Amigo Alessandro Domingues Heubel

*Pela amizade, carinho, atenção e apoio em tantos momentos. Sem você seria impossível a conclusão deste trabalho. Você foi essencial. Agradeço a Deus pela tua amizade em minha vida. Trago você e tua Mãe, a minha querida **Maricê Domingues Heubel**, em meu coração, a tua ajuda e companhia foram fundamentais. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!*

Aos queridos alunos que contribuíram com o meu projeto, Juliana Gadelha, Isabela Zignani, Paulo Watanabe, Tamara Teodoro

Pela amizade, ajuda e apoio. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

Aos meus queridos colegas da disciplina de Bioquímica da FOB/USP Camila, Heloísa, Mileni, Lúvia, Cristiane, Isabela, Cíntia, Zohaib, Priscila Salomão, Priscila Muno

Pela amizade, atenção e apoio em todos os momentos. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas.

Às queridas funcionárias do CIP/FOB/USP Marcia Graeff e Rafaela Alavarce

Pela amizade, respeito e atenção em tantos momentos. Sem a sua ajuda e apoio não teria sido possível a conclusão deste trabalho. Que Deus as abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!!

À minha querida amiga Maira Cristina Couto, técnica do laboratório de Histologia da Universidade do Sagrado Coração

Pela atenção, apoio, amizade e ajuda na preparação da parte histológica. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Te guardo em meu coração. Você é especial!

À Profª. Drª. Mariza Akemi Matsumoto

Pela generosidade, amizade, e apoio em tantos momentos. Que Deus te abençoe em todos os dias da tua vida. Te guardo em meu coração. Você é especial!

Aos meus amigos da turma XLIII

Pelos bons momentos e pelos anos que passamos juntos. Tenho vocês em meu coração. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

Aos meus irmãos em Cristo da Igreja Cristã Renovada

Pela generosidade, amizade, e apoio em tantos momentos. Pelas orações por mim em tantos momentos. Que Deus os abençoe em todos os dias das suas vidas. Vocês são especiais!

To Professor John B. Furness

For your attention and help in Australia. Specially for the opportunity to hold a scientific project in the University of Melbourne, an experience that changed my life forever.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço à **FAPESP**, por ter me concedido a Bolsa de Estudos que viabilizou a minha dedicação total ao Doutorado, assim como também possibilitou a realização do projeto de pesquisa no exterior correlacionado com meu projeto de doutorado, na cidade de Melbourne-Austrália, com bolsa **BEPE-FAPESP**. Tenho absoluta certeza de que esta oportunidade que me foi concedida fará toda a diferença na minha vida profissional.*

*À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, pela oportunidade de iniciar meus estudos no ano de 2004, no curso de graduação em Odontologia; pela conclusão do meu Mestrado em 2011; e hoje, novamente agradeço pela oportunidade de concluir o meu Doutorado no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área da Biologia Oral. Agradeço também pelo apoio dos funcionários e por toda a estrutura oferecida durante o período em que estive nesta Instituição.*

*A todos os **Professores do Departamento de Ciências Biológicas** pelo aprendizado e convivência durante o curso.*

*Aos Professores da Disciplina de Anatomia, **Antonio de Castro Rodrigues, Jesus Carlos Andreo e André Luis Shinohara**, pelo apoio, ajuda e por me permitir utilizar as dependências e os equipamentos da Disciplina de Anatomia.*

*Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica, **Aline de Lima Leite, Ovídio dos Santos Sobrinho e Larissa Tercilia Grizzo**, pela ajuda e disponibilidade.*

*Às secretárias **Vera Lúcia Rufino e Dalva Ribeiro de Oliveira**, do Departamento de Ciências Biológicas, pela atenção, ajuda e disponibilidade.*

*Aos funcionários da **FOB/USP/BAURU**, **Maristela Petenuci Ferrari, Ana Paula Libel e Rita de Cássia Paglione**, pelo apoio, atenção, amizade, ajuda e disponibilidade.*

*Aos funcionários da **Secretaria de Pós-graduação**, do **Biotério Central** e da **Biblioteca** pela atenção e disponibilidade.*

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”

1 Coríntios 13.2

RESUMO

O trato gastrointestinal (TGI) é a principal rota de exposição ao fluoreto (F) e o seu mais importante sítio de absorção. Acredita-se que a toxicidade do F comprometa a fisiologia do intestino, devido à relevante sintomatologia gastrointestinal relatada em consequência da exposição excessiva ao F. A função intestinal é controlada por uma complexa rede neuronal interligada e incorporada à parede deste órgão, denominada Sistema Nervoso Entérico (SNE). Embora os efeitos tóxicos do F sobre o Sistema Nervoso Central sejam descritos na literatura, não há estudos relacionados à sua toxicidade sobre o SNE. Neste estudo realizado em ratos, foi avaliado o efeito da exposição aguda ou crônica ao F, sobre a população geral de neurônios entéricos e sobre as subpopulações que expressam os principais neurotransmissores entéricos: Acetilcolina (ACh), Óxido Nítrico (NO), Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP), Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e Substância P (SP). Os animais foram divididos em 5 grupos: 3 destinados à exposição crônica (0 ppm, 10 ppm ou 50 ppm de F na água de beber) e 2 à exposição aguda (0 ou 25 mgF/Kg por gavagem gástrica). Foram coletados os 3 segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e processados para a detecção da HuC/D, ChAT, nNOS, VIP, CGRP e SP, através de técnicas de imunofluorescência, no plexo mioentérico. Foram obtidas imagens para a realização da análise quantitativa dos neurônios da população geral (HuC/D) e nitrérgicos (imunorreativos à nNOS); e morfométrica dos neurônios imunorreativos à HuC/D ou nNOS; e das varicosidades imunorreativas à ChAT, VIP, CGRP ou SP. Amostras dos 3 segmentos intestinais foram preparadas e coradas em Hematoxilina e Eosina para análise histológica da morfologia básica. O segmento intestinal considerado mais afetado na análise morfométrica da população geral de neurônios, o duodeno, foi selecionado para a realização da análise proteômica, com o objetivo de oferecer o seu perfil proteico e determinar diferenças na expressão proteica em decorrência da exposição crônica ou aguda ao F. A análise da concentração de F no plasma sanguíneo foi realizada para a confirmação da exposição. Na análise quantitativa, o grupo de 50 ppm F, apresentou uma diminuição significativa na densidade da população geral de neurônios do jejuno e do íleo e na densidade dos neurônios imunorreativos à nNOS no duodeno e no jejuno. Quanto à análise morfométrica, a população geral e as subpopulações neuronais entéricas avaliadas apresentaram alterações morfológicas significativas, tanto após a exposição crônica quanto a aguda. Para a análise proteômica do duodeno, verificou-se que a associação de seus genes a um termo, e assim classificadas de acordo com diferentes

processos biológicos. No caso do grupo da dose aguda, o processo biológico com a maior porcentagem de genes associados foi a geração de metabólitos precursores e energia (27% das proteínas); enquanto para os grupos de 10 e 50 ppm F foram o processo metabólico da piridina (41%) e a polimerização proteica (33%), respectivamente.

Palavras-chave: Fluoreto. Sistema nervoso entérico. Morfologia intestinal. Análise proteômica. Exposição crônica. Exposição aguda.

ABSTRACT

Evaluation of enteric innervation and proteomic analysis of the small intestine of rats exposed to acute or chronic fluoride dose

The gastrointestinal tract (GIT) is the main route of fluoride (F) exposure, and the most important site of its absorption. It is believed that F toxicity compromises the intestine physiology, due to the relevant gastrointestinal symptomatology reported in consequence to excessive exposure. The intestinal function is controlled by a complex neuronal net, which is interconnected and embedded in the wall of this organ, named Enteric Nervous System (ENS). Although the toxic effects of F on the Central Nervous system are described in the literature, there are no studies related to its toxicity on the ENS. Therefore, in this study performed in rats, the effects of chronic and acute F exposure were evaluated, on the general population of enteric neurons and on the subpopulations that express the main enteric neurotransmitters: Acetylcholine (Ach), Nitric Oxide (NO), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Calcitonin gene related peptide (CGRP), and Substance P (SP). The animals were divided into 5 groups: 3 designed to the chronic exposure (0 ppm, 10 ppm ou 50 ppm de F in the drinking water) and 2 to the acute exposure (0 ou 25 mgF/Kg - gastric gavage). Three intestinal segments were collected (duodenum, jejunum, and ileum) and processed for the immunofluorescence techniques to detect HuC/D, ChAT, nNOS, VIP, CGRP and SP, on the myenteric plexus. Images were obtained for the quantitative analysis of the general population of neurons (HuC/D immunoreactive) and the nitrergic neurons (nNOS immunoreactive), for the morphometric analysis of the general population and nitrergic neurons and also for the immunoreactive varicosities to ChAT, VIP, CGRP or SP. Samples of the 3 intestinal segments were prepared and stained with hematoxylin and eosin for histological analysis of the basic morphology. Duodenum, the intestinal segment considered the most affected in the morphological analysis of the general population of neurons, was selected for the proteomic analysis, with the objective to offer the entire protein profile and to determine differences in the protein expression due to chronic or acute F exposure. Plasma F concentration was analyzed to confirm the exposure. In the quantitative analysis, the 50 ppm F group presented a significant decrease in the density of the general population of neurons in the jejunum and ileum, and in the density of the nitrergic neurons in the duodenum and jejunum. Regarding

the morphometric analysis, the general population of neurons and all the neuronal subpopulations evaluated presented significant morphological alterations, for both exposures, chronic and acute. In the proteomic analysis of the duodenum, it was verified that both exposures caused alterations in the expression of intestinal proteins. These proteins identified with differential expression were distributed according the association of their genes to a specific term, and by this term classified in different biological process. In the group that received the acute dose the biological process with the highest percentage of associated genes was the generation of precursor metabolites and energy (27% of proteins), and for the 10 and 50 ppm F groups, they were pyridine nucleotide metabolic process (41%) and protein polymerization (33%), respectively.

Key words: Fluoride. Enteric Nervous System. Intestinal Morphology. Proteomic Analysis. Chronic Exposure. Acute Exposure.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1. Esquema do intestino fechado e aberto para divisão da amostra por regiões para a captura das imagens das técnicas de imunofluorescência.	140
FIGURA 2. Distribuição das proteínas identificadas pela análise proteômica, com a expressão subregulada no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle, classificadas pelo <i>software</i> CYTOSCAPE® de acordo com o processo biológico de que participam.	171
FIGURA 3. Distribuição das proteínas identificadas pela análise proteômica, com a expressão subregulada no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle, classificadas pelo <i>software</i> CYTOSCAPE® de acordo com o processo biológico de que participam.	173
FIGURA 4. <i>Subnetworks</i> criadas pelos <i>JActiveModules</i> do <i>software</i> CYTOSCAPE®, para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle.	176
FIGURA 5. <i>Subnetwork</i> criada pelos <i>JActiveModules</i> do <i>software</i> CYTOSCAPE®, para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle.	177
FIGURA 6. Distribuição das proteínas identificadas pela análise proteômica, com a expressão subregulada no grupo de 25 mgF/kg em relação ao grupo controle, classificadas pelo <i>software</i> CYTOSCAPE® de acordo com o processo biológico de que participam.	181
FIGURA 7. <i>Subnetwork</i> criada pelos <i>JActiveModules</i> do <i>software</i> CYTOSCAPE®, para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle.	183

LISTA DE TABELAS

	Pag.
TABELA 1. Concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) em ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias, para a realização das 3 etapas do projeto. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 e 50 ppm de F.	155
TABELA 2. Concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) em ratos, após administração de dose única de F por gavagem gástrica, para a realização das 3 etapas do projeto. Grupos animais: Controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	156
TABELA 3. Densidade de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e nNOS (neurônios/ cm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.	158
TABELA 4. Densidade de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e à nNOS (neurônios/ cm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupos animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	159
TABELA 5. Médias e erro padrão dos valores médios das áreas dos corpos celulares de neurônios mioentéricos imunorreativos à HuC/D e nNOS (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 e 50 ppm de F.	162

TABELA 6. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas ao VIP e ao CGRP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 e 50 ppm de F.	163
TABELA 7. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas à ChAT e à SP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.	164
TABELA 8. Médias e erro padrão dos valores das áreas dos corpos celulares de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e à nNOS (neurônios/ cm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupos animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	167
TABELA 9. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas ao VIP e ao CGRP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	168
TABELA 10. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas à ChAT e à SP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	169
TABELA 11. Espessura total da parede espessura da túnica muscular (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.	186
TABELA 12. Espessura total da parede espessura da túnica muscular (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).	187

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

F	Fluoreto
NaF	Fluoreto de sódio
TGI	Trato Gastrointestinal
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
IR	Imunorreativo à
AChT	Acetilcolina
ChAT	Colina Acetiltransferase
NANC	Não-adrenérgicos/Não-colinérgicos
NO	Óxido Nítrico
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
SP	Substância P
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da calcitonina
DTT	Ditiotreitol
TFA	Ácido Trifluoracético

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DE LITERATURA	41
2.1. Flúor	41
2.2. Absorção do F pelo TGI	46
2.3. Morfologia Intestinal e os efeitos do F	67
2.4. Neurotoxicidade do F	70
2.5. Sistema Nervoso Entérico (SNE)	74
2.6. Hu (<i>Human neuronal protein</i>)	81
2.7. Acetilcolina (ACh)	84
2.8. Óxido Nítrico (NO)	90
2.9. Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP)	96
2.10. Substância P (SP)	102
2.11. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)	110
2.12. Análise Proteômica	116
3. PROPOSIÇÃO	127
3.1. Justificativa	127
3.2. Objetivo Geral	127
3.3. Objetivos Específicos	127
4. MATERIAL E MÉTODOS	131
4.1. Obtenção e período de exposição dos animais	131
4.2. Análise da Inervação Entérica	136
4.2.A. Técnica de imunofluorescência para a marcação dos neurônios imuno-reativos à HuC/D	137
4.2.B. Técnica de imunofluorescência para marcação dos neurônios imuno-reativos à nNOS	137
4.2.C. Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imuno-reativas à Colina Acetiltransferase (ChAT)	138
4.2.D. Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imuno-reativas ao CGRP e ao VIP	138

4.2.E.	Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imunorreativas à SP	139
4.2.F.	Captura das imagens	139
4.2.G.	Análise das amostras obtidas com as técnicas de imunofluorescência	140
4.2.G.1.	Quantificação dos neurônios imunoreativos à HuC/D e nNOS em preparados totais da túnica muscular	140
4.2.G.2.	Análise morfométrica dos neurônios imunoreativos à HuC/D e nNOS dos preparados totais da túnica muscular	140
4.2.G.3.	Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos imunoreativos à SP/VIP/CGRP/ChAT	141
4.3.	Análise estatística dos dados morfométricos e quantitativos da inervação entérica	141
4.4.	Análise estatística dos dados da morfologia básica do intestino	141
4.5.	Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados às técnicas da 1ª Etapa (imunofluorescência para a marcação de HuC/D, nNOS, VIP, CGRP e ChAT em neurônios mioentéricos)	142
4.6.	Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 2ª Etapa (imunofluorescência para a marcação da SP em neurônios mioentéricos)	142
4.7.	Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 3ª Etapa (Análise proteômica do intestino)	142
4.8.	Análise Proteômica	143
4.9.	Análise da morfologia básica do intestino delgado	148
5.	RESULTADOS	153
5.1.	Concentração plasmática de F dos animais destinados às técnicas de imunofluorescência da 1ª Etapa (HuC/D, nNOS, VIP, CGRP e ChAT em neurônios mioentéricos)	153
5.2.	Concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica de imunofluorescência da 2ª Etapa (SP em neurônios mioentéricos)	153
5.3.	Concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 3ª Etapa (Análise proteômica do intestino)	153
5.4.	Análise quantitativa da inervação entérica	157
5.4.1.	Exposição crônica	157
5.4.1.1.	Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à HuC/D	157
5.4.1.2	Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à proteína nNOS	157

5.4.2.	Exposição aguda	157
5.4.2.1.	Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à HuC/D	157
5.4.2.2.	Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à proteína nNOS	157
5.5.	Análise morfológica da inervação entérica	160
5.5.1.	Exposição crônica	160
5.5.1.1.	Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à HuC/D	160
5.5.1.2.	Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à nNOS	160
5.5.1.3.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao CGRP	160
5.5.1.4.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao VIP	160
5.5.1.5.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à ChAT	161
5.5.1.6.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à SP	161
5.5.2.	Exposição aguda	165
5.5.2.1.	Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à HuC/D	165
5.5.2.2.	Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à nNOS	165
5.5.2.3.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao CGRP	165
5.5.2.4.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao VIP	165
5.5.2.5.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à ChAT	166
5.5.2.6.	Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à SP	166
5.6.	Análise proteômica	170
5.6.1.	Exposição crônica	170
5.6.2.	Exposição aguda	180
5.7.	Análise da morfologia básica do intestino delgado	185
5.7.1.	Exposição crônica	185
5.7.2.	Exposição aguda	185

6.	DISCUSSÃO	191
7.	CONCLUSÕES	275
8.	REFERÊNCIAS	281
9.	ANEXOS	
ANEXO 1.	Parecer aprovado da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em animais FOB/USP/BAURU	349
ANEXO 2.	Características dos anticorpos primários: antígenos, hospedeiros, diluições e especificações (códigos de compra e empresas)	351
ANEXO 3.	Características dos anticorpos secundários para as técnicas de imunofluorescência realizadas: comprimento de onda, antígenos, hospedeiros, diluições e especificações (códigos de compra e empresas)	353
ANEXO 4.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição crônica ao F	355
ANEXO 5.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição crônica ao F	357
ANEXO 6.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do íleo de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição crônica ao F	359
ANEXO 7.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição aguda ao F	361
ANEXO 8.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição aguda ao F	363
ANEXO 9.	Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do íleo de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS); após exposição aguda ao F	365

ANEXO 10.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F	367
ANEXO 11.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F	369
ANEXO 12.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F	371
ANEXO 13.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F	373
ANEXO 14.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F	375
ANEXO 15.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F	377
ANEXO 16.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F	379
ANEXO 17.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F	381
ANEXO 18.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do íleo de ratos expostos cronicamente ao F	383
ANEXO 19.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F	385
ANEXO 20.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F	387
ANEXO 21.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F	389
ANEXO 22.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F	391
ANEXO 23.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F	393
ANEXO 24.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F	395
ANEXO 25.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F	397

ANEXO 26.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F	399
ANEXO 27.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F	401
ANEXO 28.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F	403
ANEXO 29.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F	405
ANEXO 30.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do íleo de ratos expostos à dose aguda de F	407
ANEXO 31.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F	409
ANEXO 32.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F	411
ANEXO 33.	Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F	413
ANEXO 34.	Proteínas identificadas no duodeno de ratos com expressão diferencial (suprarreguladas ou subrreguladas) no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo Controle (0 ppm F)	415
ANEXO 35.	Proteínas identificadas no duodeno de ratos com expressão diferencial (suprarreguladas ou subrreguladas) no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo Controle (0 ppm F)	422
ANEXO 36.	Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo controle da exposição crônica (ingestão de água deionizada por 30 dias)	430
ANEXO 37.	Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo de 10 ppm F. Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias	438
ANEXO 38.	Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo de 50 ppm F. Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias.	444

ANEXO 39.	Proteínas identificadas com expressão diferencial (suprarreguladas ou subrreguladas) no duodeno de ratos da exposição aguda ao F, do grupo que recebeu a gavagem gástrica na dose de 25 mg F/Kg peso corporal	450
ANEXO 40.	Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo controle da exposição aguda (gavagem gástrica com água deionizada)	454
ANEXO 41.	Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo da exposição aguda (gavagem gástrica de 25 mg F/Kg peso corporal	460

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O flúor é o 13º elemento químico mais abundante na crosta terrestre (Shanthakumari, Srinivasalu e Subramanian, 2004). No ambiente, o flúor apresenta-se como um elemento ubíquo, presente no ar, na água e nos alimentos, encontrando-se na natureza sempre ligado às outras estruturas e raramente na sua forma livre (Inkielewicz-Stepniak e Czarnowski, 2010).

Considerado um dos elementos essenciais para a manutenção dos processos celulares do organismo humano (Yan *et al.*, 2011), sob a forma do seu íon fluoreto (F), está presente nos fluidos biológicos e tecidos, como um elemento traço, em duas diferentes formas: inorgânica e orgânica; sendo a inorgânica a dominante, com 99% desta forma acumulados nos tecidos duros (Suarez, Quintana e Hernandez, 2008).

A importância do F para a saúde humana relaciona-se especialmente à mineralização dentária e à densidade óssea (Suarez, Quintana e Hernandez, 2008). A presença constante de baixas concentrações de F tem uma notável influência profilática sobre o desenvolvimento da cárie dental (Buzalaf *et al.*, 2011), assim como o F também apresenta uma grande afinidade pelo tecido mineral do osso (Chouhan e Flora, 2008); sendo em ambos tecidos incorporado à estrutura do cristal de apatita pela substituição da hidroxila, conferindo um efeito protetor contra a dissolução da estrutura mineral, apresentando importantes implicações em animais e nos seres humanos no tratamento de doenças que envolvam a desmineralização (Bouaziz *et al.*, 2007). Portanto, o F apresenta um papel importante no sentido de promover o crescimento, desenvolvimento e a manutenção do sistema esquelético (Yan *et al.*, 2011); assim como a sua presença nos fluidos bucais está associada à inibição da desmineralização e a aceleração da remineralização da estrutura dentária durante o processo carioso (Assis *et al.*, 1999).

A sua ingestão prolongada e excessiva pode, entretanto, causar danos a múltiplos órgãos e tecidos, especialmente o ósseo e o dentário (Krishnamachari, 1986), progredindo para o desenvolvimento da fluorose (Vilhena *et al.*, 2010; Buzalaf *et al.*, 2012; Buzalaf, Cardoso e Magalhães, 2013; De Almeida Baldini Cardoso *et al.*, 2014). Esta patologia é caracterizada principalmente pela descoloração dentária e por deformidades esqueléticas (Yan *et al.*, 2011), sendo considerada um problema endêmico de saúde pública em 22 países do mundo (Shanthakumari, Srinivasalu e Subramanian, 2004).

A fluorose pode se apresentar sob três formas: a fluorose esquelética; a fluorose dentária; e a fluorose não-esquelética, que afeta tecidos moles como os músculos, fígado, rins, pulmões, sangue, células, mucosa gastrointestinal e o sistema nervoso, por exemplo (Chouhan e Flora, 2008). Nestas estruturas, a fluorose pode causar danos ao DNA, comprometendo o ciclo celular (Zhong *et al.*, 2005) e influenciando mecanismos regulatórios importantes para a homeostasia de todo o corpo (Gamet-Payraastre *et al.*, 2000).

Portanto, o F é tóxico quando consumido em excesso, mas muito benéfico quando consumido dentro dos limites toleráveis (Chouhan e Flora, 2008). A Organização Mundial de Saúde estabeleceu dentro de um limite seguro, a ingestão de uma concentração de até 1,5 mg F/L (1,5 ppm F), sendo que a ingestão média diária de F não pode exceder 2 mg/dia. Entretanto, em algumas regiões do mundo, na qual já existe um alta concentração de F, pela presença naturalmente desse elemento nos lençóis freáticos, de onde é retirada a água de abastecimento, estima-se que a ingestão deste íon possa chegar a até 27 mg/dia (Dey *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, altos níveis de F na água de abastecimento afetam o sistema nervoso diretamente, sem que primeiramente causem deformações físicas como aquelas observadas na fluorose esquelética (Gao, Liu e Guana, 2009).

No Sistema Nervoso Central (SNC), a própria neurotransmissão é prejudicada pela toxicidade do F e outros sintomas como perda da memória; manifestações do comportamento; dormência nas mãos e pernas; dores lombares; dificuldade ao caminhar e redução do metabolismo; também são observados em pacientes com fluorose (Bhatnagar *et al.*, 2006).

De uma maneira geral, sabe-se que os efeitos tóxicos do F devem-se principalmente à inibição enzimática, destruição do colágeno, paralisação de atividades do sistema imune e danos ao trato gastrointestinal (TGI) (Chouhan e Flora, 2008).

É bastante divulgado que o F é capaz de entrar no corpo humano através do TGI, respiratório e da pele, sendo o TGI considerado a principal rota de exposição ao F do ambiente (Zheng *et al.*, 2002). O F atravessa total e passivamente a mucosa intestinal, interferindo com a maioria das vias metabólicas nos organismos vivos (Shanthakumari, Srinivasalu e Subramanian, 2004).

O TGI pode ser exposto às altas concentrações de F diariamente, devido ao consumo de água e de alimentos, pelo qual é rapidamente absorvido (Amira, Soufane e

Gharzouli, 2005), e a sua toxicidade pode gerar consideráveis alterações na morfologia intestinal, afetando as suas funções (Chauhan, Ojha e Mahmood, 2011).

A absorção do F no TGI inicia-se a partir do estômago, sendo a taxa de absorção gástrica diretamente relacionada à acidez (Reynolds, Whitford e Pashley, 1978). Portanto, para qualquer dose, o pico plasmático é alto e ocorre o mais rapidamente quanto mais ácido é o conteúdo gástrico (Whitford e Pashley, 1984). Embora o F seja um das poucas substâncias absorvidas a partir do estômago, e este órgão seja um inquestionável sítio da sua absorção (Whitford e Pashley, 1984), a absorção gástrica do F ainda é muito menor que a intestinal, sendo o estômago responsável por uma taxa em torno de 25%, enquanto os outros 75% da absorção ocorrem no intestino delgado (Nopakun, Messer e Voller, 1989).

A absorção de altas doses de F desencadeia um importante quadro clínico associado ao TGI, sendo frequentemente registrados, nos casos de intoxicação aguda ao F, sintomas como náusea, vômito, diarreia e dores abdominais (Vogt *et al.*, 1982; Augenstein *et al.*, 1991; Gessner *et al.*, 1994; Akiniwa, 1997). Da mesma maneira, em uma área endêmica para a fluorose, onde os habitantes consomem água com alto teor de F, são frequentes as queixas relacionadas aos mesmos sintomas gastrointestinais descritos acima e também a outros como flatulência, constipação e diarreia intermitente, os quais são considerados os primeiros sinais da toxicidade do F e da fluorose (Susheela *et al.*, 1993; Shashi, 2002).

Como o F em excesso é bastante conhecido como uma substância prejudicial, sendo facilmente absorvido pela mucosa do TGI, e existe uma importante sintomatologia descrita em decorrência da sua absorção neste sítio, alguns pesquisadores sugerem que o F é capaz de alterar o funcionamento do TGI, fato que pode conduzir a um agravamento dos seus efeitos tóxicos (Amira, Soufane e Gharzouli, 2005).

O controle das funções do TGI depende de uma intensa coordenação de redes neuronais (Furness, Johnson, *et al.*, 1995; Cooke, 2000), realizada pelas três divisões do SNA (simpática, parassimpática e entérica). A simpática e a parassimpática compõem a inervação extrínseca do TGI, enquanto o Sistema Nervoso Entérico (SNE) compreende a inervação intrínseca (Furness e Costa, 1987; Tack, 1997).

O SNE constitui a maior parte do sistema nervoso autônomo e fornece à sua estrutura interna, tanto organização quanto suporte químico (Furness e Costa, 1987), sendo considerado a estrutura nervosa mais complexa fora do SNC, e também a única parte do

Sistema Nervoso Periférico (SNP) capaz de mediar atividade reflexa (Gershon, Kirchgessner e Wade, 1994; Kunze e Furness, 1999).

De forma geral, o SNE é organizado em duas grandes redes ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso; e também em vários plexos aganglionares (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009); existindo uma grande interconexão entre os plexos (Furness, Jones, *et al.*, 2004).

Dentre as diversas funções controladas pelo SNE estão a motilidade; fornecimento de enzimas digestivas; absorção; manutenção em níveis adequados do fluxo sanguíneo; secreção exócrina e endócrina (Tack, 1997). Esta grande rede neuronal também participa do sistema de defesa do TGI, especificamente das respostas imune e inflamatória locais (Paran, Rolle e Puri, 2006), diante de estímulos mecânicos e biológicos, como atrofia e infecções; ou se adaptando à alterações desfavoráveis (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009).

Todas as complexas atividades regulatórias do SNE são possíveis somente pela presença de diferentes tipos neuronais, incluindo neurônios sensoriais, motores, secreto-motores e interneurônios, acompanhados por células da glia (Di Giancamillo *et al.*, 2010). E para a compreensão da forma de atuação do SNE, é necessário identificar as diferentes classes funcionais de neurônios entéricos, sendo que uma maneira de caracterizá-los é determinar as combinações de algumas substâncias neuroquímicas, como seus neurotransmissores, neuropeptídeos e enzimas (Uyttebroek *et al.*, 2010).

O SNE apresenta a característica da co-neurotransmissão, na qual um mesmo neurônio pode apresentar diferentes tipos de neurotransmissores ou neuropeptídios, e portanto desempenhar diferentes funções no controle das atividades do TGI (Lundy e Linden, 2004). Esta co-neurotransmissão torna os neurônios entéricos distintos dos outros tipos neuronais (Li *et al.*, 2014), sendo considerada uma característica necessária para a preservação da homeostase do TGI, e consequentemente para a manutenção de todo o organismo (Holzer, 1998). Esta combinação de neuropeptídios e neurotransmissores é denominada “código químico”, e também permite identificar diferentes subpopulações de neurônios entéricos (Llewellyn-Smith, 1987).

Dentre os inúmeros neurotransmissores presentes no SNE, alguns dos mais relevantes são: Acetilcolina (ACh), Óxido Nítrico (NO), Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP), Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e Substância P (SP).

Inicialmente demonstrada no intestino de mamíferos (Dikshit, 1938), a ACh é considerada o maior neurotransmissor do SNE (Porter *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 2000; Chiocchetti *et al.*, 2003), no qual é identificada preferencialmente em neurônios entéricos a partir da imunorreatividade à colina acetiltransferase (ChAT) (Furness, Costa e Eckenstein, 1983; Porter *et al.*, 1996; Sang e Young, 1998), sendo esta a enzima catalítica da reação entre a colina e a acetil-CoA (Novotny *et al.*, 2011).

A ACh participa integralmente na regulação da motilidade do TGI (Sang e Young, 1998; Sharrad, Chen e Brookes, 2013) e nas funções da mucosa intestinal, sendo encontrada na maioria dos neurônios entéricos, tanto no intestino delgado quanto no grosso (Sang e Young, 1998; Furness, J.B., 2006).

As varicosidades das fibras nervosas imunorreativas à ChAT são numerosas nas camadas circular e longitudinal da musculatura lisa, tanto no intestino delgado quanto no grosso, sendo que os neurônios imunorreativos à ChAT no plexo mioentérico formam a maior proporção de todos os neurônios mioentéricos e apresentam uma grande variedade na sua morfologia e tamanho (Porter *et al.*, 1996).

A ACh é considerada um importante regulador do fluxo eletrogênico que controla o equilíbrio hídrico no intestino (Hirota e McKay, 2006) e anormalidades na transmissão colinérgica têm sido relacionadas com a patofisiologia do quadro de constipação (Burleigh, 1988), também descrito como um dos sintomas da toxicidade do F (Susheela *et al.*, 1992; Shashi, 2002). Dessa forma, avaliar o comportamento dos neurônios entéricos que apresentam a ACh (colinérgicos), frente à exposição à dose aguda ou crônica de F, também se torna relevante.

Outro importante neurotransmissor do TGI, o NO, também apresenta-se envolvido na modulação do tônus da musculatura lisa; peristaltismo intestinal; secreção ácida e mucosa; e na manutenção do fluxo sanguíneo local (Martín, Jiménez e Motilva, 2001). A importância da sua distribuição em todo o TGI enfatiza o papel potencial do NO nas mudanças fisiológicas no trânsito intestinal, como nas inflamações (Grongnet e David, 2003), sendo as altas concentrações de NO relacionadas à numerosas patologias do TGI, incluindo a úlcera peptídica, gastrite crônica, câncer gastrointestinal, gastroenterites bacterianas, doença celíaca e doenças crônicas inflamatórias do intestino (Martín, Jiménez e Motilva, 2001).

Juntamente ao NO, o VIP também se destaca pelo seu papel na regulação da motilidade intestinal, sendo que no plexo mioentérico apresenta-se como um

neurotransmissor inibitório (Furness e Costa, 1987), promovendo o relaxamento da musculatura lisa, se distribuindo em muitas partes do TGI (Dockray, 1994). Um aumento na síntese de VIP pelos neurônios mioentéricos pode ser associado à uma diminuição do tônus da musculatura lisa intestinal, o que poderia desencadear um quadro de diarreia (Defani *et al.*, 2003). Dessa forma, a sintomatologia intestinal importante observada tanto em consequência da toxicidade aguda quanto crônica do F, especialmente o quadro de diarreia (Susheela *et al.*, 1993), oferece um indicativo da possibilidade do F alterar mecanismos envolvendo o VIP.

Muitos autores têm relacionado à exposição ao F ao processo de inflamação, sendo relatados efeitos inflamatórios em decorrência da exposição à altas doses de F em vários tecidos, como no parênquima pulmonar de ratos expostos a 50 e 100 mg F/L de NaF (Aydin *et al.*, 2003) e células epiteliais pulmonares após 20 horas da exposição a 3,75 e 5 mM NaF (Schwarze *et al.*, 2000). Da mesma maneira, o F induz a um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias em neurônios no hipocampo (Zhang *et al.*, 2008) e na expressão da COX-2 em células pulmonares humanas (Ridley e Matsuoka, 2009).

Respostas inflamatórias locais no intestino podem influenciar uma diversidade de funções do SNE (Côté *et al.*, 2011). Schafer *et al.* (2009) acreditam que inflamações intestinais em geral podem conduzir à remodelação do SNE, mudanças induzidas por citocinas na liberação e no conteúdo de neurotrofinas e neurotransmissores; e à remodelações nas conexões sinápticas.

Como as inflamações ou infecções intestinais afetam profundamente o equilíbrio hídrico no intestino conduzindo tanto à diarreia quanto à constipação (Hirota e McKay, 2006), sendo estes sintomas relatados como decorrentes da toxicidade do F, possivelmente a exposição à altas concentrações de F também possa conduzir ao desenvolvimento de um processo inflamatório. Sendo assim, torna-se interessante avaliar o envolvimento de neuropeptídeos como a SP e o CGRP na toxicidade do F sobre o intestino delgado, dado que atuam tanto na motilidade quanto na resposta inflamatória do TGI.

A SP é um importante mediador do desenvolvimento e progressão dos processos inflamatórios intestinais ao se ligar com uma alta afinidade aos receptores de neurocinina-1 (NK-1R) (Koon e Pothoulakis, 2006); e também atua como um neurotransmissor, regulando várias funções como a motilidade intestinal, secreção e circulação (Shimizu *et al.*, 2008).

Além da SP, outro neuropeptídeo que se encontra amplamente distribuído em terminações nervosas sensoriais no TGI é o CGRP, o qual atua na regulação da motilidade,

funções sensoriais, microcirculação intestinal, secreção, absorção de aminoácidos, microcirculação linfática e na função linfocitária (Chiocchetti *et al.*, 2006).

Estudos comprovaram que o CGRP é particularmente abundante em nervos do plexo mioentérico, no qual é capaz de excitar neurônios desse plexo e também estimular a liberação de ACh (Mulholland e Jaffer, 1990). Outros estudos têm mostrado que o CGRP pode ainda inibir a secreção ácida gástrica e estimular a liberação de somatostatina (Rasmussen *et al.*, 2001a).

Ambos, SP e CGRP, são também considerados mediadores particularmente importantes na patofisiologia do TGI (Wang *et al.*, 2006), pois são particularmente relevantes no que diz respeito à inflamação, desempenhando um papel pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente (Wang *et al.*, 2006). Da mesma maneira atuam no reparo em lesões no intestino, agindo no processo de cicatrização das lesões (Brain, 1997; Wang *et al.*, 2006).

Para avaliar os efeitos do F sobre a função intestinal, acreditamos que além da análise da inervação entérica, outra técnica, a análise proteômica, também constitui uma importante ferramenta de investigação científica.

Estudos proteômicos na área médica permitem correlacionar alterações morfológicas com diferentes funções celulares e de organelas, que são diretamente determinadas por uma variação no proteoma, e não pelo genoma, pois o proteoma pode ser alterado por várias modificações pós-traducionais (Klein e Thongboonkerd, 2004). Segundo estes autores, através destas modificações, várias proteínas funcionalmente distintas podem ser geradas a partir de um único gene. Neste sentido, a proteômica complementa as informações obtidas através da genômica.

Uma análise proteômica típica começa com a extração de proteínas, seguida de sua separação, através de métodos que utilizem gel (2-D PAGE) ou não (cromatografia líquida) (Thongboonkerd, Klein e Klein, 2004). As proteínas separadas são então identificadas posteriormente por espectrometria de massas (MS) (Pierce e Cai, 2004).

A alta sensibilidade da técnica usada no proteoma pode detectar efeitos tóxicos com doses menores em comparação a métodos como a histologia e outras análises químicas, agrega como vantagens a utilização de tecidos para investigar a correlação molecular de doenças ou quadros de toxicidade; e a rapidez para projetar efeitos tóxicos quando comparadas a métodos convencionais (Kennedy, 2002).

Apesar dos vários relatos na literatura sobre a toxicidade do F, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por seus efeitos no intestino. Estudos recentes têm demonstrado que o F em concentrações na ordem de μM induz à apoptose de várias linhagens celulares, bem como à alteração da resposta imunológica (Anuradha, Kanno e Hirano, 2001; Refsnes *et al.*, 2001; Refsnes *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

Dessa forma, a análise proteômica se torna uma importante ferramenta para a avaliação da toxicidade do F, pois o seu uso na projeção e pré-diagnóstico toxicológico tem como uma das principais aplicações estabelecer a relação entre os efeitos tóxicos e as proteínas-alvo, isto é, identificar biomarcadores toxicológicos (Kennedy, 2002).

Embora a análise proteômica já tenha sido utilizada para avaliar alterações ocorridas no intestino em decorrência, por exemplo, do seu desenvolvimento no período pós-natal (Hansson *et al.*, 2011), processo de maturação das células epiteliais (Chang *et al.*, 2008), efeitos do período de hibernação de animais (Martin *et al.*, 2008), desenvolvimento de câncer de cólon (Minowa *et al.*, 2000) ou após uma grande ressecção cirúrgica (Stephens *et al.*, 2010), ainda não existe nenhum relato da utilização deste método com o objetivo de avaliar alterações geradas pelos possíveis efeitos tóxicos do F sobre o intestino delgado, sendo este um dos objetivos deste nosso estudo.

Da mesma forma, utilizamos o NaF, pois é comprovado em estudos com exposição aguda e crônica (Baldwin, 1899; Shivarajashankara *et al.*, 2002), que a ingestão excessiva de NaF causa danos ao TGI (Susheela *et al.*, 1992; Sondhi, Gupta e Gupta, 1995; Shashi, 2002), assim como também é descrito que o F é neurotóxico (Mullenix *et al.*, 1995; Varner *et al.*, 1998). Todos estes indícios tornam bastante pertinentes a realização deste estudo. Portanto, atentando para os dados compilados na literatura, torna-se evidente que, apesar de existirem estudos sobre a toxicidade do F sobre os mais diferentes órgãos, uma abordagem que ainda merece investigação são os possíveis efeitos do F sobre os neurônios do SNE e sobre o proteoma da parede intestinal, em consequência da toxicidade desse íon, os quais, efetivamente, investigamos no presente estudo.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Flúor

O flúor pertence à família dos halogênios, sendo o mais eletronegativo e poderoso agente oxidante conhecido (Teitelbaum, 2001). Por ser altamente reativo, apresenta uma forte tendência em adquirir carga negativa e formar íons em solução (Whitford e Pashley, 1984). O flúor nunca é encontrado na forma livre e altera a sua forma ao se ligar a outros elementos gerando diversos tipos de compostos (Barbier, Arreola-Mendoza e Del Razo, 2010). Ao se combinar com outros elementos químicos forma os fluoretos, cuja reação com a água resulta na formação do ácido fluorídrico (HF) (O'neil *et al.*, 2001), extremamente ácido, reativo e corrosivo (Mitsui *et al.*, 2007).

Na sua forma iônica, o F, é encontrado em abundância no ambiente, como parte dos minerais que formam as rochas e o solo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003). Com o contato destas rochas com lençóis freáticos, tem-se um aumento da sua concentração na água de muitos países, sendo que a partir destas fontes pode ser ingerido através do consumo desta água (Barbier, Arreola-Mendoza e Del Razo, 2010).

Os efeitos do F sobre a estrutura dentária foram reconhecidos inicialmente, por dois cirurgiões dentistas do estado do Colorado nos Estados Unidos, Frederick McKay e Grant Black, em 1909, que observaram uma pigmentação marrom nos dentes de vários pacientes, produzidas pelo F no esmalte dentário, e que foi chamada de “*Colorado brown stain*” (Peckham e Awofeso, 2014). Nesta revisão de Peckham e Awofeso (2014), os autores relatam que somente 22 anos após a observação das manchas marrons, em 1931, foi confirmada a correlação entre a pigmentação e altos níveis de F na água, sendo a partir deste momento investigada também a fluorose pelo famoso Dr. Trendley Dean (Dean e Elvove, 1937), o qual detectou o efeito protetor do F presente na água ingerida sobre o desenvolvimento da cárie dentária (Dean, 1942).

A cárie dentária é ainda um importante problema de saúde pública, dado que 36% da população mundial sofre com esta patologia (Ren, Baig e Li, 2014), a qual é multifatorial, infecciosa e transmissível (Buzalaf *et al.*, 2002; Silva, T. C. *et al.*, 2009). A cárie resulta da desmineralização dos tecidos duros (esmalte, dentina e cemento) e/ou decomposição dos compostos orgânicos da estrutura dentária, causada por ácidos gerados pelas bactérias, que têm nos açúcares dos alimentos, o substrato para sua manutenção (Nabavi *et al.*, 2012). O F em concentrações adequadas é capaz de prevenir e controlar o desenvolvimento da cárie dentária (Buzalaf *et al.*, 2002; Silva, T. C. *et al.*, 2009), atuando nos processos de

desmineralização e remineralização da estrutura mineral, sendo considerado o mais importante agente anticáries (Ren, Baig e Li, 2014).

Após ser reconhecido como fundamental para a diminuição da incidência da cárie dentária, foi implementada a fluoretação da água de abastecimento em 1945 nos Estados Unidos e em 1946 no Canadá (Browne, Whelton e O'mullane, 2005), sendo a fluoretação considerada uma das dez medidas de saúde pública mais importantes do século XX (Buzalaf *et al.*, 2013).

O sucesso na utilização do F para controlar a cárie dentária levou à produção de inúmeros produtos fluoretados, como os dentifrícios, enxaguatórios; e outros de aplicação profissional como géis e vernizes; sendo que em 1970 inicia-se a comercialização de dentifrícios fluoretados na Europa (Browne, Whelton e O'mullane, 2005). Até meados de 1990, a toxicidade do F foi bastante ignorada devido aos seus efeitos anticáries comprovados, porém os seus efeitos tem sido reavaliados devido ao fato deste elemento interagir com os sistemas celulares até mesmo em baixas doses (Barbier, Arreola-Mendoza e Del Razo, 2010).

Muitos pesquisadores tem descrito o F como um contaminante das águas, dado que milhões de pessoas pelo mundo ingerem água contendo altas concentrações deste íon, sendo a água a fonte primária de exposição ao F (Flora, Mittal e Mishra, 2009), e a indústria de fertilizantes a maior fonte antropogênica de contaminação por F (Chouhan e Flora, 2010). Atualmente, milhões de pessoas estão expostas ao F em todo o mundo devido à água de abastecimento em certas regiões conter altas concentrações deste íon, sendo o limite permitido na água pela Organização Mundial da Saúde de 1 mg F/L (1 ppm F) (Who, 2002).

Altos níveis de F, identificados em lençóis freáticos em vários países, são classificados por alguns autores até mesmo como contaminação (Barbier, Arreola-Mendoza e Del Razo, 2010) ou poluição (Chouhan e Flora, 2010). A classificação do F mais como um poluente do que um nutriente ou medicamento já faz com que realmente se analisem os seus efeitos (Peckham e Awofeso, 2014).

A fluoretação da água de abastecimento por órgãos públicos, é atualmente praticada em 25 países do mundo (Iheozor-Ejiofor *et al.*, 2015). No Brasil, o primeiro município a aplicar a fluoretação da água foi Baixo Guandu (Espírito Santo), no ano de 1953, e em seguida, o primeiro estado brasileiro a estabelecer a obrigatoriedade da fluoretação foi o Rio Grande do Sul, em 1957 (Narvai, 2000). A partir de 1974 a fluoretação das águas de abastecimento tornou-se obrigatória no Brasil, “onde exista estação de tratamento de água”, com base na Lei Federal nº 6.050, de 24/5/1974 (Brasil, 1974), regulamentada pelo Decreto nº

76.872, de 22/12/1975, sendo os produtos frequentemente utilizados para a fluoretação o fluorsilicato de sódio e o ácido fluorsilícico (Ministério Da Saúde, 2009).

Embora a fluoretação das águas seja uma medida estabelecida por lei, ainda existem áreas que não apresentam o recurso da fluoretação (Cardoso *et al.*, 2003) e outros locais em que embora exista a sua implementação, os níveis de F não são controlados adequadamente (Buzalaf *et al.*, 2002). Inegavelmente a fluoretação da água de abastecimento associada à utilização de dentifrícios fluoretados são eficazes na prevenção e controle da cárie (Cardoso *et al.*, 2003), porém uma das maiores preocupações quanto à fluoretação da água é a dificuldade de se controlar as doses individuais de F que são ingeridas, sendo por esta razão difícil de estabelecer a dose ideal de F a ser adicionada (Peckham e Awofeso, 2014).

Além da cárie, outra importante patologia também pode ser tratada com a utilização do F, a osteoporose, uma doença metabólica óssea, caracterizada pela perda de conteúdo mineral, que acomete especialmente mulheres no período pós-menopausa (Whitford e Pashley, 1984). Por estas duas aplicações, o F é muito benéfico quando consumido dentro dos limites toleráveis, porém ao ser consumido em excesso pode ser tóxico (Guan *et al.*, 2000), sendo a ingestão da concentração de até 1 ppm F segura para o corpo humano (Zhao *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2000).

A exposição ao F por um longo período especialmente pelo consumo de água e outros produtos contendo F, pode levar ao desenvolvimento da fluorose, considerada um problema endêmico de saúde pública em 22 países em todo o mundo (Chouhan e Flora, 2008).

A fluorose dentária é caracterizada pela retenção das amelogeninas nos estágios de maturação do desenvolvimento dentário, gerando um esmalte mais poroso com uma subsuperfície hipomineralizada, causando um comprometimento estrutural identificado por um manchamento de cor marrom no esmalte (Browne, Whelton e O'mullane, 2005), o qual pode ser classificado em vários níveis, de moderado à grave (Mullenix *et al.*, 1995).

O período de susceptibilidade para o desenvolvimento da fluorose dentária se encontra em uma faixa etária entre 2 a 6 anos de acordo com Ankle *et al.* (2005), e de 6 a 8 anos segundo Pendrys (1990), nos quais as crianças são especialmente expostas ao F, pela utilização de produtos fluoretados, sendo que para os dentes incisivos superiores permanentes, os primeiros 3 anos são ainda mais importantes (Hong *et al.*, 2006).

Dessa forma, em crianças em idade pré-escolar, a quantidade de F que é ingerida deve ser bastante avaliada, e os produtos odontológicos contendo F que apresentam efeito

preventivo só devem ser aplicados quando existir um elevado risco do desenvolvimento de lesões cariosas; assim como todas as fontes de F devem ser consideradas, incluindo a água de abastecimento, alimentos e bebidas (Warren e Levy, 1999), uma vez que ao se controlar a ingestão de F, tem-se um controle da sua toxicidade e consequente previne-se a fluorose.

Dessa forma, é de suma importância controlar e limitar o uso do F na infância (Ankle, Groppel e Masaoka, 2005), devendo-se tomar especial cuidado com o uso de dentifrício fluoretado em crianças, como forma de evitar a fluorose (Browne, Whelton e O'mullane, 2005).

Nos Estados Unidos, por exemplo, já foi verificado tanto em adultos quanto em crianças que existe uma ingestão excessiva de F, o que contribui para o desenvolvimento da fluorose, considerada o primeiro sinal da toxicidade do F (Levy, Kiritsy e Warren, 1995; Marshall *et al.*, 2004; Erdal e Buchanan, 2005). Nestes dados foi verificada que a concentração de F na água varia de 0,7 a 1,2 ppm F, sendo que a média de F ingerido por um adulto é de 1,58 a 6,6 mgF/dia, enquanto para crianças esse valor é de 0,9 a 3,6 mgF/dia, sendo bastante variável a quantidade ingerida somente através da água (Public Health Services, 1991).

No Brasil, o controle da fluoretação da água de abastecimento é realizado pelo Ministério da Saúde e por entidades representativas da área odontológica, sendo estes também os responsáveis pela recomendação da fluoretação da água de abastecimento, de acordo com a Portaria n. 518, de 25 de março de 2004, que “estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano” (Ramires *et al.*, 2006).

Devido à importância da adequação e manutenção das concentrações de flúor em níveis adequados, optou-se, por exemplo, na cidade de Bauru pela implantação do heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público, com o apoio financeiro da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). De acordo com o conceito estabelecido, “O heterocontrole é o princípio segundo o qual, se um bem ou serviço qualquer implica risco ou representa fator de proteção para a saúde pública então além do controle do produtor sobre o processo de produção, distribuição e consumo, deve haver controle por parte das instituições do Estado” (Narvai, 2000). Dessa forma, com a utilização do sistema de heterocontrole, os níveis de F podem ser mantidos em parâmetros adequados.

No que diz respeito a estabelecer a quantidade ideal a ser adicionada na água de abastecimento, a localidade deve ser levada em consideração, pois regiões onde o clima é mais quente, a população tende a apresentar um consumo maior de água, e consequentemente aumentar a sua exposição ao F (Whitford, 1990).

A ingestão excessiva de F pode também levar ao desenvolvimento da fluorose esquelética, na qual ocorre uma alteração no processo de mineralização dos ossos longos, gerando um crescimento ósseo anormal, calcificação dos ligamentos e aumento da densidade em ossos pélvicos, causando deformidades esqueléticas que levam a limitação dos movimentos articulares e alterações musculares (Chouhan e Flora, 2010). A deformidade esquelética é ainda mais acentuada em crianças devido à exposição ocorrer durante o processo de crescimento ósseo, sendo comumente observada em países como a Índia, China, Tanzânia e África do Sul, onde ainda existe uma deficiência também do cálcio na dieta, aumentando a absorção de F e seus efeitos tóxicos (Tiwari *et al.*, 2004). Na Índia, em torno de 62 milhões de pessoas apresentam algum nível de fluorose esquelética desenvolvida a partir do consumo de água contendo F (Bhatnagar, Bhatnagar e Regar, 2007).

Atualmente, a outra forma da doença, a não-esquelética, tem atraído bastante atenção de pesquisadores em todo o mundo, pois neste quadro são afetados os tecidos moles como os músculos, fígado, rins, pulmões, sangue, sistema nervoso e mucosa gastrointestinal, por exemplo (Chouhan e Flora, 2008).

O sítio inicial de absorção do F que é ingerido é a mucosa oral, especialmente em soluções ácidas, porém esta absorção ocorre de uma forma limitada quando comparada à absorção pelo TGI (Whitford, 1990). Ainda na cavidade bucal, ao passar pelas superfícies dentárias é incorporado às estruturas mineralizadas, sendo este o seu principal benefício (Buzalaf, Cardoso e Magalhães, 2013). Em seguida, em seu trajeto pelo TGI, é absorvido no estômago e intestino delgado, sendo este último o seu maior sítio de absorção (He *et al.*, 1998), pois atravessa rapidamente a mucosa intestinal, se difundido pelo organismo (Chouhan e Flora, 2008).

A maneira exata pela qual o corpo todo é afetado pelo F ainda permanece desconhecida, mas sabe-se que o F é conhecido por atravessar as membranas celulares e penetrar nos tecidos moles (Mullenix *et al.*, 1995), e que seus efeitos tóxicos relacionam-se à processos como a inibição enzimática, destruição do colágeno, paralisação de atividades do sistema imune e danos ao TGI (Chouhan e Flora, 2008). Estes e vários outros efeitos estão associados especialmente à exposição crônica à concentrações a partir de 1,5 ppm F na água

de abastecimento (Chouhan e Flora, 2008), sendo que estas concentrações na água de beber podem variar de menos de 0,1 ppm F a até mesmo 50 ppm F dependendo do local de onde a água é retirada (Pendrys, 2001).

Por todos estes dados expostos deve-se considerar que existem inúmeras fontes de exposição ao F, e que também existe uma íntima ligação entre a ingestão do F, sua absorção pelo TGI e seus efeitos tóxicos. Embora muitos estudos tenham avaliado alguns aspectos importantes envolvendo a ingestão de F e seus efeitos sistêmicos, acreditamos que a chave da toxicidade do F relaciona-se com a sua passagem pelo TGI, cujos mecanismos específicos necessitam de maiores esclarecimentos.

2.2. Absorção do F pelo TGI

É bastante divulgado que o F é capaz de entrar no corpo humano através do TGI (Zheng *et al.*, 2002), no qual é absorvido especialmente através da mucosa gástrica e duodenal (Dunipace *et al.*, 1995), sendo conduzido ao sistema circulatório (Sharma, Sohu e Jain, 2009).

Os efeitos tóxicos agudos da ingestão do F vão de um desconforto gástrico e redução na habilidade de concentração renal, até mesmo a uma severa hipercalemia, hipocalcemia, colapso cardiovascular, os quais podem levar à morte (Whitford e Pashley, 1984). O processo de hipercalemia (devido ao efluxo de potássio dos eritrócitos, uma vez que o F inibe a Na⁺/K⁺ ATPase) está relacionado às disritmias, assim como a hipocalcemia (pela ligação do F ao cálcio) (Lech, 2011).

Vários trabalhos avaliando a toxicidade crônica e aguda do F têm sido realizados, tanto em animais quanto em seres humanos, nos quais os danos ao TGI são comprovados (Waldbott e Lee, 1978a; Susheela e Das, 1988; Sondhi, Gupta e Gupta, 1995; Shashi, 2002), sendo que muitos sintomas gastrointestinais importantes são relacionados à fluorose (Susheela *et al.*, 1993). Estes sintomas vão desde o comprometimento gastroduodenal (Dasarathy *et al.*, 1996) e dores epigástricas por exposição à compostos fluoretados em atividades laborais (Desai *et al.*, 1986), a até mesmo o desenvolvimento de colite em decorrência da fluorose crônica (Waldbott e Lee, 1978b). Adicionalmente, as próprias alterações da motilidade do TGI causadas pelo F podem também afetar a sua absorção e conduzir a um agravamento dos seus efeitos tóxicos (Amira, Soufane e Gharzouli, 2005).

Em um estudo realizado na Índia é relatado o desconforto gastrointestinal associado à presença de diferentes concentrações de F nos lençóis freáticos de onde é retirada a água para o consumo da população, sendo as principais queixas: dor de estômago, náusea,

diarreia, constipação (Sharma, Sohu e Jain, 2009). Estes autores afirmam que a prevalência da queixa de problemas gástricos como dor de estômago e náusea ocorre devido à pobreza nutricional da população pelas condições sócio-econômicas, o que acaba exacerbando estes efeitos da ingestão de F. No estudo em questão, os sintomas foram descritos em populações que recebiam F em concentrações menores que 0,5 ppm F; 1 a 1,5 ppm F; e maiores que 1,5 ppm F. Embora o estudo tenha o foco na exposição crônica, os pesquisadores comentam alguns sintomas gastrointestinais que também ocorrem devido à intoxicação aguda, como salivação, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia e cólicas.

Embora a ingestão de quantidades tóxicas agudas de F sejam raras, a prevalência da fluorose dentária tem aumentado na América do Norte, sugerindo que os níveis de F ingeridos não são bem controlados, e que ainda existe uma contínua ingestão de altas concentrações (Warren e Levy, 1999).

No que diz respeito à toxicidade do F, especialmente sobre o TGI, dados como estes são importantes especialmente porque em áreas endêmicas para a fluorose, nas quais os habitantes consomem água com altas concentrações de F, os sintomas gastrointestinais são descritos como seus primeiros sinais tóxicos, sendo as principais queixas, falta de apetite, náusea, dores abdominais, flatulência, constipação e diarreia intermitente (Susheela *et al.*, 1993). Outros sintomas como hipersalivação, disfagia, irritação da mucosa gástrica e intestinal também são relatados (Chouhan e Flora, 2010).

Embora o F possa ser ingerido através de várias fontes, as principais são a água, alimentos e produtos odontológicos, sendo rapidamente absorvido através do TGI, apresentando uma biodisponibilidade de 84 a 100% (Lech, 2011). Na ausência de altas concentrações de certos cátions, como o cálcio e o alumínio, que se ligam e formam compostos insolúveis com o F, outros autores também confirmam esta alta taxa de absorção, em cerca de 80-90% da quantidade ingerida, a qual atinge a sua meia-vida em 30 minutos (Cremer e Buttner, 1970). Dessa forma, existe uma preocupação com a ingestão de F, pois geralmente menos de 20% do F ingerido diariamente é excretado nas fezes (Whitford, 1990).

Dentro da odontologia, a preocupação com a absorção intestinal do F é especialmente devida à sua ingestão através da água fluoretada e de produtos odontológicos, com destaque para os dentifrícios, sendo estes os principais e também o alvo de inúmeros estudos (Vilhena *et al.*, 2010; Buzalaf, Cardoso e Magalhães, 2013). Atualmente, existe um incrível avanço no número de pesquisas com o objetivo de produzir um dentifrício fluoretado mais adequado, que não apenas previna as cáries, fornecendo uma quantidade de F constante

na cavidade bucal, para facilitar o processo de remineralização; mas que também apresente uma concentração de F que evite desde os mínimos sinais de toxicidade a até mesmo o desenvolvimento da fluorose dentária, esquelética e dos tecidos moles (Vilhena *et al.*, 2010; De Almeida Baldini Cardoso *et al.*, 2014).

A absorção de F depende de vários fatores como a solubilidade do composto, a forma física com a qual é ingerido, a frequência da administração e o ambiente iônico (Wagner, 1962). Da mesma maneira, a forma como o F se apresenta biodisponível varia conforme a fonte, mas a absorção é similar, embora a forma e a intensidade dos efeitos tóxicos variem entre espécies (Whitford, Biles e Birdsong-Whitford, 1991).

O F é o elemento mais eletronegativo e reativo, apresentando uma forte tendência de adquirir carga negativa e formar íons em solução (Teitelbaum, 2001). No estômago, devido ao ambiente ácido, o F é convertido em ácido fluorídrico (HF) (Whitford e Pashley, 1984). É preciso lembrar que o HF é um ácido fraco ($pK_a=3,4$), e que o metabolismo do F está intimamente relacionado ao pH, pois a migração transmembrana ocorre, especialmente, na forma de HF, em resposta às diferenças na acidez dos fluidos corporais, em compartimentos adjacentes (Whitford, 1989).

A forma não dissociada, HF, é a molécula permeável nos túbulos renais, bexiga urinária, diafragma, hepatócitos e bicamada lipídica (Whitford e Pashley, 1984). A pequena molécula de HF penetra mais rapidamente do que a forma iônica pelas membranas celulares, sendo o coeficiente de permeabilidade do HF mais de 1 milhão de vezes maior do que o do F iônico (Gutknecht e Walter, 1981). Whitford e Pashley (1984) também confirmam que a absorção do F no estômago ocorre em uma taxa inversamente proporcional ao pH, e que o F permeia as membranas biológicas do estômago na forma não dissociada (HF).

A questão da acidez para a absorção gástrica do F é considerada tão importante, que no estudo de Whitford e Pashley (1984), é relatado que crianças com hábitos que produzam uma alta acidez gástrica, apresentam um maior risco para o desenvolvimento da fluorose dentária, pois a acidez facilita a sua absorção pela formação de HF. Da mesma forma, os autores acreditam que pacientes que recebem doses de F para o tratamento da osteoporose, e que apresentam alguma deficiência em manter a acidez gástrica, podem não apresentar resultados satisfatórios, sem melhora do quadro.

Whitford e Pashley (1984) consideram que a absorção gástrica de F representa de 20 a 40% da absorção total. Embora o F seja um dos poucos elementos absorvidos a partir do estômago, sendo este órgão um inquestionável e significativo sítio da sua absorção, sua

contribuição para a absorção total é muito menor do que a do intestino, sendo descrito em ratos, que 25% da absorção do F ocorrem no estômago, enquanto os outros 75% ocorrem no intestino delgado (Nopakun, Messer e Voller, 1989), especialmente na porção proximal (Messer e Ophaug, 1991; Gharzouli e Senator, 1994; Shashi, 2002).

A taxa de absorção gástrica está diretamente relacionada à acidez, portanto para qualquer dose, o pico plasmático é alto e ocorre o mais rapidamente quanto mais ácido é o seu conteúdo (Whitford e Pashley, 1984). A maioria do F que não é absorvido no estômago, é absorvido no intestino delgado, especialmente nos segmentos proximais, sendo o F presente nas fezes aquele que não foi absorvido (Whitford, 1994). Estes fatos são baseados em estudos realizados em animais e humanos, nos quais foram avaliados adultos considerados jovens ou adultos de idade média (Whitford, 1989), sendo que o resultado pode ser quantitativamente diferente em crianças e idosos (Whitford, 1994).

É descrito que o F ingerido entra na circulação pela sua absorção através da mucosa gástrica e duodenal (Susheela e Das, 1988). O duodeno, a porção proximal do jejuno, a distal do íleo, e do cólon, absorvem F proporcionalmente à sua concentração no lúmen por difusão passiva (Gharzouli e Senator, 1994; Whitford, 1996), embora a participação de um componente do transporte ativo já tenha sido descrita (Parkins *et al.*, 1966).

A hipótese de que o F atravessa o epitélio na sua forma não dissociada foi destacada pelos resultados obtidos após a avaliação da sua absorção no estômago (Whitford e Pashley, 1984), bexiga urinária (Whitford, Pashley e Reynolds, 1977) e túbulos renais de ratos (Whitford, Pashley e Stringer, 1976); assim como em túbulos renais de coelhos (Rouch, Whitford e Campbell, 1992), cães (Whitford e Pashley, 1991) e de seres humanos (Ekstrand *et al.*, 1980).

Ao testar a permeabilidade tanto de HF quanto de F utilizando bicamadas lipídicas sintéticas, foi verificado que o HF tem um coeficiente de permeabilidade similar ao da água, e que o transporte de F através de membranas biológicas ocorre primariamente pela difusão da forma não iônica (Gutknecht e Walter, 1981). No estudo de Gutknecht e Walter (1981), os autores acreditam que sua alta permeabilidade é devida ao grande espaço entre as moléculas, que aumenta sua fluidez; e ao alto coeficiente de partição do HF. Foi também determinada a razão de 10^4 entre a difusão da forma não iônica (HF) e a iônica (F), a qual acredita-se ser verdadeira para a maioria dos tipos celulares e tecidos, porém não para todos. Junte-se a isto, os pesquisadores confirmaram a dependência do pH para o transporte de F, especialmente para a difusão do HF em $\text{pH} < 6$, em concordância com Whitford e Pashley (1984), que

também afirmam que a taxa de absorção do F no estômago de ratos é diretamente relacionada à acidez da solução do lúmen.

Inúmeros são os experimentos que buscaram avaliar os princípios envolvidos na absorção do F no TGI. Em um interessante estudo, no qual o próprio pesquisador ingeriu NaF para analisar os efeitos iniciais da toxicidade do F (Baldwin, 1899), foi feita uma descrição detalhada, pelo pesquisador, dos sintomas observados sobre o TGI. O autor afirma que inicialmente, quando pequenas quantidade de NaF foram ingeridas, ele apresentou náusea com pouca salivação, e ao ingerir 0,03 g de F com uma porção de pão, nenhum efeito foi verificado. Ao aumentar esta dose para 0,25 g com o estômago vazio por 2 dias, a náusea foi observada em 2 minutos, e a severidade dos sintomas aumentou em 20 minutos, onde atingiu o pico, com um grande aumento da salivação e ânsia de vômito. Assim que a náusea diminuiu, ele então se alimentou, mas vomitou imediatamente, sendo este momento após 2 horas da ingestão de NaF. Após este período ele ainda apresentou náusea por 24 horas. Neste caso, a dose de 0,25 mg F/kg foi a dose tóxica provável, porém o autor acredita que este valor limite entre a dose segura e tóxica é relativo e deve ser avaliado juntamente a outros fatores, como a ingestão de alimentos.

Messer e Ophaug (1991), com o objetivo de avaliar a absorção de F pelo estômago, utilizaram a pectina, um polissacarídeo que em contato com o pH ácido do estômago promove um espessamento na consistência do conteúdo gástrico, atrasando desta forma o seu esvaziamento. Neste trabalho, verificou-se que a absorção de F a partir do estômago, quando a pectina é utilizada, era maior do que nos grupos em que a pectina não era utilizada, porém não excedia 25% da absorção total do TGI. Os autores também destacam que as concentrações plasmáticas de F apresentam um aumento dentro de poucos minutos da ingestão de uma dose de F solúvel, confirmando que o estômago é um sítio de absorção de F. Porém, mesmo com o aumento na absorção de F quando a pectina era utilizada, ou seja, aumento da absorção de F com um atraso no esvaziamento gástrico e com uma permanência maior de F dentro do estômago; verificou-se que a quantidade de F total absorvida, ainda era menor do que nos grupos controle, indicando que a passagem do F para o interior do intestino delgado é o principal fator para uma rápida absorção de F.

Ainda neste estudo de Messer e Ophaug (1991), com o objetivo de comprovar a grande taxa de absorção de F pelo intestino delgado, os autores analisaram a passagem do NaF pelo TGI de acordo com a motilidade, utilizando polietileno glicol (PEG) com ^{14}C , o qual é um marcador de movimento da água através do TGI, para acompanhar o trajeto do F,

assim como a sua absorção pelo estômago e intestino. Verificou-se que, no grupo controle, após 10 minutos, quase 40% do ^{14}C não estava mais no estômago, enquanto no grupo que recebeu a pectina, apenas 15% não estava mais neste órgão. A efetividade da pectina foi comprovada, pois o esvaziamento gástrico no grupo controle ocorreu a uma taxa de 4,5% da dose/min, enquanto no grupo da pectina a taxa foi de 1,6%. Observou-se ainda que apenas 1% do ^{14}C alcançou o ceco em 2 horas, confirmando que a maior parte do F é absorvida no intestino delgado. Dessa forma, é importante ressaltar que uma rápida absorção de F depende de um rápido esvaziamento gástrico para o intestino delgado, sendo considerado este o maior sítio de absorção de F em ratos (Messer e Ophaug, 1991).

Dando continuidade aos estudos com o F, Messer e Ophaug avaliaram em outro trabalho, o efeito do aumento e diminuição do pH gástrico na absorção de F pelo estômago, aplicando em ratos a cimetidina (estimula a secreção ácida) e a pentagastrina (inibe a secreção ácida), seguidas de soluções ácidas e básicas com a dose de 50 μg F/Kg, para coleta e análise do estômago e intestino delgado dos animais (Messer e Ophaug, 1993). Os autores também utilizaram o PEG marcado com ^{14}C para acompanhar o trajeto das soluções pelo TGI. Nos animais do grupo controle, sem nenhuma das drogas para estimular ou inibir a secreção ácida, em 10 minutos os níveis plasmáticos de F aumentaram rapidamente, com um declínio entre 20 a 40 minutos após a ingestão da dose de F. No grupo que recebeu a cimetidina observou-se o mesmo padrão, enquanto o grupo que recebeu a pentagastrina, o pico plasmático foi alcançado em 20 minutos. Nos animais que receberam a cimetidina e o F em solução ácida, ou seja, a acidez foi aumentada de duas formas, as concentrações plasmáticas foram apenas ligeiramente maiores do que no grupo controle, em que o pico era alcançado em 10 minutos. No grupo que recebeu a cimetidina e o F em solução básica foi verificado um aumento mais lento da concentração plasmática, sendo que ao final de 40 minutos, todos os grupos apresentavam uma concentração semelhante.

Ainda no estudo de Messer e Ophaug, quanto à absorção, quando comparado os dois grupos que receberam a cimetidina, o grupo que também recebeu a solução ácida com F apresentou uma absorção 7 vezes maior após 10 minutos, não havendo diferença estatisticamente significativa após 40 minutos. O esvaziamento gástrico não foi afetado pela presença da cimetidina ou pentagastrina e também pela presença das soluções ácidas ou básicas. Messer e Ophaug concluíram que a absorção gástrica é pH dependente, e que o F atravessa a mucosa gástrica especialmente na sua forma não dissociada (HF), sendo rapidamente absorvido pelo intestino delgado, após o esvaziamento gástrico.

Os autores fizeram ainda uma consideração importante a respeito da absorção de F no intestino delgado, afirmando que a maior parte da absorção ocorre neste sítio mesmo que no seu lúmen o pH seja alto, uma vez que a absorção intestinal não é pH dependente, como descrito em outro trabalho (Whitford, 1990). Os autores concordam com outro estudo (Nopakun e Messer, 1990), afirmando que no intestino a absorção ocorre através da forma iônica (F), a qual atravessa o epitélio através dos canais paracelulares, pelas *tight junctions* entre as células.

Outro importante estudo também avaliou o efeito do pH sobre a absorção de F no estômago (Whitford e Pashley, 1984). Neste trabalho foi utilizada a atropina ou a cimetidina em ratos, para reduzir a secreção gástrica ácida; assim como também foi aplicado o bicarbonato de sódio, para reduzir a acidez do conteúdo gástrico. Em animais que receberam a dose de F com bicarbonato de sódio, a taxa de absorção de F foi significativamente reduzida, confirmada pelas baixas concentrações plasmáticas de F especialmente durante a primeira hora após a aplicação da dose, na qual se dá a passagem pelo estômago. No mesmo trabalho, a absorção de F foi avaliada, ao ser administrado o F com o HCl, e novamente confirmou-se a importância do pH para a absorção do F, uma vez que a absorção foi extremamente rápida. Neste caso os autores comentaram que existe a possibilidade de se aumentar a toxicidade do F quando ingerido, por exemplo, com bebidas ácidas.

O mecanismo de absorção do F no estômago e no intestino delgado também foi analisado utilizando o método do refluxo *in situ* (Sato, Yoshitake e Hitomi, 1985). Neste trabalho foram utilizadas concentrações de F ora em solução fisiológica, ora em água deionizada. Os autores confirmam que a absorção pelo intestino é mais eficiente do que a realizada pelo estômago, assim como também é concentração-dependente. Verificou-se que a absorção do F era menor em solução fisiológica do que em água deionizada, sendo este resultado atribuído à presença do cloreto (Cl⁻), com um efeito ainda mais pronunciado em menores concentrações de F, pois ao se aumentar a concentração de F verificava-se uma diminuição da influência do Cl⁻ sobre a absorção do F. Os autores sugerem que a presença desse mecanismo competitivo do F com o Cl⁻ é um indício da presença do transporte ativo para a absorção de F.

Ainda no estudo de Sato, Yoshitake e Hitomi (1985) também foi observada uma diminuição na absorção de F na presença de um inibidor da fosforilação oxidativa, sugerindo que a absorção de F não ocorre somente de forma passiva, confirmando a possibilidade da absorção ocorrer de forma ativa, ou seja, com gasto de energia. Os autores também

confirmam a existência do mecanismo passivo de difusão, pois ao aumentar as concentrações de F, a partir de uma determinada concentração não ocorria um aumento na absorção. Dessa forma os autores acreditam que ambos os mecanismos ocorrem (ativo e passivo).

Outra técnica empregada para o estudo da absorção do F, a técnica do saco evertido, também foi utilizada para avaliar sua absorção a partir do estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e cólon (Gharzouli e Senator, 1994). Os sacos feitos com estes segmentos do TGI eram preenchidos com solução fisiológica e incubados a 37°C em PBS, sendo depois acrescentadas diferentes concentrações de NaF para a avaliação da absorção do F. Estes autores observaram que a absorção no duodeno, jejuno proximal, íleo distal e cólon foi proporcional ao conteúdo do lúmen intestinal, nas concentrações de 0,5 – 10 mM. Por outro lado, a absorção de F no estômago foi curvilínea e menor do que a observada nos intestinos, e também foi verificado no estômago e duodeno, um fluxo de F dirigido em direção à mucosa quando a concentração de 0,5 mM de NaF estava inicialmente presente em ambos os lados dos sacos invertidos.

Outros experimentos bastante semelhantes à técnica dos sacos evertidos de Gharzouli e Senator (1994) foram realizados com os segmentos intestinais de ratos, os quais após serem coletados, virados ao avesso e também preenchidos com solução contendo F, tinham suas extremidades amarradas (Stookey, Dellinger e Muhler, 1964). Neste estudo de Stookey, Dellinger e Muhler (1964), os sacos evertidos foram testados, mergulhados em solução contendo F, e preenchidos com solução com F. A cada 30 minutos eram coletadas amostras tanto da solução externa quanto da parte interna dos sacos, para que fosse avaliada a taxa de absorção de F ao longo do tempo, em diferentes concentrações. Os autores afirmam que quando foram colocadas soluções de mesma concentração na parte externa e interna dos sacos, nas concentrações de 15 e 30 ppm F, mesmo após uma hora do início, não foi observada alteração na concentração de F no interior dos sacos. Stookey, Dellinger e Muhler (1964) acreditam que este achado confirma a idéia de que não existe transporte ativo na absorção de F no estômago e no intestino, pois não ocorre passagem de F contra o gradiente de concentração. Os pesquisadores ainda afirmam que a temperatura não influencia a absorção do F, pois foram feitos experimentos em 3 diferentes temperaturas (20, 30 e 37°C), e não observou-se alteração na absorção do F quando as temperaturas eram comparadas. O fato de não ser temperatura-dependente foi ainda considerado pelo autor como mais um indício de que não ocorre transporte ativo.

É citado que a absorção do F ocorre na sua maior parte no intestino, predominantemente na forma iônica (Nopakun e Messer, 1990), uma vez que neste sítio atravessa o epitélio especialmente pela via paracelular, através das *tight junctions* (Messer e Ophaug, 1993). Três trabalhos atuais e importantes também avaliaram a absorção intestinal do F, analisando diferentes mecanismos, fornecendo indícios importantes deste processo (He *et al.*, 1998; Rocha, Vélez e Devesa, 2012; Rocha, Devesa e Vélez, 2013).

Dentro da morfologia do intestino delgado, a borda em escova das células absorptivas epiteliais apresenta um papel importante na absorção intestinal, aumentando a superfície de revestimento e intermediando a passagem de várias substâncias para o sistema circulatório (Junqueira e Carneiro, 2013). No trabalho de He *et al.* (1998) foi avaliado o mecanismo de captação de F através das vesículas da membrana da borda em escova, em diferentes condições: na presença de um influxo de H⁺ (pH interno=7,5 e o externo=5,0); na ausência de um gradiente (pH interno=pH externo=7,5); e na presença de um efluxo de H⁺ (pH interno=7,5 e pH externo=9,0). Verificou-se que a captação do F foi rápida na presença de um influxo de H⁺, até alcançar uma absorção máxima, a qual diminuiu gradativamente ao longo do tempo, apontando a existência de um mecanismo de acumulação transitória de F no interior das vesículas. Neste caso o pico da captação ocorreu em 15 minutos e diminuiu em direção ao equilíbrio em 60 minutos. No momento da sua máxima absorção atingiu uma concentração 2,3 vezes maior que a observada no ponto que foi determinado como equilíbrio. Na ausência de um gradiente de H⁺ e na presença de um efluxo de H⁺, a captação de F foi lenta, e não alcançou grandes valores, atingindo o ponto considerado como equilíbrio, entre 5 a 60 minutos.

He *et al.* (1998) também verificaram a permeabilidade aparente, que fornece a taxa de transporte de um soluto através de uma monocamada celular, independente da concentração deste soluto, avaliando a concentração da substância nas porções basolaterais, ou seja, especialmente o transporte pela via paracelular, o qual é descrito pelos autores como a principal via de absorção do F. A permeabilidade aparente do F foi avaliada ajustando o pH tanto do meio interno quanto externo das vesículas da membrana da borda em escova. Quando o pH era 9,0 ou 7 nos dois meios (interno e externo) a absorção de F foi quase zero. Porém, com o pH interno=7,5 e o externo=5,5, houve um grande influxo de F. Por estes experimentos, concluiu-se que o pH intra e extravascular tem pouca influencia na captação do F quando não existe um gradiente de pH.

Neste estudo de He *et al.* (1998) também foi analisado o efeito da osmolaridade do meio para a captação de F pelas vesículas da membrana da borda em escova, utilizando um preparado com as vesículas, em um meio no qual foram colocadas concentrações crescentes de manitol, ao qual as vesículas eram impermeáveis, e que induz a osmolaridade, deslocando água do meio interno para o externo. Verificou-se que conforme era aumentada a concentração de manitol, também era diminuído o influxo de F para o interior das vesículas. Como a água se desloca pela membrana celular, e não através de proteínas carreadoras, e quanto mais a água se deslocava pela membrana, menor era o influxo de F, os autores sugeriram então que o transporte de F para o meio interno, ocorria totalmente por espaços na membrana e não por mecanismos de ligação à moléculas carreadoras.

No mesmo estudo de He *et al.* (1998), para testar alguns mecanismos carreadores específicos, foram utilizados alguns inibidores do transporte transmembrana: O ácido 2,2-dissulfônico 4,4-diisotiocianatoestilbeno (DIDS), dietilpirocarbonato (DEP), Sulfonato de p-cloromercuriobenzeno (PCMBS) e o bis[ácido-(5)1,3-dibutilbarbitúrico] trimetino oxonol (DiBAC). Todos os inibidores foram analisados, com o objetivo de verificar se reduziam a captação de F quando era reduzido o gradiente de H^+ . Para a diminuição do gradiente de H^+ , as vesículas eram carregadas com um ácido, em seguida eram aplicados os inibidores em diferentes valores de pH (7,5 - 6,0 - 5,5) e checada a variação do *baseline*. A carga ácida nas vesículas também permitiu avaliar o efeito da oscilação do pH na presença dos inibidores de transporte transmembrana. Os resultados mostraram que a captação de F para o interior das vesículas diminuía de 18 a 40% na presença de DIDS em relação ao grupo controle. Da mesma forma, as vesículas tratadas com DEP também apresentaram uma diminuição de 39 a 42% comparadas ao grupo controle. Também observou-se que a captação de F para dentro das vesículas era diminuída em 50% quando as vesículas eram tratadas simultaneamente com DIDS e DEP.

O DEP, o qual também atua em sistemas de trocas dirigidos por gradientes de H^+ , inibiu a captação de F pelas vesículas da borda em escova, na presença de um gradiente de H^+ . Neste caso, como o DEP, o qual é um reagente reativo específico da histidina, inibiu a captação do F, é provável que resíduos de histidina tenham um papel importante no transporte de F, na presença de um gradiente protiônico.

Outro inibidor, o PCMBS, também foi utilizado. Neste caso foi avaliado o seu efeito sobre a captação de F na presença de um gradiente de H^+ (pH interno=7,5 e externo=5,5). Verificou-se que o influxo de F foi inibido pela presença de PCMBS de uma forma dose-

dependente, ou seja, quanto mais se concentrava a solução de PCMBs maior era a inibição do influxo de F, mesmo que houvesse um gradiente de pH. Os autores observaram ainda que a inibição do influxo de F era de 34% em uma concentração de 0,1mM e de 81% quando a concentração era de 5,0 mM, não aumentando significativamente a partir deste valor de concentração.

Também foi avaliada a existência de uma via de troca aniônica para o F através das vesículas. Para tanto, foram testados outros dois ânions, Cl^- e HCO_3^- , com os quais o F poderia realizar a passagem transmembrana, na ausência de um gradiente de pH (pH interno=pH externo= 7,5). Observou-se que um gradiente ou efluxo de Cl^- e HCO_3^- não aceleraram um influxo de F, indicando que não existe uma troca entre Cl^- e F ou entre HCO_3^- e F.

Quanto à captação do F pelas vesículas da membrana da borda em escova, na presença de um gradiente de Na^+ e K^+ foi observado que quando havia também um gradiente de pH (pH interno =7,5 e externo =5,5), a captação de F na presença de Na^+ , K^+ ou manitol foi maior do que nos mesmos grupos na ausência de um gradiente de pH. Não houve diferença estatística entre os grupos de Na^+ e K^+ , porém no grupo do manitol houve uma grande captação de F. Os autores acreditam que este resultado é devido à presença do Cl^- nos grupos que receberam Na^+ e K^+ , o qual compete com o F pelo mesmo sistema de transporte, pois o Na^+ utilizado foi inserido na forma de NaCl, assim como o K^+ , na forma de KCl. Com este teste, concluiu-se que a absorção do F é pH-dependente porém não depende da presença do Na^+ ou do K^+ .

Também foi avaliado se o Cl^- e o nitrato (NO_3^-) competem com o F, pelo mesmo sistema de transporte, o que foi confirmado em experimentos feitos na presença de um gradiente de prótons (pH interno=7,5 e o pH externo=5,5). A partir destes experimentos, os autores sugeriram que o transporte do F ocorre pela mesma via do Cl^- , e que o transporte passivo do F apresenta uma importância menor na sua absorção.

É descrito que o DIDS inibe quase que completamente a saída do íon Cl^- das hemácias. O DIDS pode inibir as trocas $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ e também $\text{SO}_4^{2-} - \text{OH}^-$, e foi utilizado para observar se também conseguia inibir a absorção de F pelas vesículas da membrana da borda em escova. Como resultado houve uma diminuição de 40% na absorção de F na presença de DIDS.

Com este trabalho de He *et al.* (1998), concluiu-se que um gradiente protiônico é necessário para o transporte do F pelas vesículas da membrana da borda em escova, em

coelhos, sendo este gradiente com um pH menor na parte externa e maior na interna. Observou-se que nestas condições o F atravessa rapidamente as membranas e se acumula transitoriamente dentro de vesículas em uma grande quantidade, a qual é mais de duas vezes o valor da quantidade em equilíbrio. Após 15 segundos existe uma redução da concentração de F no interior das vesículas, devido a um efluxo de F, que ocorre em função de um colapso do gradiente de pH. Este processo de influxo de grande quantidade de F na presença de um gradiente de pH já foi descrito em *Streptococcus mutans* (Whitford *et al.*, 1977).

Ao utilizar o PCMBs, observaram que a inibição da captação de F, o que indicou que os grupos sulfidríla estão envolvidos no sistema de transporte do F. Os autores concluem que a inibição do transporte de F por DIDS, DEP e PCMBs ocorre devido às interações específicas com um ou vários transportadores e não por uma diminuição no espaço vesicular ou por um colapso no gradiente prótônico.

Os autores também concluíram que altas concentrações de NO_3^- e Cl^- podem competir com o F pelo mesmo sistema de transporte nas vesículas da membrana da borda em escova, e portanto o F apresenta o mesmo sistema de transporte. Finalmente os autores estabelecem que o transporte de F deve estar relacionado a um gradiente de pH transmucoso no intestino delgado, assim como vários mecanismos mediados por carreadores. É lembrado também que este estudo avaliou a captação do F e não do HF, o qual acredita-se não ter sua absorção inibida por DIDS, DEP ou PCMBs.

Outro importante estudo, como o objetivo de avaliar os mecanismos de absorção intestinal do F, utilizou uma técnica *in vitro*, com a linhagem de células Caco-2 (Rocha, Vélez e Devesa, 2012). Estas células foram originalmente isoladas do adenocarcinoma do cólon, sendo as mais utilizadas para os estudos de absorção intestinal, especialmente com o objetivo de avaliar mecanismos de permeabilidade.

Esta linhagem de células Caco-2 se diferencia em cultura e produz monocamadas de células polarizadas com características morfológicas e funcionais de enterócitos maduros, assim como também apresenta a expressão de transportadores de membrana de uma forma similar ao intestino delgado (Rocha, Vélez e Devesa, 2012). Estes autores também descrevem que existem algumas características importantes destas células que as diferem dos enterócitos *in vivo*, pois a junção entre as células Caco-2 é muito mais próxima e “apertada” do que o normal, sendo esta característica importante especialmente para substâncias que se movem através destas junções. Outra característica importante é que as células produzidas *in vitro* não estão cobertas com muco, o qual é secretado por outros tipos celulares no intestino delgado.

Neste estudo de Rocha, Vélez e Devesa (2012) também foi utilizada a linhagem de células HT29-MTX, as quais são produtoras de muco, para que no trabalho, juntamente à presença de enterócitos fosse adicionado o muco, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Neste estudo, diferentes combinações de pH foram utilizadas nas partes apical e basal das células como: 7.4–7.4, 5.5–7.4 e 5.5–5.5. Para a avaliação da concentração de F nas amostras foi utilizado um método potenciométrico, com eletrodos íon-seletivos, semelhante ao método que utilizamos no laboratório da disciplina da bioquímica da FOB/USP/BAURU.

Para checar a resistência elétrica transepitelial, um composto fluorescente denominado Lucifer Yellow® (LY) foi utilizado, pois este composto é transportado especialmente através das junções entre as células, as quais controlam este mecanismo de resistência à passagem de substâncias pela via paracelular. Foram avaliadas várias proporções entre as células Caco-2 e HT29-MTX: 100/0, 70/30, 50/50, 30/70, 0/100. Verificou-se que quanto maior a proporção de células HT29-MTX, menor era a resistência das suas junções.

Para avaliar a permeabilidade aparente, ao se utilizar uma mesma concentração de F, foi observado um aumento linear no transporte de F até 120 minutos, sendo que houve um aumento na permeabilidade aparente conforme aumentava a proporção de células HT29-MTX, especialmente a partir da proporção de 50% (50/50), para cada tipo celular. Verificou-se também, que na ausência do muco existe um significativo aumento na permeabilidade aparente do F.

Como existe uma grande variação do pH em diferentes segmentos intestinais e alguns autores indicam que o pH ácido favorece o transporte de F, os autores avaliaram o efeito do pH na absorção de F na co-cultura Caco-2/HT29-MTX. Foi verificado que em um pH de 5,5 do lado apical existe um significativo aumento no transporte de F, independentemente do lado basolateral.

Neste estudo também foi avaliado o efeito do ácido taurocólico, um componente dos sais biliares que influencia na absorção de certos compostos, uma vez que este ácido favorece a absorção de moléculas hidrofílicas pela modulação das junções celulares (Meaney e O'driscoll, 1999). Foi avaliado o efeito do ácido taurocólico no transporte de F em culturas de células Caco-2, culturas de células HT29-MTX e em co-culturas (Caco-2/HT29).

Quanto à permeabilidade aparente, ou seja, a capacidade de atravessar as junções celulares e se acumular nas áreas basolaterais, na presença do ácido taurocólico verificou-se que a permeabilidade aparente do F aumentou entre as células Caco-2 em 6 vezes; na co-cultura, o aumento foi de 3 vezes; enquanto nas células HT29-MTX, o aumento foi mínimo

(1,2 vezes). Nos experimentos, os pesquisadores removeram a camada de muco das células Caco-2, observando que o ácido taurocólico aumenta a permeabilidade aparente do F, mas este aumento é igual ou menor que o aumento da permeabilidade aparente do F quando avaliada a monocamada com muco após a adição de ácido. Portanto, os autores acreditam que o muco não afeta a ação do ácido taurocólico, o qual aumenta a absorção de F.

Rocha, Vélez e Devesa (2012) ainda propuseram neste estudo comparar o efeito da absorção de F na presença de um alimento em processo de digestão. Para tanto prepararam amostras de arroz, adicionaram uma quantidade de F e reproduziram todas as etapas pelas quais o alimento é submetido até chegar ao intestino delgado, inclusive a ação de várias enzimas. Em seguida compararam os resultados destes experimentos com os realizados somente com o F.

O transporte de F após 2 horas do contato com o arroz foi maior no grupo que apresentava da co-cultura (4,4%), do que no grupo com somente as células Caco-2 (1%). A absorção do F, após 2 horas, sem amostra de alimento também apresentou o mesmo padrão, ou seja, foi maior na co-cultura (7,4%) do que no grupo com somente as células Caco-2 (2%). Portanto, a presença do alimento apresenta um considerável efeito no transporte de F, o que pode ser uma consequência do aumento na resistência transepitelial após 2 horas da passagem do alimento, sendo este aumento de 13% para apenas as células Caco-2, e de 2,36% para a co-cultura; contrastando para o grupo que não recebeu o alimento, em que não houve alterações significativas na resistência transepitelial.

Os autores caracterizaram o transporte do F, de acordo com a permeabilidade aparente, como um elemento de baixa a moderada absorção de acordo com critérios estabelecidos (Yee, 1997), em que uma absorção de 0 a 20% é considerada baixa; e de 20 a 70%, é descrita como moderada; e justificaram a diferença dos seus resultados com outros trabalhos que apresentam uma absorção de F de 75% (Nopakun, Messer e Voller, 1989), pelo fato destes outros estudos serem realizados *in vivo*, ou seja, de forma bastante diferente, dado que neste estudos foram utilizadas as células Caco-2, as quais apresentam junções mais fechadas, conduzindo a uma taxa de absorção menor, especialmente de compostos que utilizam a via paracelular, como é o caso do F.

Neste estudo de Rocha, Vélez e Devesa (2012) também foi importante a utilização da camada de células acompanhada da camada de muco, pois desta forma a simulação do ambiente do intestino delgado se torna mais fidedigna. Os pesquisadores concluíram que a presença do muco reduz significativamente o transporte de F pela via apical-basolateral.

Portanto, qualquer condição que leve a uma diminuição na camada de muco, como processos inflamatórios, pode conduzir a um aumento na absorção do F.

Estes autores ainda comentaram o efeito do pH sobre a absorção do F, dado que o pH é variável no intestino delgado entre os seus segmentos (de 5,5 a 8), pois conforme o conteúdo gástrico passa para o intestino delgado, ele é alcalinizado pelas secreções pancreáticas, assim como a secreção de bicarbonato também resulta em um aumento gradual do pH. Da mesma forma, a exposição da superfície da mucosa à substâncias ácidas aumenta a secreção de muco em 44%. Como os pesquisadores observaram que a presença de muco reduz o transporte de F, é provável que o aumento na quantidade de muco nas co-culturas causado pela sua exposição a um conteúdo ácido mascare o efeito do pH no transporte de F.

Quanto aos ácidos biliares, os autores demonstraram que estes também influenciam a absorção de F, pois na presença do ácido taurocólico foi observado um aumento no transporte de F, até mesmo na co-cultura (Caco-2/HT29-MTX), especialmente pela redução da resistência elétrica transepitelial, pois o ácido abre as junções celulares, facilitando a passagem de F, uma vez que a via paracelular é a mais importante para a absorção do F.

Rocha, Vélez e Devesa (2012) ainda lembraram que outros fatores extrínsecos podem afetar a absorção de F, como a presença de certos componentes da dieta, que se ligam ao F e formam compostos insolúveis; a modulação das junções celulares; e a competição de um transportador em particular. Os pesquisadores afirmam que quando o F está inserido na dieta, existe uma menor absorção, e que alguns alimentos aumentam a resistência transepitelial por aumentar, por exemplo, a expressão de proteínas que formam as *tight junctions*. Dado que a maior parte da absorção do F ocorre pela via paracelular, quaisquer alterações nas junções celulares podem comprometer esta via, e consequentemente a absorção do F.

Dando sequência a estes importantes estudos, em 2013, os mesmos autores utilizaram novamente a linhagem de células humanas Caco-2 como modelo do epitélio intestinal, para avaliação da captação de F tanto no sentido apical-basal quanto basal-apical das células, sendo o apical aquele que estaria voltado para o lúmen, enquanto o basal é a face oposta (Rocha, Devesa e Vélez, 2013). O lado em que era aplicado o F, foi chamado de lado doador; e o lado do qual era retirada amostra para verificar a concentração de F após os experimentos foi chamado de receptor.

Inicialmente, foi observado que o transporte de F aumenta através das células Caco-2 a medida que aumenta a concentração de F, sendo descrito que pode não existir ou se

existir, ocorrerá uma pequena participação de um componente de saturação, no qual a partir daquela concentração não aumenta a quantidade de F transportado. Foi descrito ainda, que a porção de F que realmente é transportada para o interior das células é muito baixa, não ultrapassando 1% do F inicialmente adicionado. Junte-se a isto, a acumulação celular do F aumenta linearmente até 30 minutos, e depois desse tempo existe uma diminuição gradual na retenção celular até 48 horas após a adição do F. Estes dados confirmam que a maior parte do transporte de F ocorre pela via paracelular, ou seja, pela junção entre as células.

Neste estudo (Rocha, Devesa e Vélez, 2013), novamente foi avaliado o efeito do pH, e confirmou-se que um pH ácido na porção apical das células aumenta o transporte de F através da monocamada celular. Interessantemente, os autores também avaliaram o mecanismo de transporte de F na direção basal-apical, dado que havia apenas uma camada de células e podiam acessar os dois lados; e verificaram que o transporte de F aumenta significativamente quando o meio doador apresenta um pH mais ácido que o meio receptor. Também foi verificado que quando o meio doador apresenta um pH mais ácido, a concentração intracelular de F aumenta, confirmando a dependência do pH para o transporte de intracelular de F.

Os autores também ressaltam que compostos hidrofílicos de baixo peso molecular como o F, são transportados pelo epitélio intestinal, especialmente através da via paracelular. Portanto, ao utilizar uma substância que “abre” as junções celulares é possível avaliar quanto do transporte é realizado por esta via. Com este objetivo, os autores utilizaram o EDTA que “abre” as junções celulares, pois funciona como um quelante de íons Ca^{2+} , sendo que a diminuição nos íons Ca^{2+} modula a integridade das junções. Após a aplicação do EDTA, confirmou-se que com a abertura das junções celulares também ocorreu um grande aumento da permeabilidade do F, confirmando que a via paracelular é importante para o transporte do F.

Rocha, Devesa e Vélez (2013) ainda avaliaram o efeito da temperatura sobre o transporte de F, dado que a diminuição da temperatura gera uma redução no metabolismo celular, agindo como um inibidor de mecanismos de transporte dependentes de energia. Entretanto, ao se comparar o transporte de F entre as temperaturas de 4 °C e 37° C, no sentido apical-basal, não foi observada uma diminuição na permeabilidade aparente do F. Portanto, concluiu-se que o transporte de F não é dependente de energia.

Quanto ao mecanismo de transporte de F utilizar o mesmo mecanismo do Cl^- , observou-se que na presença de Cl^- existe uma diminuição significativa na permeabilidade do

F, assim com também ocorria um aumento da acumulação de F no interior das células na ausência de Cl^- no meio. Confirmou-se também, que o transporte de F não é afetado por um gradiente de hidroxila (OH^-), sendo observado que a presença de um gradiente de OH^- favoreceu o acúmulo intracelular de F.

Alguns trabalhos também verificaram a absorção de F a partir de produtos odontológicos. Whitford em 1990 faz uma grande revisão dos mecanismos utilizados na absorção do monofluorofosfato de sódio (MFP), o qual é o ingrediente ativo de muitos dentifrícios, sendo considerado pelo autor como a maior fonte de ingestão de F em crianças. Whitford descreve que o F presente no MFP não é iônico e se liga de forma covalente ao fósforo. Dessa forma, a absorção de F a partir do MFP só é possível após a ação de fosfatases, portanto sua absorção é mais lenta do que a do F proveniente do NaF. Entretanto, deve-se considerar que o estômago apresenta uma considerável quantidade de fosfatase alcalina, o que facilitaria a absorção do F a partir do MFP neste sítio.

Whitford, na tentativa de verificar se a absorção de MFP pelo estômago era acelerada pela fosfatase alcalina presente, realizou um estudo em ratos (Whitford, 1990). Neste trabalho utilizou a cimetidina, a qual inibe a secreção ácida gástrica, para verificar se a absorção do MFP era dependente do pH como ocorre com o NaF. Este estudo foi bastante interessante, pois o autor acreditava inicialmente que o MFP poderia ser um substituto do NaF para o tratamento da osteoporose, a qual afeta nos EUA em torno de 16 milhões de pessoas. Foi comparada então, a absorção de MFP com a de NaF, utilizando ou não a cimetidina, e esperava-se que nos grupos com pré-tratamento com a cimetidina, a absorção de F a partir de NaF fosse retardada, porém pouco efeito era esperado para o MFP. Nos grupos controle, sem cimetidina, observou-se que a absorção do MFP ocorre mais lentamente do que a do NaF, o que resulta em um pico plasmático mais baixo e demorado. Com a utilização da cimetidina, ao se inibir a secreção ácida, houve um aumento da absorção de MFP, verificado através dos níveis plasmáticos de F, e observou-se que a concentração plasmática de F a partir do MFP, com a utilização da cimetidina, foi a mesma do grupo que recebeu NaF.

Whitford descreveu que o aumento da absorção do MFP com a utilização da cimetidina foi provocado por uma ativação da fosfatase alcalina como resultado da inibição da secreção ácida. Como inicialmente o trabalho havia sido desenvolvido para que o MFP pudesse servir como uma alternativa no tratamento da osteoporose, após estes resultados ficou evidente que seu uso deverá ser muito bem avaliado com este propósito, pois como o

tratamento da osteoporose acomete mais idosos, e estes apresentam uma redução da secreção ácida, provavelmente o MFP poderia ser ainda mais tóxico ao organismo desses indivíduos.

A ADA (2005) determina que 80% da quantidade de F contida no rótulo do dentifrício deva ser liberada pela fórmula dentro de 1 minuto após a homogeneização na cavidade bucal, sendo a diluição em água na proporção de 1:3. Na revisão sistemática realizada por Buzalaf *et al.* (2013), foram avaliados os resultados descritos na literatura sobre a efetividade dos dentifrícios de baixa concentração de F no controle da cárie dentária, e seu potencial para o desenvolvimento da fluorose. Nesta revisão, foi observado que em áreas nas quais a população não ingere água fluoretada ou em que a água é fluoretada, mas não existe um controle da concentração de F e o uso de dentifrícios com baixa concentração de F não protege as crianças em idade pré-escolar do desenvolvimento da fluorose nos dentes permanentes anteriores, desde a forma moderada até a severa, assim como também aumenta o risco do desenvolvimento da cárie dentária na dentição decídua.

Desta forma, pelo fato do trabalho publicado por Buzalaf *et al.* (2013) ser uma revisão sistemática, apresentando dados de vários pesquisadores, ficou evidente que mesmo que exista um risco iminente na infância do desenvolvimento da fluorose dentária, independentemente da fluoretação da água, torna-se claro também o efeito benéfico da utilização do dentifrício fluoretado, especialmente na concentração padrão (1000 a 1500 ppm F), para que a cárie dentária não se desenvolva. Buzalaf *et al.* (2013) porém ressaltam que a quantidade de dentifrício utilizada em cada escovação deve ser controlada, tanto no que diz respeito ao desenvolvimento da cárie quanto da fluorose.

Cury *et al.* (2005), avaliaram a quantidade de F que é ingerida com a escovação utilizando dentifrícios de 0 µg F/g, 550 µg F/g e 1100 µg F/g; através da urina e saliva de voluntários, com amostras coletadas em diferentes períodos. Neste estudo, uma dose de 45 mg de dentifrício/kg era preparada em 10 mL de água deionizada, e esta solução era ingerida pelos voluntários, em jejum ou 15 minutos após uma refeição. Este cálculo da ingestão de F era feito baseado na ingestão que ocorre por uma criança pesando em torno de 13,5 kg ao escovar os dentes 2 vezes ao dia, ingerindo 0,3 g de dentifrício à cada escovação.

A concentração de F na saliva foi avaliada até 3 horas após a ingestão do dentifrício, e a urina forneceu a quantidade de F absorvido, sendo esta a diferença entre o F ingerido e o excretado. Neste trabalho, verificou-se que o dentifrício convencional com 1100 µg F/g ao ser utilizado após o almoço apresentou uma absorção apenas 10% maior quando comparado ao dentifrício com 550 µg F/g que foi ingerido em jejum. Dessa forma, o hábito de

escovar os dentes logo após as refeições diminuiria o risco do desenvolvimento da fluorose dentária, e fatores como a quantidade de dentifrício usada, o período em que é realizada a escovação, hábitos alimentares e a duração da escovação também interferem no processo de absorção (Cury *et al.*, 2005).

Outro produto bastante utilizado na prática clínica odontológica, o flúor acidulado, ao ser aplicado em gel ou solução a 1,23% F (12300 ppm F), causou, principalmente em crianças, sintomas como náuseas, vômitos, dores abdominais e hipersalivação; devido à sua deglutição, principalmente quando não há a sucção permanente e adequada do produto durante a sua aplicação (Valsecki Jr e Vertuan, 1999). Embora, estes sintomas tenham sido descritos, os autores acreditam que um procedimento importante e simples, que pode ser utilizado para evitar a toxicidade do F aplicado na prática clínica, deve ser a expectoração dos resíduos bucais do produto logo após a sua aplicação.

Outra sugestão de Valsecki Jr e Vertuan (1999) para a aplicação deste produto em crianças foi a realização do procedimento após as refeições, para diminuir a sua absorção pelo TGI e dessa forma diminuir a sua toxicidade. Embora, no caso deste estudo realizado com 422 crianças, a aplicação de F seja anual e apenas 2 a 3 % das crianças apresentam os efeitos tóxicos da ingestão do F aplicado topicamente, acredita-se que em 19% das crianças houve a ingestão de F. Dessa forma as medidas preventivas descritas pelos autores devem ser consideradas.

Outros trabalhos também descrevem os efeitos da toxicidade aguda do F sobre o TGI. Ao avaliar os 87 casos da ingestão de F por crianças, sendo 1 caso fatal com a ingestão de F presente em um inseticida; 84 casos a partir da ingestão acidental de produtos odontológicos em ambiente doméstico; e 2 em decorrência de atendimento odontológico profissional; foram relatados sintomas gastrointestinais em 30% dos casos (Augenstein *et al.*, 1991). Nestes casos foram ingeridas doses de até 8,4 mg F/Kg, sendo que em 86% dos casos estes sintomas ocorreram em 1 hora.

Whitford (1994) afirma que, após a ingestão, os níveis plasmáticos atingem o pico dentro de 20-60 minutos, porém essa concentração máxima depende da quantidade de alimento ingerido, da taxa de absorção, do volume da distribuição e do *clearance* do F do plasma para os rins e para o esqueleto, os quais determinam também o rápido declínio das concentrações plasmáticas.

A intoxicação aguda do F envolve outros compostos como NaF (Akiniwa, 1997; Kumar, 2009); fluoracetato de sódio, um veneno rodenticida (Baselt, 2004); bifluoreto de

amônio, utilizado nas indústrias de vidro e porcelana (Martinez *et al.*, 2007); fluoreto sulfúrico, inseticida (Swanson, Filandrinos e Shevlin, 1993); ácido fluorídrico, contido em produtos para lavagem de automóveis (Genuino *et al.*, 2012); e os vários tipos de fluorsilicatos, como de sódio e magnésio, utilizados na construção civil (Pribilla, 1968).

O envenenamento agudo por F pode ocorrer através da inalação, contato com a pele ou ingestão acidental de ácido fluorídrico (HF) (Bost e Springfield, 1995; Muriale *et al.*, 1996; Takase *et al.*, 2004; Koschny *et al.*, 2013). Entre os principais sintomas do envenenamento agudo por F, somente a arritmia cardíaca e o coma não estão relacionados às disfunções no TGI, dentre as quais destacam-se: salivação, vômito, náusea, diarreia, dor abdominal e cólicas (Akiniwa, 1997).

Em outro estudo em que foram avaliados os efeitos de uma intoxicação aguda após infusão contendo F em cães e camundongos, observou-se: diminuição progressiva da pressão arterial e da frequência cardíaca e alterações no SNC, as quais resultaram em vômitos e diarreia com uma dose de 20mg/kg; e depressão da taxa respiratória levando a fibrilação quando a dose foi aumentada para 30mg/kg (Leone, Geever e Moran, 1956).

Trabalhos mais antigos, já apresentavam uma estimativa da dose letal em humanos, e os valores variaram de 6-9 mg F/Kg (Dreisbach, 1980) a valores de até 100 mg F/Kg (Lidbeck, Hill e Beeman, 1943). Obviamente vários fatores devem ser levados em consideração para que ocorra a intoxicação, como a quantidade ingerida, se ocorreu vômito logo após a ingestão, assim como o conteúdo gástrico antes da ingestão da alta dose de F, sendo considerado para adultos com peso em torno de 70 kg a dose letal em torno de 5 a 10 g, o que corresponde a uma dose de 32 a 64 mg F/Kg (Whitford, Allmann e Shahed, 1987).

Embora na maioria dos estudos essa dose seja avaliada em animais, o estabelecimento desta dose letal ou da dose tóxica provável é bastante importante, especialmente em crianças, pois estes são os mais expostos ao F, dado que podem acidentalmente ingerir maiores quantidades (Whitford, 1990). A Dose tóxica provável é considerada a mínima dose capaz de causar sinais e sintomas de toxicidade, ou até mesmo a morte; para os quais é necessária hospitalização para uma intervenção terapêutica imediata (Whitford, Allmann e Shahed, 1987).

De uma maneira geral, o valor da dose aguda tóxica de F é de 2 mg F/Kg (Baldwin, 1899), porém ainda existe um certo desacordo entre os valores desta dose. No Japão, por exemplo, este valor varia de 2 a 5 mg F/Kg, em outros países pode chegar até a 8 (Whitford, 1987). Nos EUA, doses entre 0,1 a 0,8 mg F/Kg já foram observadas em casos de

intoxicação a partir da água de abastecimento e da ingestão accidental de produtos contendo F (Akiniwa, 1997). Whitford e Pashley (1984) definiram a dose de 5 mg F/Kg como a dose tóxica provável, sendo esta capaz de causar efeitos tóxicos que podem variar entre os primeiros sintomas do TGI até a morte, mas não afirmou que doses abaixo de 5 mg F/Kg não sejam tóxicas.

No trabalho de Augenstein *et al.* (1991), ainda são descritos outros casos fatais da toxicidade de F, envolvendo a ingestão de pesticidas, sabão em pó contendo fluoreto de silício e até mesmo a intoxicação de pacientes submetidos à hemodiálise com água contendo excesso de F. Os autores também ressaltaram as principais características da toxicidade do F, como a sua ação corrosiva sobre o TGI, afinidade pelos íons cálcio e inibição da atividade de algumas enzimas como a colinesterase.

É importante descrever o famoso caso da ingestão accidental de NaF no Hospital Estadual do Oregon, na cidade de Salem, em que de um total de 263 pacientes, 47 foram vítimas fatais. Neste caso, um funcionário confundiu-se e utilizou o NaF ao invés de leite em pó, devido à colocação branca do NaF, e serviu como bebida para pacientes de algumas alas do hospital (Lidbeck, Hill e Beeman, 1943). Felizmente, neste caso, muitos pacientes rejeitaram o alimento inicialmente, por considerar o sabor desagradável. De acordo com o próprio hospital, dentre os pacientes que se alimentaram, a maioria apresentou abruptamente os sinais gastrointestinais de náusea, vômito e diarreia, sendo o vômito com sangue; cólicas e queimação na região do abdômen. Em seguida a estes sintomas, foi observado um colapso generalizado, com palidez, fraqueza, ausência de pulsação, dificuldade respiratória, arritmia cardíaca e cianose. Na maioria dos casos a morte ocorreu entre 2 a 4 horas após a ingestão.

Dado a existência destes casos graves de intoxicação aguda, alguns pesquisadores sugerem a utilização de compostos como o sulfato de alumínio e bóro para a eliminação e diminuição da absorção de F, porém esses agentes não são indicados para uso prolongado, pois também podem produzir efeitos tóxicos, ressaltando a necessidade de encontrar um novo agente não tóxico que reduza os efeitos do F (Dey *et al.*, 2011).

A toxicidade do F envolve amplamente a questão da sua biodisponibilidade, caracterizada como a quantidade de F que atinge a circulação após a ingestão, e produz atividade biológica (Rocha, Devesa e Vélez, 2013). Vários trabalhos confirmam a importância da absorção do F pelo TGI, a qual ocorre, na sua maior parte, pelo intestino delgado. Como a absorção intestinal apresenta um papel importante na avaliação do risco associado com a ingestão de F, é necessário o esclarecimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

Dessa forma, estudos envolvendo a absorção intestinal são considerados fundamentais para a compreensão da toxicidade do F. Da mesma maneira, com nosso estudo, também pretendemos oferecer dados que permitam esclarecer este mecanismo de absorção, assim como também oferecer informações diferenciadas a respeito de como o TGI pode ser comprometido pelo F.

2.3. Morfologia intestinal e os efeitos do F

Mesmo a partir de pequenas quantidades de F, o HF pode ser formado em quantidade suficiente para causar dor extremamente severa; e ulcerações no estômago e nas porções proximais do intestino delgado; sendo estas lesões raramente vistas no cólon, onde o conteúdo intestinal já se apresenta bastante alcalino (Susheela e Das, 1988).

Este efeito corrosivo do HF sobre a mucosa do estômago (Augenstein *et al.*, 1991), causa grave dor abdominal após sua ingestão, sendo que doses de 0,5 a 0,8 g de NaF iniciam os sintomas de cólica, vômito e diarreia (Saady e Rose, 1988). Os mesmos sintomas foram descritos por 26% dos indivíduos avaliados por Susheela *et al.* (1993), que avaliaram 1958 moradores em 4 diferentes vilarejos da Índia. Neste trabalho foram analisadas 78 fontes de água, sendo que 20 foram consideradas “seguras” (com até 1 ppm F) e as outras 58 foram chamadas de contaminadas, porém a contaminação com F era proveniente de fontes naturais (Susheela *et al.*, 1993).

A exposição ao F induz consideráveis mudanças na defesa antioxidante e na morfologia do intestino do rato, o que pode afetar suas funções (Chauhan, Mahmood e Ojha, 2013). No que diz respeito à toxicidade do F sobre o TGI, seus efeitos são devidos especialmente à forma não ionizada (HF) e suas propriedades corrosivas causam inflamação, ulceração e outras anormalidades no estômago e intestino delgado especialmente na sua porção proximal, onde se verifica um grande dano à mucosa como perda das microvilosidades (Sharma, Sohu e Jain, 2009).

Das *et al.* (1994), ao avaliar cortes histológicos da mucosa gástrica e duodenal de pacientes em tratamento da otosclerose, uma patologia onde é verificada uma deformidade óssea na cápsula labiríntica, que receberam doses de NaF de 30 mg/dia durante 3 meses, verificaram que a mucosa gástrica dos pacientes apresentou sinais evidentes de gastrite atrófica; enquanto a mucosa duodenal apresentou sinais de inflamação. Ao utilizar microscopia eletrônica, tanto a mucosa gástrica quanto a duodenal apresentaram uma superfície lisa, quase sem microvilosidades, um aspecto de “barro rachado” e abrasão. Nestes

pacientes a toxicidade do F também pode ser verificada através da análise dos níveis de F presentes no sangue e urina; nos quais todos que estavam recebendo F apresentaram elevados níveis séricos e urinários de F.

Outros importantes sintomas do TGI também são descritos em seres humanos como gastrite, intestino espástico, vômito hemorrágico, dor epigástrica severa, dor abdominal, distensão abdominal, sendo que os distúrbios gástricos foram atribuídos à ação do F na mucosa gástrica, como descrito anteriormente (Waldbott e Lee, 1978a; Whitford e Pashley, 1984). Úlceras gástricas também foram observadas em pacientes com fluorose esquelética adquirida devido à inalação de anestésicos organoflorados (Klemmer e Hadler, 1978).

Muitos trabalhos descrevem especialmente os efeitos da exposição experimental crônica e aguda de F em animais e seres humanos, mostrando que o NaF causa extenso dano gastroduodenal na forma de erosão, eritema, petéquias, denudação da mucosa, e degeneração das células epiteliais (Waldbott, 1977; Susheela e Das, 1988; Susheela *et al.*, 1992; Sondhi, Gupta e Gupta, 1995; Shashi, 1999). Muitos autores atribuíram a mudança estrutural à rápida penetração do HF através das membranas celulares, o que consideraram uma importante explicação para a ulceração da mucosa gastroduodenal observada em coelhos.

Neste estudo de Shashi (2002) foram utilizadas diferentes doses de NaF em coelhos, e os efeitos se agravavam com o aumento das doses. O grupo que recebeu a dose de 5 mgF/Kg/dia apresentou necrose da mucosa duodenal e submucosa frouxa; pontos difusos de hemorragia na mucosa; e musculatura lisa do duodeno com atrofia. Com a dose de 10 mg F/Kg/dia, foi observada corrosão da mucosa; submucosa frouxa; pontos difusos de hemorragia na mucosa; e musculatura lisa do duodeno com hipertrofia. Para o grupo que recebeu 20 mg NaF/Kg/dia, o duodeno apresentou hemorragia e necrose nas células das pregas intestinais; perda da superfície mucosa; vacuolização; núcleos picnóticos; necrose das glândulas de Brunner; mucosa frouxa e hipertrofia dos músculos da muscular da mucosa.

No grupo que recebeu 50 mg NaF/Kg/dia, o exame histopatológico do duodeno mostrou a musculatura hipertrofiada na camada muscular da mucosa; perda da superfície mucosa e necrose das glândulas de Brunner. O interior das glândulas apresentou-se aumentado devido à desintegração das células. Também foi observada necrose da superfície mucosa, desintegração do epitélio colunar das pregas intestinais e submucosa frouxa.

Neste estudo foi ainda observado um grande número de pequenas erosões que se estendiam até um terço da profundidade total da mucosa gastroduodenal, sendo estas lesões confluentes e correspondentes a uma perda de quase toda a mucosa gastroduodenal (Shashi,

2002). Os resultados de (Shashi, 2002) sobre os efeitos danosos do F na mucosa gastroduodenal de coelhos, apresentaram concordância com os observados por Susheela e Das (1988) que realizaram um período de exposição com 10mg NaF/Kg/dia por 24 meses e observaram alterações na morfologia duodenal como abrasão e degeneração celular da mucosa. Estes autores também observaram grave dano à mucosa gástrica causada pela ação tóxica do F, e suas propriedades corrosivas que resultaram em sintomas dispépticos (Susheela *et al.*, 1992).

Outro estudo em coelhos também apresentou outras fontes de F, como o fluoreto de silício (SiF₄), como tóxico ao TGI, causando moderada frouxidão da mucosa gástrica e do duodeno; e zonas com corrosão e petéquias hemorrágicas no intestino delgado (Pribilla, 1968).

A toxicidade no TGI de ratos expostos a uma dose de 100 ppm F na água de beber também foi verificada, com o intestino delgado apresentando características de degranulação citoplasmática e vacuolização nas células da cripta, degeneração hidrópica na lâmina própria e no tecido muscular, aumento no número de células de Globet, vilos danificados e picnose nuclear (Sondhi, Gupta e Gupta, 1995).

Neste nosso estudo, também avaliamos a existência de alterações na espessura da parede intestinal com o objetivo de oferecer mais um dado importante a respeito dos efeitos do F no TGI. Na área clínica, a avaliação da espessura da parede intestinal é considerada um parâmetro importante e dependendo da sua extensão pode ser relacionada a causas malignas ou benignas (Fernandes *et al.*, 2014). É descrito que patologias no cólon, por exemplo, podem resultar em espessamento das suas paredes, o que pode ser observado em pacientes através de imagens de tomografia computadorizada (Wiesner *et al.*, 2002). Quando um espessamento é identificado na técnica tomográfica, várias imagens são realizadas com o objetivo de promover o diagnóstico diferencial, sendo nestas imagens analisados fatores como extensão do espessamento, grau do espessamento, simetria ou assimetria, entre outros (Macari, Megibow e Balthazar, 2007). De acordo com Fernandes *et al.* (2014), cada uma dessas características pode ter uma significância, a qual é associada aos sintomas apresentados pelo paciente. Dessa forma, esta análise oferece um dado importante sobre a morfologia do intestino, que juntamente com as outras análises realizadas neste estudo visa colaborar com os esclarecimentos a respeito da toxicidade do F sobre o TGI.

Por todos estes dados, é evidente que o F pode alterar a morfologia intestinal, causando danos às suas estruturas, tanto após a exposição crônica quanto aguda. Dessa forma, informações a respeito de como estas estruturas podem ser comprometidas, como as que pretendemos oferecer com nosso estudo, podem ser valiosas não somente para caracterizar o processo da toxicidade do F, como também para identificar importantes vias que levam a estes efeitos.

2.4. Neurotoxicidade do F

Indiscutivelmente, a fluoretação da água é uma importante medida de saúde pública devido à necessidade da manutenção de pequenas quantidades de F na cavidade bucal para o efetivo controle da cárie dentária, evidenciando o papel do F no processo de remineralização das estruturas dentárias atingidas pelos ácidos, os quais causam a perda mineral durante o desenvolvimento de uma lesão cariosa (Ramires *et al.*, 2006). Entretanto, a ingestão excessiva de F, pode levar ao desenvolvimento da fluorose dentária, sendo esta uma importante doença, que afeta vários países no mundo como a Índia, China e México, nos quais a água contém um excesso de F naturalmente (Pendrys, 2001).

Nas áreas endêmicas para a fluorose, não somente um comprometimento da estrutura dentária e esquelética é verificado, como também são relatados sintomas como dores de cabeça, seguida de letargia e insônia, os quais acredita-se que sejam causados pela exposição à elevada quantidade de F na água de beber (Sharma, Sohu e Jain, 2009).

É relatado que altos níveis de F na água de beber afetam primeiramente o SNC, antes mesmo de causar as deformações físicas observadas em consequência da fluorose esquelética (Mullenix *et al.*, 1995). Alguns pesquisadores confirmam que a capacidade mental de adultos que apresentam fluorose crônica e o quociente de inteligência (QI) de crianças nascidas e criadas em áreas de fluorose endêmica encontram-se abaixo do normal (Zhao *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2000; Xiang, Q. *et al.*, 2003; Trivedi *et al.*, 2007), sendo estes dados compatíveis com estudos realizados em animais (Niu *et al.*; Wu *et al.*, 2006).

Além da diminuição de QI, outras desordens neurológicas são descritas em áreas em que existe um excesso de F na água, tais como distúrbios cognitivos e da memória; assim como redução da capacidade de aprendizado (Zhao *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2000; Xiang, Q. *et al.*, 2003; Nabavi *et al.*, 2012).

Concentrações de F já foram detectadas em tecidos cerebrais, e também são correlacionadas com extensos danos no cérebro, medula espinal e nervo isquiático de ratos

levando tanto às disfunções cerebrais quanto às paralisias motoras (Reddy, Reddy e Kumar, 2011). Estes autores também observaram alterações intracelulares e estruturais em neurônios, como na morfologia mitocondrial e da membrana nuclear de neurônios do cerebelo; segmentação na bainha de mielina, vacuolização mitocondrial e diminuição da espessura da bainha de mielina em neurônios do neocórtex cerebral.

Após a ingestão excessiva de água fluoretada, não somente a estrutura, mas também a função do SNC é afetada, uma vez que existe um comprometimento significativo da capacidade de aprendizado e da memória, evidenciado em ratos; sendo em seres humanos verificada uma coordenação motora reduzida e sintomas relacionados ao comportamento como nervosismo, depressão, formigamento nas mãos e nos pés, sede excessiva e um aumento da frequência urinária (Bhatnagar *et al.*, 2006).

A neurotoxicidade do F sobre o SNC também pode ser comprovada pelo aumento na concentração de F no líquido cérebrospinal de pacientes com fluorose (Hu e Wu, 1988). Dessa maneira, o fato de atravessar a barreira hemato-encefálica também aumenta a possibilidade de que o F possa afetar as estruturas e funções do SNC e SNP.

Estudos realizados em humanos, ratos e camundongos também confirmam que a exposição à altas doses de F resulta em degeneração da estrutura do neurônio, e em um aumento da apoptose neuronal (Sesikeran *et al.*, 1994; Trabelsi, Guermazi e Zeghal, 2001; Ge *et al.*, 2006). No SNP, foi observada uma redução significativa da mielina das fibras nervosas (Sesikeran *et al.*, 1994), vacuolização das células de Schwann e axônios dilatados, assim como interrupção da bainha de mielina no nervo isquiático (Reddy, Reddy e Kumar, 2011). Mudanças nos níveis de proteína e neurotransmissores e na atividade de algumas enzimas no cérebro também são descritas (Bhatnagar *et al.*, 2006).

Outros mecanismos celulares da toxicidade do F que também podem comprometer o sistema nervoso relacionam-se ao metabolismo do cálcio, dado que o F interfere neste processo; assim como também é um excelente inibidor enzimático, ativando tanto funções proteolíticas quanto glicolíticas, diminuindo a respiração celular, diminuindo o consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono na neurotransmissão muscular ao se ligar ao cálcio (Lech, 2011).

Outros estudos também confirmam os efeitos neurotóxicos em ratos (Varner *et al.*, 1998; Kaur, Bijarnia e Nehru, 2009), mesmo o rato sendo menos sensível que o homem (Roholm, 1937). Após um período de 6 semanas com o uso de uma dose de 100 ppm F foi observado em ratas adultas um aumento nos níveis de F no hipotálamo e uma alteração no

comportamento dos animais (Mullenix *et al.*, 1995). Estes pesquisadores descrevem que após a ingestão de F, a severidade do efeito no comportamento aumentou diretamente com o aumento dos níveis e concentrações de F em regiões específicas do cérebro de ratos, comprovando que o SNC é um alvo da toxicidade do F, tanto em período pré quanto pós-natal.

Adicionalmente, Mullenix *et al.* (1995) ainda relatam uma interrupção no desenvolvimento normal do cérebro em consequência da toxicidade do F, que resultam em repostas que são sexo-dependente, pois o cérebro responde de forma diferente à processos tóxicos nos quais os hormônios estão presentes em quantidades e períodos diferentes, sendo o déficit comportamental maior em fêmeas.

A hiperatividade e os déficits cognitivos são geralmente vinculados a danos no hipocampo (Delong, 1992), e de fato o hipocampo é considerado o processador central que integra as informações vindas do ambiente, memória e motivacionais para produzir as decisões (Hu e Wu, 1988). Especificamente no hipocampo, em decorrência da exposição ao F são observadas alterações como corpos celulares degenerados, vacuolização no citosol e nos axônios mielinizados; assim como alterações nas mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Reddy, Reddy e Kumar, 2011).

O F também pode causar no cérebro a inibição de algumas enzimas associadas ao metabolismo de radicais livres, produção e transferência de energia, transporte de membrana e transmissão sináptica (Vani e Reddy, 2000). Adicionalmente, alterações no conteúdo de neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina e serotonina também foram considerados como efeitos tóxicos do F no cérebro, cerebelo e bulbo (Kaur, Bijarnia e Nehru, 2009).

A capacidade do F de alterar a homeostase do sistema antioxidante de defesa no cérebro de ratos também já foi descrita (Bhatnagar *et al.*, 2006; Nabavi *et al.*, 2012), sendo que pode resultar em disfunções da neurotransmissão no cérebro (Bhatnagar *et al.*, 2006). Outros estudos também descrevem que a administração de altas doses de NaF pode induzir ao estresse oxidativo, pela evidência de níveis elevados da peroxidação lipídica e de NO nas hemácias, fígado, testículos e cérebro; assim como pela diminuição nos níveis de glutathione e da superóxido dismutase nos tecidos intoxicados (Hassan e Abdel-Aziz, 2010).

Também foi verificado que a ingestão excessiva de F, a partir do NaF na água de beber, reduz significativamente a atividade de enzimas neurotransmissoras, como a acetilcolinesterase no hipocampo, sendo esta diminuição associada à perda neuronal (Mullenix *et al.*, 1995; Bhatnagar *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2005), perda de estruturas sinápticas

(Chlubeck *et al.*, 1998) ou inibição da atividade enzimática (Zhao e Wa, 1998); contribuindo para o desenvolvimento das disfunções cognitivas verificadas em decorrência da toxicidade de F.

No SNC, a síntese proteica também pode ser prejudicada pelo F excessivo (Shivarajashankara *et al.*, 2002), comprometendo a formação das células piramidais e células granulares do giro dentado durante o período gestacional (Mullenix *et al.*, 1995). Da mesma forma, a toxicidade do F causa a inibição de outras enzimas que produzem energia celular no cérebro, incluindo enzimas que trabalham em nível mitocondrial, tanto na via glicolítica quanto no ciclo de Krebs, sendo demonstrado que o F inibe estas enzimas em animais que receberam a dose de 20 mg F/Kg expostos por apenas 14 dias (Vani e Reddy, 2000).

O cérebro em desenvolvimento, no período pós-nascimento, também pode ser afetado pelo F, uma vez que o F inibe a função da glândula tireóide, alterando o desenvolvimento do SNC, especificamente a estrutura do cerebelo durante a sua formação, eliminando a camada granular, sendo esta substituída por neurônios; desorganizando a estrutura cerebelar, comprometendo a sua maturação; fato que pode contribuir com a diminuição do aprendizado, bastante descrita em decorrência da toxicidade de F (Trabelsi, Guermazi e Zeghal, 2001).

Atualmente, até mesmo as interações entre o F e o alumínio (Al) tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois é conhecido que o Al está envolvido na etiopatologia da doença de Alzheimer (DA) (Gauthier *et al.*, 2000) e dentre seus efeitos neurotóxicos é descrito que o Al inibe a atividade da colina acetiltransferase, comprometendo o SNC; assim como também interfere com o metabolismo proteico intracelular (Devoto e Yokel, 1994).

A administração simultânea de F e Al na água de beber aumenta a concentração plasmática de Al, uma vez que existe uma alta afinidade entre os dois, assim como promove uma rápida absorção dos complexos formados por Al e F pelas células da mucosa (Spencer *et al.*, 1980; Allain, Gauchard e Krari, 1996). Adicionalmente, alterações morfológicas distintas no cérebro, em neurônios e na vascularização, são observadas em consequência da administração de fluoreto de alumínio (AlF₃) na água de beber (Isaacson, Varner e Jensen, 1997; Varner *et al.*, 1998), pois a combinação de F com inúmeros íons metálicos pode também inibir o efeito da atividade de algumas enzimas, como a colinesterase (Suarez, Quintana e Hernandez, 2008). Quando avaliada a administração crônica de AlF₃ ou NaF também observou-se um acúmulo de F no cérebro, com alterações na integridade neuronal

para ambas exposições, sendo o AlF_3 considerado mais neurotóxico que o NaF (Varner *et al.*, 1998).

Em suma, existe uma importante ligação entre a toxicidade do F e disfunções no SNC e SNP (Gao, Liu e Guana, 2009), especialmente porque o F compromete a estrutura e a função destes sistemas, o que pode ser comprovado pelas alterações observadas em regiões como o neocortex, hipocampo, cerebelo, medula espinal e nervo isquiático de animais de laboratório (Reddy, Reddy e Kumar, 2011); e comportamentais em seres humanos (Bhatnagar *et al.*, 2006).

Como muitos indivíduos ainda são expostos à altas concentrações de F em várias regiões do mundo, especialmente nas áreas endêmicas para a fluorose, acreditamos que a avaliação da neurotoxicidade do F merece maiores investigações, especialmente no caso do presente estudo, em que oferecemos informações a respeito dos efeitos do F sobre o SNE, sendo este um assunto ainda não explorado.

2.5. Sistema Nervoso Entérico (SNE)

Em meados do século XIX, foi alcançado um avanço científico notável, pela descoberta de uma complexa rede nervosa, com plexos, células e fibras nervosas presentes nos órgãos do TGI, denominado SNE (Costa, Furness e Llewellyn-Smith, 1987; Gershon, Kirchgessner e Wade, 1994; Furness *et al.*, 1998; Chiocchetti *et al.*, 2006). Este grande achado foi responsável por originar uma nova área de estudo, pesquisa e atuação clínica, a neurogastroenterologia.

O SNE apresenta uma complexidade e similaridade ao SNC, pela presença de um grande número de neurotransmissores e moléculas de sinalização; assim como de uma população de aproximadamente 10^8 neurônios (Grundy e Schemann, 2006), sendo este um número muito próximo ao encontrado na medula espinal (Lin *et al.*, 2002). Estas características valeram ao SNE a denominação de “Segundo Cérebro” (Gershon, 1998).

Formado por uma rede de pequenos gânglios e fibras nervosas conectadas, o SNE está incorporado na parede de todo o TGI, do esôfago até o esfíncter anal interno; sistema biliar e pâncreas (Furness e Costa, 1987). Aliado a isto, o SNE apresenta a habilidade única de mediar atividades reflexas locais, independentemente do SNC e de outras partes do SNP (Di Giancamillo *et al.*, 2010).

O TGI apresenta a importante função de suprir todo o organismo com os nutrientes necessários (Van Geldre e Lefebvre, 2004). Para controlar todas as suas múltiplas

funções, o SNE determina os padrões de motilidade do TGI, controla a secreção ácida, regula o movimento de fluidos através do epitélio, assim como interage com os sistemas imune e endócrino local (Furness, J.B., 2006). Adicionalmente, o SNE é responsável pela comunicação entre o TGI e os gânglios simpáticos; e também com o SNC (Gershon, 1981; Costa, Furness e Llewellyn-Smith, 1987; Furness e Bornstein, 1994). O SNE também contribui, juntamente com as células da glia, para a manutenção da integridade da barreira epitelial entre o lúmen e células/tecidos dentro da parede intestinal (Toumi *et al.*, 2003; Savidge *et al.*, 2007). Dessa forma, o SNE apresenta um papel central no controle das funções do TGI, tanto em seu estado normal quanto alterado em decorrência de alguma patologia (Baudry *et al.*, 2012).

Este extenso sistema intrínseco, denominado SNE, é organizado em duas grandes redes ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso; e também em vários plexos aganglionares (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009). O plexo mioentérico está principalmente envolvido no controle da motilidade do TGI, enquanto o submucoso está envolvido no controle da secreção, absorção e fluxo sanguíneo (Furness e Costa, 1987).

Mesmo que faça parte do SNP, o SNE é único pelas suas características (Gershon, 1981). Ao contrário dos gânglios periféricos, os gânglios mioentéricos recebem suporte da glia entérica e não das células neurolemas ou de Schwann; sendo na realidade a estrutura do SNE mais parecida com o SNC do que com o SNP (Fekete *et al.*, 1996; Fekete, Bagyanszki e Resh, 2000). Adicionalmente, a diversidade fenotípica de seus componentes, especialmente de seus neurônios, transcende a encontrada em outros gânglios do SNP, incluindo várias classes de neurotransmissores encontrados no SNC (Fekete, Bagyanszki e Resh, 2000).

A parede do intestino delgado é caracterizada histologicamente, por uma sequência de camadas: a mais externa é a túnica serosa ou adventícia; seguindo em direção ao lúmen, está presente a tela subserosa; a túnica muscular, dividida em camada muscular longitudinal e camada muscular circular; a tela submucosa; a lâmina muscular da mucosa e a túnica mucosa (Junqueira e Carneiro, 2013). No intestino delgado, o plexo mioentérico está presente entre as camadas musculares longitudinal e circular, enquanto o plexo submucoso localiza-se na tela submucosa (Furness e Costa, 1987; Furness, J.B., 2006). Os corpos celulares dos neurônios do plexo mioentérico recebem informação do SNA e a transmitem a outros neurônios do plexo mioentérico nas camadas da musculatura lisa adjacentes, ao plexo submucoso e à mucosa; enquanto os corpos celulares do plexo submucoso se projetam

principalmente à muscular da mucosa e às células da mucosa presentes nas glândulas e vilos (Mcdonald *et al.*, 1990).

O TGI também recebe uma dupla inervação de fibras primárias aferentes extrínsecas (Sharkey, 1992). A inervação extrínseca é derivada do sistema nervoso parassimpático através dos nervos vago e da inervação sacral; e também do sistema simpático por meio dos nervos esplâncnicos abdominopélvicos dos segmentos medulares T5-L2 ou L3, até alcançarem os gânglios pré-vertebrais da cavidade abdominal (celíaco, mesentérico superior e mesentérico inferior) (Timmermans *et al.*, 1994; Furness, 2000; Timmermans, Hens e Adriaensen, 2001). As fibras aferentes vagais, pré-ganglionares, terminam no plexo mioentérico (Berthoud, Jedrzejewska e Powley, 1990), e fibras espinais (nervos esplâncnicos abdominopélvicos) terminam nos plexos mioentérico, submucoso e ao redor de vasos sanguíneos na submucosa (Dockray e Sharkey, 1986).

O SNE é o principal responsável pela função do TGI, controlando as funções do intestino de uma maneira autônoma ao SNC (Bayliss e Starling, 1899), e mediando à atividade reflexa na ausência de estímulo cerebral ou da medula espinal, devido à presença de circuitos motores constituídos de neurônios sensoriais, neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs), interneurônios e neurônios motores inibitórios e excitatórios (Costa, Furness e Llewellyn-Smith, 1987; Costa, Brookes e Hennig, 2000; Furness, 2000).

Os neurônios entéricos apresentam inúmeros tipos de conexões que permitem a realização das suas funções. Os IPANs apresentam longos processos com pelo menos uma projeção em direção à mucosa, enquanto as outras projeções permitem que façam sinapse com outros neurônios (Furness e Costa, 1987). As suas projeções na mucosa permitem que respondam ao conteúdo do lúmen, seja pela estimulação química ou pela deformação da mucosa; promovam a contração ou relaxamento da musculatura lisa; ou ativam outros tipos de neurônios no plexo mioentérico, especialmente por possuírem terminais varicosos ao redor dos corpos celulares nos próprios gânglios e em gânglios adjacentes (Chambers, Thomas e Bornstein, 2014). Interneurônios ascendentes se projetam em direção oral através do plexo mioentérico, estabelecendo sinapses com outros interneurônios ascendentes e também com interneurônios descendentes (Furness e Costa, 1987; Chambers, Thomas e Bornstein, 2014).

Diferentes tipos neuronais são encontrados no SNE, sendo denominados subpopulações, as quais são analisadas através da identificação de características específicas como morfologia e comportamento eletrofisiológico (Lin *et al.*, 2002), combinando vários métodos neurocientíficos (Furness e Costa, 1987; Costa *et al.*, 1996). Para entender como o

SNE opera, é necessário identificar as diferentes classes funcionais de neurônios entéricos, sendo que uma maneira de caracterizá-los é determinar as combinações de algumas substâncias neuroquímicas, como seus neurotransmissores, neuropeptídeos e enzimas (Uytenbroek *et al.*, 2010). Em um mesmo neurônio podem ser co-localizados até 6 diferentes tipos de neuropeptídios (Lundy e Linden, 2004).

A identificação dos tipos neuronais baseada nos seus neurotransmissores e neuropeptídios no SNE é denominada “código químico” (Costa, Furness e Gibbins, 1986), o qual tem sido amplamente estudado em várias espécies de mamíferos, sendo que o conhecimento mais detalhado de várias subpopulações de neurônios entéricos foi determinado em porcos da Guiné, sendo identificadas nestes animais encontradas 14 classes de neurônios entéricos (Furness, 2000; Lomax e Furness, 2000; Brookes, 2001; Furness, J.B., 2006).

O SNE pode responder a estímulos prejudiciais mecânicos e biológicos, como atrofia e inflamação (Ekblad e Bauer, 2004); ou se adaptar às alterações desfavoráveis no microambiente do TGI devido à sua capacidade de mudar até mesmo o seu conteúdo de neurotransmissores ou neuropeptídios, sendo esta característica denominada neuroplasticidade (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009).

Em neurônios entéricos, alterações em sua estrutura, função ou composição química em resposta a diferentes tipos de estímulos, tem como objetivo manter a homeostase no TGI (Giaroni *et al.*, 1999; Lomax, Fernández e Sharkey, 2005; Lomax *et al.*, 2006). A neuroplasticidade é verificada diante de processos fisiológicos, como o envelhecimento; assim como em decorrência de um grande número de condições patológicas que variam desde neuropatias entéricas como a doença de Hirschsprung; doenças intestinais como a colite ulcerativa e a doença de Crohn; ou doenças de comprometimento sistêmico, como o Mal de Parkinson e diabetes (Giaroni *et al.*, 1999; Hermes-Uliana *et al.*, 2014).

A capacidade do SNE de passar por alterações adaptativas ou reparadoras, se dá como uma tentativa endógena não somente de restabelecer a atividade intestinal, mas também de combater os sintomas apresentados (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009). Porém, como muitas das funções do TGI estão sujeitas à regulação realizada pelo SNE e suas conexões extrínsecas (Lomax *et al.*, 2006), a resposta do SNE aos estímulos danosos, pode também resultar na disfunção de seus neurônios, e causar alterações em mecanismos como a secreção e a motilidade, conduzindo, por exemplo, à síndromes como a disfagia, doença do refluxo gastroesofágico, problemas no esvaziamento do estômago, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal (Wade e Cowen, 2004; Brierley e Linden, 2014).

O microambiente do TGI, e consequentemente a função de seus neurônios entéricos também podem ser modulados por fatores como o estresse, sistema imune, alteração na microbiota, macronutrientes, padrão de alimentação, ciclo circadiano, e até mesmo pela própria glia entérica (Brierley e Linden, 2014). Portanto, como o SNE é exposto a uma grande variedade de estímulos químicos e mecânicos, assim como a organismos estranhos, a questão da plasticidade e da regeneração dos neurônios entéricos é altamente relevante (Hanani *et al.*, 2003).

Os mecanismos de degeneração das neuropatias entéricas são caracterizados basicamente pelo dano ou perda de neurônios entéricos, que contribuem com a patogênese de importantes doenças gastrointestinais como a acalásia, gastroparesia idiopática, estenose pilórica hipertrófica congênita, pseudo-obstrução intestinal crônica, Síndrome do Intestino Irritável (SII), e as doenças de Hirshsprung e Chagas (De Giorgio *et al.*, 2004).

No Brasil, enquanto a incidência de muitas doenças do aparelho digestório é desconhecida, a prevalência de indivíduos com dor visceral (Quigley *et al.*, 2006), doença do refluxo gastroesofágico (Moraes-Filho *et al.*, 2009), dispepsia (Mendonça *et al.*, 2000), e doença inflamatória do intestino (Victoria, Sassak e Nunes, 2009) indica que as patologias do TGI apresentam uma morbidade significativa no país (Nih, 2009). Embora patologias como a pseudo-obstrução intestinal crônica (POIC) raramente ocorram na população brasileira (Almeida e Penna, 2000), a doença de Chagas, por exemplo, ainda é prevalente e sua sintomatologia intestinal é considerada importante (Moncayo e Silveira, 2009).

Mesmo que a prevalência e a incidência dos novos casos de doenças de Chagas tenham sido significativamente diminuídas ao longo dos anos no Brasil, condições como o megaesôfago e o megacólon associadas a esta patologia, ainda são descritas (Moncayo e Silveira, 2009), com aproximadamente 6,3% da população do Estado do Paraná sendo soropositiva para o vetor primário da doença, o *T. cruzi* (Gomes *et al.*, 1992). Ainda no estado do Paraná, no Hospital Universitário de Maringá, 26% dos pacientes com doença de Chagas apresentam queixas relacionadas ao TGI, sendo a obstipação uma das principais causas da busca por atendimento médico (Bozelli *et al.*, 2006).

Dentro da área clínica, as desordens gastrointestinais mais comuns, que apresentam evidências de alteração na motilidade são: gastroparesias; constipação induzida pelo uso de opióides; e desordens associadas à função alterada do intestino, como diarreia crônica e constipação idiopática (Valentin, Acosta e Camilleri, 2015). Estas desordens da motilidade gastrointestinal são caracterizadas por alterações da função motora, sensorial e

secretora, as quais modificam o funcionamento do intestino e resultam em significativo comprometimento da saúde. Dessa forma, como o SNE é o principal responsável pelo controle da motilidade, seu envolvimento netas patologias torna-se bastante evidente.

Algumas abordagens terapêuticas atuais apresentam o SNE como alvo de ação para o tratamento de distúrbios do TGI, entretanto, apesar do significativo progresso alcançado recentemente, muitas patologias ainda causam grande morbidade, e são consideradas como de difícil tratamento (Wade e Cowen, 2004). Entretanto, para o desenvolvimento de novas terapias destinadas ao tratamento de distúrbios da motilidade intestinal é necessária a compreensão de mecanismos patofisiológicos (Valentin, Acosta e Camilleri, 2015). Com esse objetivo, a identificação dos subtipos neuronais torna-se uma ferramenta importante, pois permite identificar alterações diretas sobre os neurônios entéricos e conseguir indícios dos mecanismos envolvidos em diversas patologias.

O SNE contém a maior e mais fenotipicamente diversa população de neurônios do SNP, apresentando um grande número de peptídeos, proteínas e outros neurotransmissores, os quais desempenham funções específicas (Furness *et al.*, 1992). Dessa forma, verificar a distribuição destas moléculas permite identificar as classes de neurônios que contribuem com o controle da função do TGI (Furness e Costa, 1987). Estas subpopulações neuronais são classificadas de acordo com a sua morfologia, propriedades fisiológicas, neuroquímicas e conexões (Furness, J.B., 2006), sendo que a localização de cada tipo neuronal, em particular, fornece uma forte indicação de sua função em um dado segmento intestinal (Wattchow, Brookes e Costa, 1995).

Distúrbios intestinais relacionadas à motilidade podem ser associadas a alterações significativas em diferentes tipos de neurônios entéricos, tanto na sua densidade quanto na morfologia neuronal, como ocorre no plexo mioentérico quando avaliado o processo de isquemia, por exemplo (Marosti *et al.*, 2014). Dessa forma, a morfologia é uma característica decisiva para a identificação dos neurônios entéricos e caracterização de processos patológicos no TGI (Dogiel, 1899; Ramón Y Cajal, 1911; Furness e Costa, 1987; Stach, 1989; Furness, 2000; Furness, J B, 2006).

Muitos trabalhos descrevem alterações morfológicas como forma de exibir evidências da alta plasticidade do SNE em resposta a vários tipos de agressão ao TGI. Para tanto, vários modelos experimentais são utilizados, como de axotomia (Ekblad, Mulder e Sundler, 1996), transplantação (Arciszewski, Barabasz e Całka, 2008), hipertrofia (Ekblad *et al.*, 1998) e de isquemia/reperfusão (Lindeström e Ekblad, 2004). Da mesma forma, várias

neuropatias são reproduzidas em modelos experimentais a partir de patologias como o diabetes (Sung *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2010; Hermes-Uliana *et al.*, 2014), a colite (Sung *et al.*, 2006) e a aganglionose (Pernow, 1983).

A análise morfológica, descrita como a primeira ferramenta utilizada para diferenciar os tipos neuronais do SNE (Dogiel, 1899), contribui não somente com a classificação fisiológica destes neurônios; mas também com a identificação de mecanismos agressores e processos patológicos (Sang e Young, 1996).

As alterações morfológicas oferecem indícios sobre uma resposta da inervação entérica a estímulos prejudiciais no microambiente do TGI, e funcionam muitas vezes, como uma reação ou um processo de adaptação, o qual pode refletir até mesmo na mudança do conteúdo de seus neurotransmissores ou neuropeptídios, sendo esta característica denominada neuroplasticidade (Schäfer, Van Ginneken e Copray, 2009). Portanto, a avaliação do comportamento destas moléculas transmissoras frente à exposição crônica e aguda ao F oferece importantes indícios dos mecanismos da sua toxicidade no TGI.

A partir de 1970, com o desenvolvimento das técnicas de imunohistoquímica, houve um grande avanço no conhecimento e identificação da diversidade de neurônios entéricos (Furness e Costa, 1987). Através da combinação das distribuições separadas e sobrepostas destes marcadores é possível comparar e identificar uma subpopulação de neurônios entéricos (Costa, Furness e Llewellyn-Smith, 1987).

Qualquer estudo investigando o código neuroquímico no SNE tem que considerar o padrão de colocação de vários neurotransmissores, sendo os mais importantes a ACh, NO, VIP, CGRP e a SP (Schneider *et al.*, 2001). Quanto ao controle da motilidade, os principais neurotransmissores inibitórios são o NO e o VIP; enquanto a ACh, CGRP e SP são excitatórios (Sand *et al.*, 2014), sendo a ACh o mais representativo neurotransmissor no TGI (Benarroch, 2007).

Dentro do controle da motilidade realizado pelo SNE se encontra o plexo mioentérico, o qual é organizado de forma integrada para gerar contração da musculatura lisa em sentido oral e relaxamento em sentido anal (Bayliss e Starling, 1899). A camada circular da musculatura lisa no TGI é innervada pelos motoneurônios excitatórios e inibitórios que tem seus corpos celulares no plexo mioentérico (Costa *et al.*, 1996), e seus axônios penetrando nas camadas musculares (Van Geldre e Lefebvre, 2004). É interessante lembrar que as atividades propulsivas do intestino secundariamente influenciam as funções da mucosa, e dessa forma, alterações na motilidade intestinal afetam também processos como a absorção de nutrientes

ou até mesmo comprometem a barreira intestinal contra a ação bacteriana (Bielefeldt e Conklin, 1997).

Por toda esta descrição das funções, organização e processos fisiológicos envolvidos no funcionamento do SNE, torna-se evidente que o estudo deste grande conjunto neuronal oferece não somente dados importantes a respeito da fisiologia do TGI, como permite ainda explorar mecanismos desconhecidos, como os que envolvem a absorção intestinal do F, e a forma como este íon causa a sintomatologia importante descrita em decorrência da sua toxicidade.

2.6. Hu (*Human neuronal protein*)

A determinação acurada do número total de neurônios localizados nas paredes do TGI é essencial para os estudos envolvendo o SNE (Phillips *et al.*, 2004). Para tanto, a análise quantitativa de subpopulações neuronais deve ser acompanhada de um marcador confiável da população geral de neurônios (Lin *et al.*, 2002).

Existem 4 critérios importantes para a escolha de um marcador da população geral de neurônios: o marcador deve ser específico para neurônios, não marcando células da glia; deve marcar todas as subpopulações neuronais; e deve ser disponível para compra por todos os pesquisadores (Karaosmanoglu *et al.*, 1996). O anticorpo anti-Hu (anti-*human neuronal protein*) obedece a todos estes critérios, sendo considerado um potente marcador para a quantificação de todas as subpopulações entéricas (Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013).

As proteínas Hu pertencem à família das proteínas ligantes de RNA, homólogas da proteína ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Visual*) de *Drosophilas*, sendo que a deleção do gene ELAV é letal, pois impede os neurônios de se diferenciar, comprometendo o desenvolvimento do sistema nervoso (Robinow *et al.*, 1988).

O anticorpo anti-Hu foi originalmente isolado de um paciente com encefalomielite paraneoplásica, sendo depois identificado como um antígeno neurônio-específico, através de técnicas de imunohistoquímica e western-blotting (Lin *et al.*, 2002). Síndromes neurológicas paraneoplásicas são desordens do sistema nervoso que ocorrem em associação à manifestações sistêmicas de câncer, mas que não resultam de tumores ou metástases diretamente no cérebro (Szabo *et al.*, 1991). A encefalomielite paraneoplásica é uma das desordens associadas ao câncer de pulmão de células pequenas, caracterizada por demência, perda sensorial e outras desordens neurológicas (Brain e Wilkinson, 1965).

Em tecido coletado de pacientes normais, o antígeno de Hu é altamente restrito ao sistema nervoso; e em pacientes com tumores pulmonares, este antígeno está restrito aos carcinomas de células pequenas, sendo esta a implicação prática da utilização da Hu, ou seja, a identificação do carcinoma de pequenas células do pulmão (Dalmau *et al.*, 1992).

As proteínas Hu são conhecidas por serem os primeiros marcadores do fenótipo neuronal, que inibem a proliferação dos neuroblastos e promovem a diferenciação dos neurônios (Marusich *et al.*, 1994; Barami *et al.*, 1995; Okano e Darnell, 1997; Akamatsu *et al.*, 1999).

O anticorpo anti-Hu, produzido em modelo murino, reconhece corpos celulares de neurônios na maioria dos vertebrados, incluindo camundongos, peixes, pássaros e no próprio homem (Marusich *et al.*, 1994; Henion *et al.*, 1996; Wakamatsu e Weston, 1997). Especificamente no que diz respeito ao SNE, este anticorpo já foi utilizado como um marcador da população de neurônios entéricos em diferentes modelos animais (Fairman *et al.*, 1995; Chiocchetti *et al.*, 2004; Furness, Robbins, *et al.*, 2004; Marruchella *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Sadeghinezhad, Sorteni, *et al.*, 2013).

Dentro da família das proteínas Hu, três são expressas em neurônios: HuB, HuC, e HuD. Estas proteínas são conhecidas como estabilizadoras do RNA, e também são marcadores da linhagem celular neuronal (Perrone-Bizzozero e Bird, 2013).

A HuD foi a primeira das proteínas Hu a ser identificada em pacientes com encefalomielite paraneoplásica e neuropatia sensorial (Dalmau *et al.*, 1990; Szabo *et al.*, 1991; Musunuru e Darnell, 2001). Esta proteína é também reconhecida como um dos primeiros marcadores de neurônios e também como um importante regulador do processo de diferenciação e sobrevivência neuronal; assim como do crescimento de neuritos e diferenciação morfológica neuronal (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero e Jasmin, 2006). Dessa forma, a expressão de HuD está presente não somente nos primeiros estágios da diferenciação neuronal, como também é mantida durante o processo de maturação dos neurônios (Wakamatsu e Weston, 1997).

Muitas evidências indicam que a HuD, pela sua habilidade em se ligar e estabilizar alguns processos de transcrição, apresenta um papel essencial no desenvolvimento e manutenção do fenótipo neuronal, através da estimulação da diferenciação morfológica de neurônios em desenvolvimento. A capacidade da HuD em direcionar o controle de eventos moleculares e celulares, indica que a HuC é um regulador importante da diferenciação e função neuronal (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero e Jasmin, 2006). Em camundongos

knockout para a HuD, existe uma diminuição na quantidade de neurônios adultos, ressaltando seu importante papel na diferenciação de células tronco neuronais (Akamatsu *et al.*, 1999; Akamatsu *et al.*, 2005).

As proteínas Hu também estão envolvidas nos mecanismos da plasticidade sináptica, pois é observado que a expressão da proteína HuD e sua capacidade de ligação são aumentadas durante a regeneração nervosa (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero e Jasmin, 2006). A HuD é expressa em neurônios do neocortex, hipocampo, córtex entorrinal, cerebelo, neurônios motores da raiz ventral da medula espinal, neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal e gânglios simpáticos (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero e Jasmin, 2006). No hipocampo, por exemplo, os níveis da proteína HuD são aumentados após tarefas que envolvam o aprendizado e a memória (Bolognani *et al.*, 2004), e em camundongos *knockout* para a HuC, observa-se um comprometimento do aprendizado associado à ausência desta proteína no hipocampo (Quattrone *et al.*, 2001).

A supraexpressão de HuB, HuC e HuD aumenta a taxa de diferenciação neuronal (Akamatsu *et al.*, 1999; Kasashima *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001), enquanto a sua subexpressão impede o crescimento de neuritos em linhagens celulares neuronais (Dobashi *et al.*, 1998). HuB e HuC também estimulam a diferenciação morfológica (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero e Jasmin, 2006), e a expressão de HuD está presente não somente nos primeiros estágios da diferenciação neuronal, como também é mantida durante o processo de maturação dos neurônios (Wakamatsu e Weston, 1997).

A análise utilizando anti-Hu em neurônios mioentéricos fornece um padrão confiável da população geral de neurônios, justamente porque permite uma observação direta de uma marcação precisa, especialmente no que diz respeito aos neurônios presentes em gânglios, a partir de preparados totais (Phillips *et al.*, 2004). A sua aplicabilidade se deve ao fato de que permite a identificação do pericário dos neurônios, marcando fortemente núcleo e o citoplasma (Phillips *et al.*, 2004), excluindo fibras nervosas extrínsecas, permitindo uma estimativa fidedigna da população neuronal entérica (Lin *et al.*, 2002).

O anticorpo anti-Hu permite a melhor visualização e estimativa do número geral de neurônios por gânglio porque não marca os processos neuronais, dessa forma, ao não marcar as fibras nervosas, também não bloqueia a visão dos corpos celulares, tornando-os discerníveis para a sua contagem (Lin *et al.*, 2002). Junte-se a isto é considerado bastante adequado como um marcador pan-neuronal de neurônios entéricos tanto para estudos

envolvendo tecido animal (Karaosmanoglu *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 2004) quanto tecido humano (Ganns *et al.*, 2006).

Por todas estas características importantes, o anti-Hu, combinando as formas anti-HuC e anti-HuD, é amplamente utilizado para a identificação de neurônios entéricos, sendo sua aplicabilidade comprovada em trabalhos do nosso grupo na Universidade de Maringá (Lopes *et al.*, 2012; De Moraes *et al.*, 2013; Hermes-Uliana *et al.*, 2014). Esta técnica também constitui uma ferramenta importante para a análise da inervação entérica, especialmente porque permite avaliar a população geral de neurônios frente a inúmeros processos como a toxicidade do F. Dessa forma, acreditamos que ao utilizar esta marcação, poderemos observar os efeitos gerais do F sobre neurônios entéricos e obter os primeiros indícios dos mecanismos envolvidos na toxicidade do F sobre o SNE.

2.7. Acetilcolina (ACh)

A motilidade do TGI é regulada pelo SNE (Furness, J.B., 2006), sendo a ACh o seu maior neurotransmissor (Furness, 2000; Furness, J.B., 2006), o qual é também o mais importante para a estimulação da atividade motora (Sharrad, Chen e Brookes, 2013), comprovado através da aplicação de drogas que inibem ou aumentam a sua liberação em neurônios mioentéricos, e que afetam a motilidade do TGI (Kilbinger *et al.*, 2002).

Johnson *et al.* (1996) descrevem que a ACh, através de seus receptores nicotínicos é essencial para o peristaltismo, porém não é o único neurotransmissor nas sinapses ganglionares (Costa e Furness, 1976). É mencionado que outros mecanismos estão envolvidos na liberação da ACh, como a ligação das taquicininas aos receptores NK3 em neurônios mioentéricos, os quais também desencadeiam a liberação de ACh e SP do plexo mioentérico, provocando contrações e relaxamento na camada circular da musculatura lisa (Johnson *et al.*, 1996).

Agindo através de receptores nicotínicos, a ACh é o maior responsável pelos potenciais pós-sinápticos excitatórios (Galligan, 1998), o que pode ser comprovado através de técnicas que mostram a redução nos potenciais pós-sinápticos excitatórios na presença de um agonista nicotínico no íleo de porcos da Guiné, por exemplo (Nishi e North, 1973). E ao se ligar aos receptores muscarínicos, a ACh gera potenciais pós-sinápticos lentos (Galligan *et al.*, 2000; Wood e Kirchgessner, 2004). Portanto, antagonistas muscarínicos e nicotínicos podem interferir profundamente com a motilidade do TGI (Sharrad, Chen e Brookes, 2013).

Em um grande número de espécies, a ACh e a SP são considerados os maiores neurotransmissores excitatórios dos neurônios motores do TGI (Holzer e Lippe, 1984; Maggi, Holzer e Giuliani, 1994). Entretanto, é importante lembrar que, embora a ACh, através de seus receptores nicotínicos, seja o transmissor excitatório predominante do SNA, em neurônios mioentéricos outros mecanismos não-colinérgicos, também estão envolvidos na transmissão sináptica rápida, como a via envolvendo o ATP através do receptor P2X (Galligan, 2002).

Nos primeiros estudos desenvolvidos com o objetivo de identificar neurônios colinérgicos presentes no SNC, a acetilcolinesterase foi bastante utilizada, porém verificou-se que esta enzima não marcava exclusivamente neurônios colinérgicos (Porter *et al.*, 1996). Dessa forma, na tentativa de encontrar um marcador específico para neurônios colinérgicos, a marcação com a colina acetiltransferase (ChAT) foi realizada e avaliada, e assim considerada o marcador mais confiável para o SNC (Kan, Chao e Forno, 1980; Eckenstein e Thoenen, 1982; Mcgeer, Mcgeer e Peng, 1984; Porter *et al.*, 1996), e para o SNE (Furness, Costa e Eckenstein, 1983).

Nas últimas décadas vários trabalhos trazem que, no SNE, a maioria dos neurônios entéricos expressa a ChAT em seus corpos celulares, sendo desta forma classificados como colinérgicos (Beck *et al.*, 2009). No plexo submucoso humano, cerca de 52-55% dos neurônios são colinérgicos, enquanto no plexo mioentérico este valor varia de 63-65% dos neurônios do intestino delgado e grosso humano (Porter *et al.*, 1996). Neurônios intrínsecos aferentes primários (IPANs) são fracamente imunorreativos à ChAT (IR-ChAT), e mesmo em excelentes condições, não é possível identificar todos estes IPANs (Steele, Brookes e Costa, 1991).

Pela presença de neurônios colinérgicos tanto no plexo mioentérico como submucoso, fica evidente que neurônios IR-ChAT estão presentes em diferentes tipos neuronais e também apresentam funções distintas (Porter *et al.*, 1996). Porter *et al.* (1996) ainda descrevem detalhadamente, que os neurônios sensoriais IR-ChAT são identificados com corpos celulares grandes e multipolares e dendritos filamentosos; assim como neurônios com dendritos longos e lamelares, classificados como interneurônios e neurônios motores para a camada circular.

No SNE de porcos da Guiné, por exemplo, a imunorreatividade à ChAT é expressa em motoneurônios excitatórios, interneurônios e também em IPANs (Sadeghinezhad, Sorteni, *et al.*, 2013). Em camundongos, o plexo mioentérico apresenta

imunorreatividade à ChAT em cerca de 63% dos neurônios, sendo estes distribuídos entre neurônios sensoriais intrínsecos, interneurônios e neurônios motores excitatórios à camada muscular circular e longitudinal (Sang e Young, 1998). A porcentagem de neurônios IR-ChAT pode variar de acordo com o segmento, sendo que no jejuno de camundongos os neurônios colinérgicos compõem 80% dos neurônios do plexo mioentérico (Furness e Costa, 1987), enquanto em outros roedores, este valor fica em torno de 56% de todos os neurônios (Sadeghinezhad, Tootian, *et al.*, 2013). No plexo mioentérico do íleo de equinos, os neurônios colinérgicos representam 64% dos neurônios (Chiocchetti *et al.*, 2009), sendo este valor de 62% em caprinos (Mazzuoli *et al.*, 2007) e 58% em suínos (Brehmer *et al.*, 2004).

Como mencionado previamente, dentro do plexo mioentérico, existem interneurônios ascendentes e descendentes que estão envolvidos na geração de reflexos polarizados e na coordenação dos padrões de motilidade (Sharad, Chen e Brookes, 2013), sendo a motilidade intestinal controlada principalmente pelos neurônios intrínsecos inibitórios e excitatórios (Colucci *et al.*, 2012).

Em neurônios entéricos, a ChAT também é encontrada colocalizada com outros neurotransmissores (Furness e Costa, 1987). No intestino delgado de porcos da Guiné, todos os corpos celulares dos motoneurônios excitatórios à camada circular da musculatura lisa são IR-ChAT e para a SP, enquanto todos os corpos celulares dos motoneurônios inibitórios à camada circular são IR-NOS e IR-VIP (Brookes, Steele e Costa, 1991). Quanto à sua morfologia, Furness (1987) relata que em porcos da Guiné, a maioria dos neurônios IR-ChAT que se projetam para a musculatura lisa apresentam morfologia Dogiel tipo I e se projetam em direção oral (Furness e Costa, 1987).

No plexo mioentérico adulto de camundongos, neurônios colinérgicos compreendem vários subtipos e também co-expressam uma variedade de outros marcadores neuroquímicos, apresentando corpos celulares maiores e dendritos filamentosos que se projetam para a submucosa e para a camada muscular circular (Sang e Young, 1998; Qu *et al.*, 2008). Já no plexo mioentérico do íleo de ratos, 45% dos neurônios IR-ChAT são IPANs, sendo que os corpos celulares destes neurônios apresentam a morfologia Dogiel tipo II (Mann, Furness e Southwell, 1999).

Além de neurônios motores, vale ressaltar que a ChAT também foi identificada em interneurônios e neurônios sensoriais (Brookes, Steele e Costa, 1991; Costa, Brookes, *et al.*, 1992). Como tanto os neurônios sensoriais quanto motores têm predominantemente projeções curtas no sentido oral, reflexos de sítios mais distantes são conduzidos por

interneurônios, sendo comprovado que o bloqueio de receptores nicotínicos em regiões intermediárias entre o estímulo e o sítio inicial do estímulo paralisa a transmissão dos reflexos (Johnson *et al.*, 1996), evidenciando mais uma vez a importância da inervação colinérgica.

No intestino humano é observado um grande número de neurônios IR-ChAT, com numerosas fibras marcadas nas camadas musculares circular e longitudinal, ressaltando o papel da AChT na contração da musculatura lisa do intestino delgado e grosso, sendo que perfazem a maioria dos neurônios do plexo mioentérico (Porter *et al.*, 1996).

No íleo de porcos da Guiné, a AChT em neurônios motores promove a contração das camadas circular e longitudinal da musculatura lisa através de receptores muscarínicos (Taylor e Bywater, 1986). Em camundongos, no intestino delgado, a AChT apresenta-se, através de receptores muscarínicos, como o maior neurotransmissor excitatório às camadas circular e longitudinal da musculatura lisa, enquanto que no cólon, através de receptores nicotínicos presentes nas sinapses neuro-neuronal, apresenta um papel crítico para o complexo motor migratório (Sang e Young, 1998).

A presença de interneurônios colinérgicos na via neuronal dos reflexos ascendentes e descendentes no íleo de camundongos indica que a liberação de ACh de interneurônios ativa os receptores nicotínicos da acetilcolina que estão presentes em outros interneurônios, confirmando esta via (Okishio *et al.*, 2005). O envolvimento da ACh na via descendente é evidente pela sua presença, não somente singular, como também colocalizada com outros marcadores, pois são descritos interneurônios imunorreativos à colina acetiltransferase (ChAT) colocalizada com a serotonina(5-HT), nNOS/VIP e somatostatina (SOM) (Portbury *et al.*, 1995).

Para a identificação de neurônios colinérgicos são utilizados anticorpos que detectem a ChAT, a qual sintetiza a ACh, sendo esta técnica bastante descrita para o SNE (Furness, Costa e Eckenstein, 1983; Porter *et al.*, 1996; Sang e Young, 1998). Em neurônios entéricos, a ACh foi observada inicialmente no estômago humano (Graham, 1949), sendo depois descrita no cólon (Fishlock e Parks, 1963), esôfago (Trounce *et al.*, 1957) e íleo (Bennett, 1965).

A ACh é sintetizada no citoplasma de neurônios a partir da colina e acetilCoA pela ChAT, e em seguida é transportada dentro de vesículas pela proteína denominada transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Sharrad, Chen e Brookes, 2013), sendo possível a utilização da marcação tanto de ChAT quanto de VACHT para a identificação de neurônios e dos terminais das fibras colinérgicas (Sang e Young, 1998).

Neurônios colinérgicos foram identificados no intestino delgado de porcos da Guiné com a utilização de anticorpos contra a ChAT e a sua forma vesicular (VChAT) e verificou-se que nos gânglios mioentéricos de porcos da Guiné, as varicosidades IR-VChAT pertencem na sua maioria aos interneurônios ascendentes e descendentes. No plexo muscular profundo do íleo, foi observada a co-localização, em quase todo o plexo, de varicosidades IR-nNOS e VIP, assim como de SP e VChAT (Sharrad, Chen e Brookes, 2013).

A colocalização de nNOS e VChAT também foi observada em 20% das varicosidades nos gânglios mioentéricos do íleo de porcos da Guiné, sugerindo a existência de neurônios entéricos que utilizam tanto o NO quanto a ACh (Sharrad, Chen e Brookes, 2013), o que é bastante interessante, dado que no plexo mioentérico a acetilcolina apresenta-se como um neurotransmissor excitatório, enquanto o NO é inibitório.

Alguns trabalhos também demonstraram a co-existência de neurônios marcados com ChAT e nNOS no plexo mioentérico do estômago (Pimont *et al.*, 2003) e no cólon humano (Porter *et al.*, 1996). No plexo mioentérico do intestino delgado humano a proporção de neurônios entéricos IR-ChAT e nNOS simultaneamente está entre 3 a 4% de todos os neurônios, e a de neurônios não-imunorreativos para nenhum destes dois marcadores fica em torno de 7% (Beck *et al.*, 2009).

No plexo mioentérico do íleo de ratos preparado para a co-localização de ChAT e nNOS, todos os neurônios são marcados para um ou outro (ChAT ou nNOS), mas raramente para ambos simultaneamente, sendo que 2,8% dos neurônios IR-nNOS são também IR-ChAT (Mann, Furness e Southwell, 1999).

Em camundongos, 10% dos neurônios mioentéricos IR-nNOS do intestino delgado são IR-ChAT, sendo nestes neurônios ainda verificada a existência de terminais IR-VChAT, porém não na camada circular da musculatura lisa. Neste modelo concluiu-se que os neurônios IR-nNOS que inervam a musculatura são neurônios motores inibitórios não-colinérgicos, enquanto os IR-nNOS colinérgicos são interneurônios descendentes (Sang e Young, 1998).

Alguns autores acreditam que os anticorpos utilizados para a localização da ChAT no SNC quando utilizados no SNE, não apresentam bons resultados (Chiocchetti *et al.*, 2003). Dessa forma, muitos pesquisadores ainda buscam desenvolver outros marcadores colinérgicos. Recentemente foi descoberta uma outra forma de ChAT que é predominantemente encontrada em neurônios periféricos, denominada ChAT periférica (pChAT) (Nakajima *et al.*, 2000). Neste trabalho de Nakajima *et al.* (2000) os autores

encontraram em gânglios mioentéricos, neurônios com uma forte imunorreatividade à pChAT, que eram neurônios intrínsecos aferentes primários. Também foi verificado que 4% dos neurônios IR-nNOS eram IR-pChAT, os quais acredita-se que sejam interneurônios, sendo este similar ao encontrado normalmente para a ChAT comumente utilizada. Não foram encontrados neurônios motores inibitórios IR-nNOs com imunorreatividade para ChAT ou pChAT (Chiocchetti *et al.*, 2003).

No presente estudo, além de avaliarmos a ACh no SNE, também buscamos verificar se existem efeitos tóxicos do F sobre os neurônios mioentéricos IR-ACh, dado que existem algumas importantes correlações entre a toxicidade do F e a inervação colinérgica no SNC, onde é conhecido que o F interfere no sistema de várias enzimas, inclusive na atividade enzimática da colinesterase (Augenstein *et al.*, 1991). O F atravessa a barreira hematoencefálica e se acumula no cérebro de ratos exposto às altas doses, sendo que os efeitos neurotóxicos da exposição a longo prazo ao F incluem estresse oxidativo, alterações no sistema colinérgico (Chen, J. *et al.*, 2003) e diminuição da capacidade de aprendizado e memória (Zhao *et al.*, 1996; Xiang, Q *et al.*, 2003).

Uma alta concentração de NaF pode induzir a uma diminuição na capacidade de aprendizado e memória, o qual acredita-se ser devido a um alto nível de estresse oxidativo resultando na fluorose (Gao, Liu e Guana, 2009). No cérebro de ratos, existe uma diminuição no número de receptores nicotínicos causadas pela toxicidade do F, a qual acredita-se que também esteja envolvida no comprometimento destas funções de aprendizado e memória que são comumente afetadas pelo F (Long *et al.*, 2002).

Quanto ao envolvimento da ACh no processo de inflamação, existe uma alteração da contração muscular causada pela acetilcolina em segmentos intestinais como o íleo quando existe um processo inflamatório (Shi e Sarna, 1997). No caso da colite induzida em ratos, a acetilcolina não somente altera como também aumenta a contractilidade do cólon (Myers *et al.*, 1997).

Pela importância da ACh no SNE, dado seu envolvimento especialmente no controle da motilidade, e pelos conhecidos efeitos tóxicos do F sobre a neurotransmissão colinérgica no SNC, é possível que da mesma forma, os neurônios mioentéricos sejam afetados por este íon. Portanto, como não existem quaisquer dados a respeito de como os neurônios colinérgicos podem ser afetados pelo F, as informações que pretendemos oferecer neste estudo são bastante importantes e podem contribuir com os esclarecimentos sobre a sintomatologia que acomete o TGI em decorrência da toxicidade do F.

2.8. Óxido Nítrico (NO)

A função biológica do NO foi inicialmente descrita em 1980, com a demonstração da liberação desta molécula gasosa durante o metabolismo celular (Murad, 1986). A partir deste trabalho, outros pesquisadores também avaliaram as funções fisiológicas do NO tanto em vias intracelulares quanto intercelulares (Ignarro *et al.*, 1987; Andrew e Mayer, 1999).

O NO é uma molécula polifuncional, que apresenta uma rápida difusão entre as células, sendo esta uma característica crucial do seu papel biológico como mensageiro intracelular e modulador endógeno, pois controla vários processos fisiológicos com pouco consumo de energia ou por vias que envolvem reações diretas (Beckman e Koppenol, 1996). O NO é uma molécula altamente reativa com um vasto leque de distribuição em todo o organismo, e sua síntese ocorre via oxidação da L-arginina à L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Van Geldre e Lefebvre, 2004), com a utilização de O₂ e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Marletta, 1993; 1994).

A NOS (óxido nítrico sintase) é uma enzima que apresenta três isoformas, decodificadas por três diferentes genes, sendo identificadas como: NOS neuronal (nNOS), NOS induzida (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (Dawson e Dawson, 1998). A nNOS e a eNOS são constitutivamente expressas, tendo sua atividade regulada por íons Ca²⁺; enquanto a iNOS foi inicialmente encontrada em macrófagos, sendo sua produção induzida em resposta à citocinas e endotoxinas (Van Geldre e Lefebvre, 2004), conduzindo a efeitos tóxicos em altas concentrações através do estresse oxidativo gerado (Cho, 2001), causando graves danos aos tecidos (Inkielewicz-Stepniak e Czarnowski, 2010).

O NO apresenta um papel importante no processo de vasodilatação, onde encontra-se envolvido na regulação do fluxo sanguíneo; manutenção do tônus vascular; controle da agregação plaquetária; modulação da atividade de mastócitos (Martín, Jiménez e Motilva, 2001); e inibição da adesão de plaquetas e neutrófilos às células endoteliais (Rosselli, Keller e Dubey, 1998). Da mesma forma, medeia a atividade imune de macrófagos, uma vez que também é gerado por estes tipos celulares (Dawson e Dawson, 1998); e responde a microorganismos invasores agindo como um agente antimicrobiano (Rosselli, Keller e Dubey, 1998). Além destas funções, o NO apresenta outros papéis fisiológicos, pois inibe a proliferação e migração de fibras da musculatura lisa, regula o processo de apoptose e mantém a função da barreira celular endotelial (Rosselli, Keller e Dubey, 1998).

Dentro do SNE, como um neurotransmissor inibitório, provoca o relaxamento da musculatura lisa de órgãos do TGI (Kurjak *et al.*, 2001; Van Geldre e Lefebvre, 2004). Este efeito relaxante não ocorre através de uma ligação do NO a um receptor de membrana como ocorre com o VIP, sendo descrito por Van Geldre *et al.* (2001), que o efeito pós-sináptico do NO é intracelular, sobre as fibras da musculatura lisa, no qual o NO se liga a um grupo prostético heme da guanilato ciclase (sGC), resultando na transformação da guanosina trifosfato em guanosina cíclica monofosfato (cGMP), aumentando os níveis intracelulares de cGMP. A proteína quinase G (PKG) é ativada pela cGMP, induzindo a uma redução na produção de inositol 1,4,5-trifosfato, ativação da Ca^{2+} ATPase e regulação da fosfatase de miosina-de-cadeia-leve. Todos estes efeitos conduzem ao relaxamento da musculatura lisa pela diminuição do Ca^{2+} intracelular ou pela dessensibilização do Ca^{2+} , que levam a uma diminuição da contração da musculatura lisa, já que o Ca^{2+} é essencial para este processo. A dessensibilização de Ca^{2+} causa uma redução na força contráctil na ausência de alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular.

As três isoformas de NOS são encontradas no intestino (Torihashi *et al.*, 1996; Mccafferty *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2012). A nNOS, diferentemente da iNOS e da eNOS, está claramente presente no intestino delgado em sua forma solúvel (Van Geldre, Fraeyman e Lefebvre, 2000), sendo a forma predominante no estômago (Belai e Burnstock, 2000); e no intestino delgado (Belai e Burnstock, 2000), comprovadamente presente no duodeno (Cullen *et al.*, 1999); jejuno e íleo (Van Ginneken *et al.*, 2001).

Ao se avaliar a expressão das três isoformas de NOS, em neurônios mioentéricos no jejuno de camundongos, observou-se que 55% dos neurônios eram nitrérgicos, apresentando alguma das isoformas da NOS (Bagyánszki *et al.*, 2011). A iNOS e a eNOS também são encontradas em neurônios mioentéricos de ratos (Miampamba e Sharkey, 1999) e camundongos (Mulè *et al.*, 2001), sendo a expressão da iNOS aumentada em doenças inflamatórias (Kimura *et al.*, 1998).

Funções diferenciadas das isoformas podem ser comprovadas ao se utilizar um inibidor da biossíntese de NO, onde é verificada uma atenuação da disfunção intestinal que existe nos caso da isquemia (Taha *et al.*, 2010). Provavelmente este efeito é causado pela diminuição da produção de NO pela iNOS, a qual apresenta efeitos deletérios em circunstâncias patológicas, especialmente por esta enzima produzir NO por um longo período e em grandes concentrações, enquanto as outras isoformas produzem o NO que é rapidamente utilizado (Cho, 2001).

Estes efeitos são diferentes dos apresentados quando apenas a nNOS é inativada (Rivera *et al.*, 2012), a qual apresenta um efeito protetor sobre os danos causados pelo próprio NO (Cho, 2001), assim como também age diretamente como um indutor das respostas de defesa no TGI, como verificado em estudos de isquemia/reperfusão (Kim e Hwan Kim, 2001).

A importância dessa distribuição em todo o TGI enfatiza o papel potencial do NO nas mudanças fisiológicas no trânsito intestinal, em estados patológicos como em inflamações ou até mesmo câncer (Grongnet e David, 2003). A isoforma mais abundante no SNE é a nNOS (Savidge, 2011), e sua deleção em animais transgênicos demonstrou a sua importância para a manutenção da função intestinal (Rivera *et al.*, 2012). Alterações na atividade da nNOS implicam em patologias entéricas, sendo esta enzima um potencial alvo molecular para intervenção terapêutica (Savidge, 2011).

As técnicas para identificar e quantificar neurônios nitrérgicos são a histoquímica para a NADPH diaforase e a imunohistoquímica para a NOS, sendo comprovado que as duas técnicas fornecem resultados idênticos tanto para o cérebro quanto para o SNP (Dawson *et al.*, 1991). Porém, para o SNE, no plexo mioentérico, a presença do NO é demonstrada especialmente através da detecção da nNOS em neurônios e fibras nervosas (Bredt, Hwang e Snyder, 1990).

A nNOS é expressa em 25 a 30% dos neurônios mioentéricos no intestino delgado de mamíferos avaliados em laboratório (Jarvinen *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2008), sendo que no modelo murino, 29% dos neurônios mioentéricos do intestino delgado desses animais expressam nNOS (Qu *et al.*, 2008), com um valor bastante próximo no intestino delgado de ratos, em torno de 28% (Jarvinen *et al.*, 1999).

No TGI, a presença do NO foi demonstrada inicialmente através da detecção da nNOS em neurônios e fibras nervosas mioentéricas (Bredt, Hwang e Snyder, 1990), sendo que neste plexo funciona como um neurotransmissor não-adrenérgico/não-colinérgico (NANC), (Bult *et al.*, 1990; Daniel *et al.*, 1994; Kubes e Mccafferty, 2000; Toda e Herman, 2005), apresentando um papel inibitório, promovendo o relaxamento da musculatura lisa (Xue *et al.*, 2000) e o controle de abertura dos esfíncteres (Adeghate *et al.*, 2003). Especialmente o controle dos esfíncteres já valem ao NO uma função de destaque dada a importância da musculatura do esfíncter esofágico, do piloro, do esfíncter de Oddi e do ânus; assim como o reflexo de acomodação no fundo do estômago (Takahashi, 2003).

O NO participa da modulação do tônus da musculatura lisa, assim como da regulação do peristaltismo, esvaziamento gástrico e atividade antral (Martín, Jiménez e Motilva, 2001). Também estimula a secreção da mucosa gástrica e intestinal (Cho, 2001), regulando a secreção ácida e mucosa (Grider, 1993), assim como de hormônios (Fujimiya, Yamamoto e Kuwahara, 1998) e eletrólitos (Kuwahara, Kuramoto e Kadowaki, 1998). O NO está envolvido ainda, na manutenção do fluxo sanguíneo (Martín, Jiménez e Motilva, 2001); manutenção da integridade do epitélio gástrico (Cho, 2001); e permeabilidade epitelial (Kubes, 1992).

Existem três vias motoras de neurotransmissão que modulam o tônus da musculatura lisa longitudinal: as vias excitatórias colinérgicas e não-colinérgicas; e a via inibitória realizada pelo NO (Goldhill *et al.*, 1995). Para produzir seus efeitos relaxantes sobre a musculatura lisa do TGI, o NO age tanto direta quanto indiretamente sobre as fibras da musculatura lisa, modulando os reflexos neuronais assim como também regulando a liberação de outro neurotransmissor a partir de terminais dos neurônios entéricos (Kurjak *et al.*, 2001), como a acetilcolina (Kilbinger *et al.*, 2002).

A heterogeneidade da morfologia dos neurônios imunorreativos à nNOS (IR-nNOS), ora estrelado ora com pequenos pericários, confirma a existência de duas diferentes populações de neurônios nitrérgicos no SNE, como neurônios motores e interneurônios (Beck *et al.*, 2009). O grupo mais conhecido de neurônios nitrérgicos é o grupo dos neurônios motores inibitórios que medeiam o relaxamento da musculatura lisa do TGI; e o restante dos neurônios nitrérgicos, são os interneurônios inibitórios que controlam outros neurônios motores no plexo mioentérico (Yang, P. *et al.*, 2013).

É conhecida nos neurônios entéricos a presença de um “código químico”, no qual um mesmo neurônio pode apresentar vários neurotransmissores, pelos quais podem ser identificados (Costa, Furness e Gibbins, 1986). Em várias espécies, é observada a presença de neurônios IR-nNOS ou IR-ChAT (Brown e Timmermans, 2004; Qu *et al.*, 2008), sendo que a colocalização de nNOS e ChAT é observada especificamente em interneurônios descendentes em porcos da Guiné (Furness, J B, 2006; Furness, J.B., 2006; Qu *et al.*, 2008); ou no plexo mioentérico humano no estômago (Pimont *et al.*, 2003), intestino delgado e grosso (Porter *et al.*, 1996).

No plexo mioentérico humano, existem mais neurônios IR-ChAT no intestino delgado e uma maior quantidade de neurônios IR-NOS no intestino grosso, sendo que sua

colocalização no intestino delgado humano, foi observada em apenas 3% de todos os neurônios (Beck *et al.*, 2009).

O NO endógeno inibe a liberação de ACh no íleo de porcos da Guiné (Hebeiss e Kilbinger, 1996) e camundongos (Mang *et al.*, 2002). Também foi descrito que os inibidores da nNOS aumentam a liberação de ACh do íleo de porcos da Guiné (Kilbinger e Wolf, 1994), camundongos (Mang *et al.*, 2002) e cães (Hryhorenko, Woskowska e Fox-Threlkeld, 1994). O resultado obtido com o íleo de porcos da Guiné não foi observado no intestino delgado humano, o que acredita-se ser devido à presença de uma grande rede de neurônios colinérgicos no plexo mioentérico desses animais, muito maior que a rede de neurônios nitrérgicos (Kilbinger *et al.*, 2002).

Existem numerosos neurônios motores inibitórios IR-NOS que se projetam para a camada circular da musculatura lisa, porém estes neurônios não são colinérgicos, enquanto os que apresentam IR-NOS e IR-ChAT são interneurônios descendentes, valendo esta descrição para 16% dos neurônios do íleo de porcos da Guiné (Li e Furness, 1998). Em neurônios mioentéricos de camundongos, esta proporção é de 10%, sendo confirmado que estes neurônios não são da camada circular da musculatura lisa (Sang e Young, 1998). Estes dados confirmam que os neurônios que inervam a musculatura lisa são motores e não-colinérgicos, enquanto os colinérgicos são interneurônios.

Embora o NO seja considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNE (Mashimo *et al.*, 1996), atua conjuntamente com o VIP para a inibição da contração da musculatura lisa do TGI (Lefebvre, De Vriese e Smits, 1992; Keef *et al.*, 1994), sendo a colocalização comprovada nos terminais dos neurônios inibitórios que inervam a camada muscular circular (Rivera *et al.*, 2012). É importante lembrar que dentro desta co-transmissão, o NO apresenta o papel principal, sendo o VIP complementar (Furness, J.B., 2006).

Além de serem complementares, o NO é capaz de estimular a liberação de VIP a partir de neurônios entéricos (Grider, 1993; Daniel *et al.*, 1994; Allescher *et al.*, 1996), porém o VIP não influi sobre a síntese de NO em gânglios mioentéricos de porcos da Guiné, por exemplo (Grider, 1993). Sua colocalização (VIP e nNOS) também é observada não somente em subpopulações de interneurônios inibitórios da via descendente, dentro do plexo mioentérico; como também em fibras varicosas de diferentes espécies (Costa, Furness, *et al.*, 1992; Furness, Young, *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998; Dick *et al.*, 2000)

A proporção de neurônios IR-nNOS colocalizados com o VIP no plexo mioentérico variou de 5,8% no intestino delgado a 17,5% no intestino grosso humano

(Brehmer, Schrödl e Neuhuber, 2006). Em porcos da Guiné, os neurônios IR-nNOS incluem os neurônios motores descendentes inibitórios e os interneurônios descendentes, constituindo um total de 24% do total dos neurônios do plexo mioentérico do íleo (Furness, J.B., 2006). Ainda no íleo de porcos da Guiné, todos os corpos celulares IR-NOS em gânglios mioentéricos são IR-VIP, e 43% das varicosidades IR-NOS também são IR-VIP (Sharrad, Chen e Brookes, 2013), indicando que o código químico dos corpos celulares dos interneurônios ascendentes e descendentes difere do encontrado nos axônios varicosos em marcadores não colinérgicos.

Em camundongos, 90% dos neurônios IR-NOS do plexo mioentérico são neurônios motores inibitórios, enquanto 10% são interneurônios; enquanto no íleo, representam de 28 a 29% do total dos neurônios (Qu *et al.*, 2008), sendo que podem chegar a 55% no jejuno (Aubé *et al.*, 2006). Em outros mamíferos como caprinos, equinos e suínos, a porcentagem de neurônios mioentéricos expressando nNOS é de 28%, 21% e 19%, respectivamente (Brehmer *et al.*, 2004; Chiocchetti *et al.*, 2004; Chiocchetti *et al.*, 2009). Quanto a morfologia, os neurônios IR-NOS também foram classificados como Dogiel tipo I em vários modelos animais (Mazzuoli *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Chiocchetti *et al.*, 2009), indicando que pela similaridade devem apresentar propriedades funcionais semelhantes.

Existem ainda variações na proporção de neurônios IR-nNOS em decorrência do processo de envelhecimento. Em recém-nascidos, esta proporção é de 40%, porém se altera para 25 a 30% em indivíduos em torno de 15 anos (Wester, O'briain e Puri, 1999). Em amostras de intestino delgado humano esses valores ficam em torno de 20 a 56% em adultos de idade mediana, enquanto em indivíduos idosos esses valores são de 40,8% no fundo gástrico, por exemplo (Belai e Burnstock, 1999). Valores de 29% no duodeno, para indivíduos de 42 anos e 72% no cólon de indivíduos em torno de 72 anos, também são descritos, indicando a importância desta subpopulação neuronal, e a própria plasticidade neuronal entérica (Brehmer, Schrödl e Neuhuber, 2006).

É compreensível este aumento na subpopulação nitrérgica, pois no plexo submucoso o NO promove especialmente a proteção da mucosa e a cura de processos ulcerativos, mas também está envolvido na iniciação da resposta inflamatória quando combinada a outras espécies reativas de oxigênio, por todo o TGI (Cho, 2001). Portanto, como o organismo de indivíduos idosos tende a ser mais comprometido em suas funções, este aumento oferece indícios de uma tentativa do organismo de manter a homeostase intestinal.

Altas concentrações de NO estão relacionadas com numerosas patologias, incluindo a úlcera peptídica, gastrite crônica, câncer gastrointestinal, gastroenterites bacterianas, doença celíaca e doenças crônicas inflamatórias do intestino (Grongnet e David, 2003). Recentemente, a hipótese de que a nNOS é sempre benéfica e a iNOS é sempre deletéria, tem sido questionada, desde que uma série de dados sugerem que o aumento da atividade da nNOS pode ser responsável por alterações patológicas e, em contraste, a iNOS pode desempenhar um efeito reparador em certas desordens patológicas, porém maiores estudos precisam ser realizados (Martín, Jiménez e Motilva, 2001).

As neuropatias entéricas envolvem efeitos produzidos pela inervação extrínseca e pelo SNE, e muitas destas patologias afetam os neurônios IR-nNOS (Rivera *et al.*, 2011). Como a maioria destes neurônios são motores inibitórios para a camada longitudinal e circular da musculatura lisa, e também para a muscular da mucosa (Furness, J.B., 2006), é possível sugerir que a motilidade intestinal é grandemente afetada por alterações nestes neurônios.

O envolvimento dos neurônios IR-nNOS nas neuropatias entéricas também pode ser devido não somente ao comprometimento da neurotransmissão, como também aos efeitos deletérios da presença do NO, sendo este um radical livre que leva à importantes modificações pós-translacionais de proteínas (Rivera *et al.*, 2011). Um comprometimento da produção local de NO no plexo mioentérico, por exemplo, parece ser um importante fator contribuinte da patogênese da acalásia, da gastroparesia diabética, estenose pilórica hipertrófica infantil, doença de Hirschsprung e doença de Chagas (Takahashi, 2003).

Dado que o NO apresenta um importante papel nas funções do TGI, quando se utiliza uma marcação para a nNOS em neurônios entéricos, a intenção não é somente caracterizar tipos neuronais, como também identificar alterações importantes que podem comprometer a fisiologia intestinal. Portanto, no presente estudo, ao avaliarmos esta subpopulação neuronal pretendemos oferecer não somente um dado a respeito do comportamento específico desta subpopulação mas da própria fisiologia intestinal e dos efeitos do F sobre o TGI.

2.9. Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP)

A partir da segunda metade da década de 70, inúmeros peptídeos foram localizados no SNE, utilizando técnicas de imunohistoquímica (Hökfelt *et al.*, 1980). Dentre eles, está o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), o qual é formado por 28 aminoácidos, considerado o peptídeo mais abundante no TGI (Pernow, 1983). O VIP foi inicialmente

descrito no intestino delgado de ratos (Said e Mutt, 1970), porém é encontrado em neurônios intrínsecos do SNE, em toda a extensão do TGI (Furness *et al.*, 1992).

Descrito como um neurotransmissor não-adrenérgico/não-colinérgico (Grider e Makhlouf, 1988), o VIP é considerado importante, especialmente pelo seu papel no plexo mioentérico, no qual atua como um neuropeptídeo inibitório sobre a contração da musculatura lisa, induzindo ao seu relaxamento (Furness e Costa, 1979; Furness *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1996; Belai *et al.*, 1997); apresentando um efeito complementar ao NO, que é o neurotransmissor inibitório mais importante (Chino *et al.*, 2002).

A musculatura lisa do TGI é formada por uma camada muscular longitudinal (externa) e outra circular (interna), que medeiam a função motora (Furness, J.B., 2006). O controle neuronal para a musculatura lisa é fornecido tanto pela inervação extrínseca quanto intrínseca, que realizam a contração e o relaxamento, para uma adequada motilidade (Furness *et al.*, 1999). O VIP é conhecidamente um neurotransmissor encontrado em corpos celulares e fibras nervosas responsáveis pela inervação das camadas circular e longitudinal da musculatura lisa (Fahrenkrug, 1982), confirmando seu papel motor.

Com o objetivo de confirmar o papel do VIP como um neuropeptídeo inibitório, alguns trabalhos importantes avaliaram a sua presença no fluxo sanguíneo do estômago, quando neurônios entéricos inibitórios são ativados por estimulação elétrica (Fahrenkrug, Haglund, *et al.*, 1978). Com o mesmo intuito, o esfíncter esofágico inferior de felinos foi avaliado, utilizando infusões contendo anticorpos para o VIP, e verificou-se o seu relaxamento (Goyal, Said e Rattan, 1979).

A presença de corpos celulares e axônios imunorreativos ao VIP (IR-VIP) no plexo mioentérico e na camada circular da musculatura lisa foi descrita por Furness e Costa (1979), os quais também confirmaram o papel inibitório destes neurônios, assim como a direção de suas projeções em sentido anal, pelo acúmulo de VIP em sentido oral aos neurônios entéricos que eram bloqueados. Ainda neste mesmo estudo, foi verificado que axônios IR-VIP que supriam a camada circular da musculatura lisa desapareciam quando o plexo mioentérico era eliminado, confirmando a origem da inervação da camada circular como oriunda de corpos celulares localizados no plexo mioentérico.

Os autores ainda confirmaram que as projeções dos neurônios IR-VIP do plexo mioentérico à camada muscular circular, eram as mesmas projeções dos neurônios entéricos inibitórios que são verificadas em estudos neurofisiológicos, os quais participam da via descendente inibitória do reflexo peristáltico (Costa e Furness, 1976).

Corpos celulares de neurônios e fibras nervosas IR-VIP são encontrados nos plexos nervosos do estômago e intestino delgado de ratos (Costa *et al.*, 1980; Costa, 1983; Daniel *et al.*, 1994). No íleo de porcos da Guiné e de ratos, a maioria dos corpos celulares de neurônios IR-VIP estão localizados no plexo submucoso (Costa *et al.*, 1980). Também foi descrita a imunorreatividade ao VIP em corpos celulares de neurônios encontrados no esôfago, intestino grosso e vesícula biliar (Larsson *et al.*, 1976; Fuxe *et al.*, 1977; Sundler *et al.*, 1977; Buffa *et al.*, 1978; Schultzberg *et al.*, 1978)

Em porcos da Guiné, é confirmada a imunorreatividade ao VIP em neurônios do íleo, cólon e estômago (Costa *et al.*, 1980). No íleo, estes autores observaram que 2,5% dos corpos celulares de neurônios do plexo mioentérico e 45% do plexo submucoso são IR-VIP. Os autores também descrevem, que axônios varicosos contendo o VIP se ramificam entre os corpos celulares dos dois plexos (mioentérico e submucoso), circundando corpos celulares que não são IR-VIP. Constataram ainda que existem numerosos axônios IR-VIP na forma de finas fibras dentro da camada muscular circular, paralelas aos feixes de fibras da musculatura lisa. Da mesma maneira, outros autores observaram em fetos humanos, no plexo mioentérico, que a maioria das fibras nervosas ganglionares expressam o VIP em fibras varicosas que frequentemente circundam os corpos celulares que não são IR-VIP (Bagyánszki *et al.*, 2002).

Os neurônios IR-VIP no plexo mioentérico além do seu papel inibitório sobre a musculatura lisa, também se projetam em direção a outros gânglios, tornando-se compreensível que uma subregulação da sua expressão possa causar alterações no reflexo peristáltico que conduzam à dismotilidade intestinal, não somente pelos seus efeitos diretos como também pela alteração produzida em outros neurotransmissores (Arciszewski *et al.*, 2009).

Vários pesquisadores apresentaram evidências farmacológicas da participação do NO (Bult *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1990; Hata *et al.*, 1990; Boeckxstaens *et al.*, 1991) e do VIP (Fahrenkrug, Haglund, *et al.*, 1978; Goyal, Said e Rattan, 1979; Grider *et al.*, 1985; Lefebvre, De Vriese e Smits, 1992) na neurotransmissão inibitória, no plexo mioentérico de vários órgãos do TGI, fornecendo forte evidência de sua co-transmissão e de seus papéis complementares no controle da motilidade intestinal (Furness *et al.*, 1992; Brehmer, Schrödl e Neuhuber, 2006), o qual é confirmado em vários modelos animais como ratos e furões (Li e Rand, 1990; D'amato, Currò e Montuschi, 1992).

Como descrito anteriormente, é observada a co-expressão de NO e VIP no TGI de ratos (Aimi *et al.*, 1993); intestino delgado de porcos da Guiné (Costa, Furness, *et al.*, 1992;

Lomax e Furness, 2000), e no intestino delgado e grosso de seres humanos (Keränen *et al.*, 1995). Existem importantes evidências de que o NO e o VIP trabalham paralelamente no TGI de cães, onde foi observada a co-localização do NO e VIP em varicosidades dentro da camada circular da musculatura lisa; resposta inibitória dependente e não dependente do NO; efeitos diretos do VIP e do NO em fibras musculares lisas (Keef *et al.*, 1994).

Essa interação entre os dois neurotransmissores também foi demonstrada no estômago de porcos da Guiné e no cólon de ratos, onde observou-se que o VIP foi antagonizado por inibidores de NO, e que o VIP estimula a produção de NO por fibras da musculatura lisa (Grider *et al.*, 1992; Grider, 1993). Outros autores também confirmam que o VIP é capaz de subregular o NO (Chandrasekharan, Nezami e Srinivasan, 2013), assim como pode induzir à produção de NO através de mecanismos pós-sinápticos, em seus efeitos sobre a musculatura lisa (Allescher *et al.*, 1996).

Embora de papéis complementares, também já foi demonstrado que o efeito inibitório do VIP e do NO podem ser induzidos de forma independente, uma vez que o efeito do VIP persiste após o bloqueio da síntese endógena do NO (Tottrup, Svane e Forman, 1991; Tøttrup, Svane e Forman, 1991; Allescher *et al.*, 1992).

O mecanismo da inibição ocorre através da ligação do VIP aos seus receptores, que induzem ao relaxamento da musculatura lisa através da elevação do AMP cíclico intracelular, que ativa a proteína quinase A, conduzindo a uma diminuição do Ca^{2+} citosólico e também a uma diminuição da contração por uma diminuição do influxo de Ca^{2+} e da sensibilidade do mecanismo contrátil pelo Ca^{2+} (Ozaki *et al.*, 1992).

Outros autores também confirmam que o VIP pode ser liberado de sinaptossomos através de um mecanismo Ca^{2+} dependente, uma vez que a liberação do VIP diminui 65% quando o Ca^{2+} é removido do meio extracelular; e que é realizada por agonistas do NO ou por mecanismos NO-dependente (Allescher *et al.*, 1996). Estes autores acreditam ainda, que a liberação de VIP é induzida por um mecanismo estimulatório pré-sináptico do NO, e que este efeito poderia aumentar ou contribuir com a ação do NO.

Quando observada a inervação da camada muscular longitudinal em porcos, 48% de todos os neurônios mioentéricos foram identificados como IR-VIP e/ou IR-nNOS (Hens *et al.*, 2002). Este resultado é bastante diferente do encontrado em porcos da Guiné, nos quais a proporção de neurônios IR-VIP para a camada muscular longitudinal é de apenas 3%, sendo verificada uma escassez de fibras IR-VIP e IR-nNOS (Brookes *et al.*, 1992). Ao ser avaliada a morfologia dos neurônios IR-VIP e IR-NOS no intestino delgado humano foi verificado que a

colocalização era encontrada entre 5,8 a 11,5% dos neurônios imunorreativos à HuC/D (IR-HuC/D) (Brehmer, Schrödl e Neuhuber, 2006).

Estas diferenças encontradas quanto à porcentagem dos tipos neuronais em modelos animais distintos devem ser levadas em consideração quanto à escolha do melhor modelo para a realização de um estudo, especialmente porque o objetivo sempre é oferecer padrões que possam ser extrapolados para o homem, mesmo que hajam diferenças.

O VIP também aparece colocalizado com outros neuropeptídeos como a ChAT, nos quais foi analisada a sua morfologia no íleo de porcos da Guiné (Costa *et al.*, 1996). Neste trabalho foi observado que todos os neurônios mioentéricos IR-VIP se projetavam em direção anal e alguns apresentavam conjuntos de varicosidades formando uma “cesta”, ao redor de outros corpos celulares de neurônios, se apresentando como IR-ChAT e VIP, os quais o autor acredita que possam ser definidos como interneurônios colinérgicos, se direcionando em sentido aboral (Costa *et al.*, 1996).

O VIP é ainda considerado um dos mais importantes elementos envolvidos na neuroplasticidade entérica (Ekblad e Bauer, 2004). Várias desordens de motilidade intestinal se originam a partir do SNE, e acredita-se que o VIP e o NO também apresentam um papel importante na sobrevivência neuronal, especialmente mantendo a integridade do SNE adulto, pois são observadas em decorrência de uma injúria neuronal e da readaptação intestinal, alterações na expressão do VIP e da nNOS em neurônios entéricos (Sandgren *et al.*, 2003). Estes autores observaram que em culturas de células mioentéricas, a adição de VIP aumenta significativamente o número de neurônios adultos sobreviventes do plexo mioentérico, por uma via que os autores acreditam que envolva também a glia entérica.

Alguns autores investigaram os efeitos de algumas patologias sobre números e proporções de neurônios IR-VIP, e observaram que em pacientes que sofrem de constipação existe uma redução no número de neurônios IR-VIP (Singaram *et al.*, 1995). Já em pacientes que apresentavam constipação por trânsito lento, foi verificado um aumento neste número (Sjölund *et al.*, 1997), como também há aumento em alguns segmentos intestinais de pacientes que sofrem com doença de Crohn (Belai *et al.*, 1997). Entretanto, no caso da colite ulcerativa, não foi verificada nenhuma alteração significativa no número de neurônios mioentéricos IR-VIP de amostras coletadas do cólon de pacientes (Neunlist *et al.*, 2003).

Estas variações observadas nas diferentes patologias através das alterações nas proporções neuronais são devidas a inúmeros fatores. Acredita-se que existe a possibilidade, de que algumas subpopulações neuronais que não são IR-VIP, possam expressar sua

imunorreatividade, em decorrência de certas patologias, gerando estes dados discrepantes; sendo possível que neurônios nitrérgicos regulem a expressão de VIP em seus corpos celulares e que também neurônios não-nitrérgicos mudem o seu “código químico” (Brehmer, Schrödl e Neuhuber, 2006).

Outros autores também descrevem o aumento no número de Neurônios IR-VIP no intestino coletado de pacientes com Doença de Crohn (Bishop *et al.*, 1980). Em contra partida, foi encontrada em outros trabalhos uma diminuição na concentração de VIP na mucosa e musculatura lisa do cólon de pacientes, associada a uma diminuição do estímulo intrínseco inibitório neural para a camada circular da musculatura (Koch, Carney e Go, 1987). Neste caso acredita-se que a alteração na musculatura tenha sido causada por uma diminuição no conteúdo de VIP, induzido pela colite causada pela Doença de Crohn (Belai *et al.*, 1997).

Neurônios mioentéricos são também afetados, por exemplo, em decorrência da ingestão de uma dieta rica em gordura, sendo que especialmente os neurônios que apresentam a nNOS e o VIP são mais susceptíveis (Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013). Da mesma forma, tratamentos hormonais nos quais foi utilizado um análogo sintético do hormônio liberador da gonadotrofina, a busarelina, podem levar a uma redução de 50% dos neurônios entéricos após 4 aplicações deste hormônio (Sand *et al.*, 2014). Neste estudo, um fato chamou a atenção dos pesquisadores, pois inicialmente foi verificado um aumento transitório no número de neurônios IR-VIP no cólon após 2 tratamentos, os quais acredita-se ser relacionado provavelmente aos efeitos anti-inflamatórios do VIP, na tentativa de controlar a perda neuronal.

Veit e Zanoni (2012) também relatam que as fibras nervosas IR-VIP são associadas às células do sistema imune participando do controle imunitário do TGI, e que tais alterações podem ser consideradas uma evidência do efeito neuroprotetor do VIP sob o SNE. Um aumento na expressão do RNAm do VIP também foi observado acompanhando mudanças adaptativas, durante o crescimento hipertrófico do intestino delgado de ratos, no qual neurônios que expressavam o VIP e o RNAm do VIP aumentaram em número (Ekblad *et al.*, 1998), enquanto no intestino atrófico estes neurônios diminuíram significativamente (Ekelund e Ekblad, 1999). Por estas razões acredita-se que o VIP promove ainda a manutenção e sobrevivência de neurônios entéricos.

O VIP apresenta um efeito inibitório não somente na contração, mas também no processo de proliferação da musculatura lisa, demonstrado após a aplicação de VIP exógeno em miócitos do cólon de coelhos e em co-culturas de neurônios mioentéricos com fibras da

musculatura lisa intestinal, nos quais verificou-se que o crescimento de fibras da musculatura lisa foi reduzido (Van Assche *et al.*, 1999). Outros autores observaram ainda que a hipertrofia das camadas da musculatura lisa intestinal é acompanhada por um aumento em número e tamanho dos neurônios IR-VIP (Dvorak *et al.*, 1980). Conclui-se então, que alterações na síntese do VIP também podem ser relacionadas como uma tentativa de controlar o processo proliferativo excessivo sobre as fibras da musculatura lisa (Lin, Sandgren e Ekblad, 2003).

É importante lembrar que no plexo submucoso, o VIP é um neurotransmissor de neurônios secreto-motores, estimulando a secreção de fluidos e eletrólitos na mucosa (Fahrenkrug, Galbo, *et al.*, 1978; Boeckxstaens *et al.*, 1992; Van Geldre e Lefebvre, 2004), sendo observado em fibras nervosas próximas às células epiteliais (Costa, Furness e Llewellyn-Smith, 1987). Além disso, o VIP também apresenta um papel anti-inflamatório, pois é capaz de regular citocinas pró-inflamatórias e mediadores como o IL-6, TNF- α , IL-12, NO e quimiocinas (Chandrasekharan, Nezami e Srinivasan, 2013). De uma maneira geral, as ações neuroprotetoras anti-inflamatórias do VIP são observadas quando ocorre uma diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias e um aumento na produção de citocinas inflamatórias (Ekblad e Bauer, 2004).

Por todas estas características, torna-se evidente que ao analisarmos os efeitos do F sobre os neurônios IR-VIP estaremos oferecendo dados importantes a respeito de alterações que podem comprometer o funcionamento da TGI, os quais podem também ajudar a explicar a sintomatologia intestinal descrita em consequência da toxicidade do F.

2.10. Substância P (SP)

Neurônios entéricos encontram-se entremeados com fibras nervosas simpáticas, parassimpáticas e sensoriais externas ao SNE, fato que torna a identificação de terminações nervosas espinais no TGI bastante complicada, uma vez que o TGI tem sua própria rede neuronal, o SNE (Spencer, Kyloh e Duffield, 2014). Adicionalmente, muitos neurotransmissores e peptídeos que são expressos nos gânglios da raiz dorsal, também são expressos em neurônios entéricos, como a Substância P (SP) (Furness e Costa, 1987), um peptídeo formado por 11 aminoácidos, da família das taquicininas (Wang *et al.*, 2006).

Quanto às fibras extrínsecas, a importância destes neuropeptídios fica evidente, pelo fato de que a sua liberação a partir dos terminais periféricos das fibras extrínsecas dá início à inflamação neurogênica, funcionando como mediadores deste processo (Sharkey e Kroese, 2001). A inflamação neurogênica é manifestada através de uma vasodilatação local,

do extravasamento de proteínas plasmáticas, degranulação de mastócitos, entre outros efeitos (Sharkey e Kroese, 2001). No que diz respeito ao SNE, muitas desordens do TGI podem estar relacionadas ao desequilíbrio das funções de neurônios que apresentam a SP e o CGRP como transmissores (Holzer, 1998).

O isolamento e a caracterização química da SP em 1970 (Chang e Leeman, 1970), seguida pela identificação da sua síntese (Tregear *et al.*, 1971), foram grandes passos para o desenvolvimento de técnicas imunohistoquímicas com o objetivo de mapear a sua distribuição e liberação (Pernow, 1983). Com estas técnicas, corpos celulares imunorreativos à SP (IR-SP) foram localizados no plexo mioentérico, os quais suprem a camada circular da musculatura lisa, a submucosa e a mucosa; enquanto no plexo submucoso estes neurônios suprem somente a mucosa (Pernow, 1983).

No intestino, a SP se origina na sua maioria de neurônios intrínsecos, sendo apenas uma pequena proporção em fibras aferentes primárias extrínsecas (Holzer e Holzer-Petsche, 1997a). A presença de neurônios IR-SP é confirmada no SNE, nos dois plexos (miotérico e submucoso) de todos os segmentos intestinais, com exceção do submucoso do ceco (Pernow, 1983).

No plexo mioentérico, neurônios que expressam a SP pertencem à classe dos neurônios sensoriais, interneurônios colinérgicos e também de neurônios secretomotores (Timmermans *et al.*, 1990). A SP atua sobre os potenciais de membrana da musculatura lisa da parede do intestino, estimulando e induzindo à sua contração por mecanismos de ação diretos; e por mecanismos indiretos, através da estimulação de neurônios colinérgicos (Holzer e Lembeck, 1980). A substância P também é um importante vasodilatador e afeta o fluxo sanguíneo na parede intestinal (Llewellyn-Smith *et al.*, 1984).

A SP é liberada a partir de neurônios extrínsecos, neurônios entéricos e células inflamatórias da lâmina própria durante a inflamação intestinal, participando desse processo ao interagir com os receptores NK1, expressos também em neurônios; células epiteliais; células imunes e inflamatórias como mastócitos; macrófagos e células T (Mantyh *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 2002). A ativação dependente da SP que acontece nestas células, leva à liberação de citocinas e quimiocinas assim como outros peptídeos que modulam a diarreia, a inflamação e a motilidade em decorrência de inúmeras patologias (Koon e Pothoulakis, 2006).

No íleo de porcos da Guiné, por exemplo, a SP está presente tanto nas fibras aferentes primárias extrínsecas, quanto nos neurônios entéricos (Miller *et al.*, 1993). Neste estudo de Miller *et al.* (1993), utilizando um modelo de ileíte, verificou-se que existe uma

redução inicial na imunorreatividade da SP (nas primeiras 24 horas após a indução da ileíte), seguido por um aumento gradual na intensidade e imunorreatividade das fibras nervosas, e um aumento na quantidade de SP expressa, que é primeiramente observado nos neurônios entéricos e depois nas fibras aferentes primárias, até que em 21 a 30 dias o padrão volta ao normal (Miller *et al.*, 1993).

A SP e o CGRP são requeridos para homeostase da mucosa intestinal e para uma resposta apropriada à qualquer agressão ao intestino, uma vez que a ablação destes neurônios sensoriais anteriormente à aplicação de um estímulo danoso, como a radiação, por exemplo, exacerba significativamente os danos ao intestino, em comparação ao intestino de animais que apresentam seus neurônios sensoriais intactos (Wang *et al.*, 2006).

Wang *et al.* (2006) acreditam que estes neurônios que apresentam a SP e o CGRP liberam uma grande quantidade de peptídeos que regulam os processos neuro-imunes tanto direta quanto indiretamente. Além disto, estes dois neurotransmissores são particularmente importantes no que diz respeito à inflamação intestinal e ao processo de reparo à qualquer injúria. Com o objetivo de interagir com células da resposta imune e inflamatória, o CGRP e a substância P também agem sobre células endoteliais e epiteliais (Paris *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que a SP age como um co-neurotransmissor, apresentando um papel importante na manutenção da responsividade à ACh, porém os dois neurotransmissores não agem em paralelo para estimular a musculatura lisa do TGI, mas em uma interação mais complexa (Li *et al.*, 2014).

A SP contribui com a excitação da musculatura lisa, mas tem um papel secundário quando comparada à ACh (Moreira *et al.*, 2013). Neurônios motores excitatórios co-expressam ACh e SP, e ambos neurotransmissores podem induzir à contração da musculatura lisa, uma vez que já foi demonstrado que na ausência de alguns receptores para a ACh, por exemplo, a SP compensa a falta da transmissão colinérgica gerada pela acetilcolina ao se ligar a outros receptores (Matsui *et al.*, 2014). Embora este mecanismo compensatório seja conhecido, a interação desses dois neurotransmissores, ou seja, como a liberação de um pode afetar a do outro, ainda é pouco explorada (Li *et al.*, 2014).

No que diz respeito à contração da musculatura, os sítios receptores para a SP e o VIP existem nas fibras musculares, porém em pouca quantidade, mas como os efeitos da SP e do VIP são determinantes para a contração da musculatura, embora os neurônios que apresentam a SP e o VIP raramente se projetam para a camada longitudinal da musculatura

lisa, deduziu-se que os mesmos produzam seus efeitos ao agir sobre outros neurônios entéricos (Yau, Youther e Verdun, 1985).

Fibras nervosas IR-SP formam sinapses em corpos celulares de neurônios e processos nervosos (axônios e dendritos) em vários modelos animais como ratos (Fehér, Léránth e Williams, 1984) e gatos (Fehér e Wenger, 1981), assim como também nos gânglios mioentéricos humanos (Llewellyn-Smith, Furness e Costa, 1989).

Llewellyn-Smith, Furness e Costa (1989) apresentaram uma descrição geral, com axônios e corpos celulares de neurônios IR-SP tanto no plexo mioentérico quanto no plexo submucoso do intestino delgado, onde verificaram nos gânglios do plexo mioentérico uma grande quantidade de fibras nervosas IR-SP ao redor de corpos de neurônios e células da glia, como descrito por Furness *et al.* (1988).

Os pesquisadores observaram ainda a influência da SP no intestino delgado pela presença de pelo menos uma vesícula IR-SP contraposta à cada corpo celular do plexo mioentérico (Llewellyn-Smith, Furness e Costa, 1989). Neste estudo porém, realizados em porcos da Guiné, os segmentos intestinais não foram avaliados separadamente, uma vez que acreditava-se que o padrão de distribuição era homogêneo em todo o intestino delgado. Os autores ainda afirmam que, embora poucas varicosidades IR-SP façam sinapses, as sinapses da SP compõem uma grande proporção do total de sinapses do plexo mioentérico, em torno de 47%, sendo estas na sua grande maioria, a partir de fibras nervosas contendo SP, e em poucos corpos celulares ou processo nervosos não vesiculares contendo SP.

Neste trabalho de Llewellyn-Smith, Furness e Costa (1989), a ultraestrutura foi avaliada e observou-se que as fibras IR-SP apresentavam vesículas de tamanhos variáveis, sendo a sua maioria de pequeno tamanho. A importância da distribuição destas vesículas está no fato de que 66% das vesículas mioentéricas do intestino delgado de porcos da Guiné que apresentam neuropeptídios são IR-SP. Observou-se ainda que as fibras nervosas IR-SP representam cerca de metade das fibras da camada muscular circular, as quais tem seus corpos celulares no plexo mioentérico, sendo estas fibras consideradas as responsáveis pelos efeitos da SP como uma molécula excitatória da musculatura lisa, e portanto, da motilidade intestinal.

Costa *et al.* (1981) também realizaram uma descrição genérica dos efeitos da SP no plexo mioentérico de porcos da Guiné, na qual relatam que os corpos celulares IR-SP representam uma pequena parcela dentro da população geral de neurônios, em torno de 3,6%, enquanto no plexo submucoso formam 11,3% dos neurônios. Neste trabalho, ao ser realizada a desnervação extrínseca, não foram detectadas alterações significativas na distribuição dos

neurônios IR-SP no plexo mioentérico, tanto na musculatura longitudinal quanto na circular; com uma pequena diminuição no plexo submucoso. Dessa forma, os autores acreditam que a maioria das fibras nervosas IR-SP está contida na inervação intrínseca, e logo a desnervação extrínseca IR-SP não altera a concentração de SP no plexo mioentérico.

Ainda neste estudo de Costa *et al.* (1981), foi constatado que raras fibras nervosas IR-SP são encontradas dentro da camada longitudinal da musculatura lisa, enquanto a camada circular é ricamente suprida por estas fibras. A SP é um dos mais importantes agentes sobre a contração da musculatura lisa intestinal, e embora a camada longitudinal da musculatura lisa não apresente tantas fibras IR-SP, os autores acreditam que em porcos da Guiné, a mesma é alcançada pela SP liberada, no plexo mioentérico, por difusão (Costa *et al.*, 1981).

Pernow (1983) também concordam com estes achados, e afirmam que no intestino delgado, a maior densidade das fibras nervosas IR-SP é encontrada na camada muscular circular, enquanto uma menor frequência é verificada na camada muscular longitudinal e na lâmina própria. Porém somente uma pequena parte dos neurônios entéricos expressa a SP, sendo no plexo mioentérico de 3 a 5%, e de 3 a 11% no plexo submucoso.

Todas as regiões do TGI e cada uma das camadas musculares recebem inervação excitatória, sendo a ACh o principal neurotransmissor excitatório (Kilbinger *et al.*, 2002). Ao serem aplicados antagonistas muscarínicos, verifica-se que realmente existe um componente muscarínico importante, porém ainda é observado que mesmo com a aplicação deste antagonista existe uma excitação residual, a qual é realizada predominantemente por taquicininas, provavelmente a SP, ou até mesmo uma mistura de SP e neurocinina A (NKA) (Yau, Youther e Verdun, 1985). Junte-se a isto, muitos neurônios motores são IR-ChAT e para taquicininas (Furness, 2000), o que também confirmaria esta interação.

As taquicininas são predominantemente liberadas por neurônios entéricos, exercendo um efeito potente sobre a musculatura lisa do TGI através de sua ligação aos seus receptores distribuídos em neurônios entéricos e na musculatura lisa, modulando canais iônicos e produzindo mensageiros secundários (Barthó e Holzer, 1985). No TGI, o maior efeito das taquicinas, é descrito como aquele que afeta a motilidade, o qual pode ser inibido ou estimulado, dependendo do tipo e localização do receptor que é ativado (Beek *et al.*, 2007; Ter Beek *et al.*, 2007). A substância P exerce seus efeitos se ligando ao receptor NK1 que é um receptor acoplado à proteína G (Wang *et al.*, 2006).

É descrito que a SP produzida no SNE medeia a inflamação neurogênica entérica ao se ligar a receptores NK, conduzindo à vasodilatação, extravasamento plasmático e

migração leucocitária. Embora a SP se ligue com alta afinidade ao receptor NK1, ela também interage com menor afinidade sobre os receptores NK2 e NK3 (Maggi *et al.*, 1993). Estes três receptores são encontrados no TGI, e embora o NK1 seja o que apresenta maior afinidade para a SP, o NK2 também foi identificado tanto em células da musculatura lisa quanto em terminações nervosas (Portbury *et al.*, 1996).

A presença de receptores pré-sinápticos em terminais nervosos modulando a liberação de um transmissor classifica estes receptores como autoreceptores, quando se encarregam de regular a liberação do próprio transmissor (Vannucchi, Corsani e Faussone-Pellegrini, 2000). No trabalho de Vannucchi *et al.* (2000), estes autores descrevem que no íleo de porcos da Guiné, alguns receptores da SP em terminações nervosas são autoreceptores, em neurônios que acredita-se serem motores, o que indica mais uma função da SP, pois através destes receptores a SP seriam capaz de autorregular sua liberação. Foi observado também, que as fibras nervosas varicosas são encontradas nas camadas musculares e no plexo mioentérico profundo, e estão distribuídas ao redor de células intersticiais de Cajal (ICCs), evidenciando a possível interação com estas células e seu papel na contractilidade muscular.

Confirmou-se neste trabalho, que no TGI a SP age preferencialmente através de sua ligação nos receptores NK1, assim como também foi descrito que as fibras varicosas IR-SP eram identificadas no plexo mioentérico e no plexo submucoso, assim como na musculatura, especialmente na camada muscular circular, onde formam uma grande rede, se associando aos processos e corpos de ICCs (Vannucchi, Corsani e Faussone-Pellegrini, 2000).

ICCs geram a atividade elétrica rítmica nos músculos do TGI, por ondas lentas (Huizinga *et al.*, 1995). Estas ondas lentas se propagam dentro das redes das ICCs, sendo conduzidas para a musculatura lisa através de “gap junctions”, e iniciam as contrações da musculatura lisa pela ativação decorrente da entrada de Ca^{2+} através de canais de cálcio do tipo L (Daniel, 2001). Neste mecanismo mediado pelas ICCs a SP aumenta a frequência e a duração das ondas lentas; ativa canais catiônicos não seletivos em ICCs; assim como modula correntes de íons em canais catiônicos não-seletivos em neurônios sensoriais primários (Kim *et al.*, 2012).

Em camundongos, as células mióides formam uma rede dentro dos vilos intestinais, agindo similarmente às ICC, se contraindo de uma maneira rítmica, com sensores de estiramento, respondendo à dilatação com um aumento da contração. Estas células mióides também apresentam receptores NK1 e dessa forma também podem ser suscetíveis aos efeitos

da SP, sendo este mais um mecanismo que pode sofrer a influencia da SP e levar às alterações da motilidade (Faussone-Pellegrini e Vannucchi, 2006).

Corpos celulares IR-SP e IR-VIP estão altamente concentrados no plexo mioentérico, porém poucas projeções penetram a camada longitudinal da muscular lisa, sendo que no plexo mioentérico a maioria dos efeitos produzidos por estes dois neuropeptídios são colinérgicamente mediados (Yau, Youther e Verdun, 1985). Este achado é comprovado por estes autores, ao demonstrar que a SP age como um modulador dos neurônios colinérgicos, dado que foi observada a liberação de ACh no plexo mioentérico quando estimulada pela SP, produzindo contração da musculatura lisa.

Este estudo de Yau *et al.* (1985) ainda revelou, que tanto a SP quanto o VIP estimulam a liberação de ACh de neurônios mioentéricos pela interação com sítios receptores localizados em terminais colinérgicos pré-sinápticos, a partir de sinaptossomos mioentéricos. Yau *et al.* (1985) avaliaram ainda o efeito da aplicação de tetradoxina sobre a SP e o VIP, a qual inibe o potencial de ação a partir de terminações nervosas; e observou-se que mesmo com esta inibição, havia uma despolarização induzida localmente. Portanto, os pesquisadores apresentaram evidências de que a SP funciona como um modulador dos neurônios colinérgicos, tanto pela demonstração de que existe uma liberação de ACh a partir do plexo mioentérico estimulada pela SP; quanto pela contração mecânica observada como um antagonismo à presença da SP (Holzer e Lembeck, 1980).

Outros autores também apontam para a SP como responsável pela resposta excitatória não colinérgica e relatam que a SP supre ricamente a camada muscular circular, incluindo o plexo muscular profundo, o qual se localiza entre as fibras musculares e adjacente à submucosa, com axônios que surgem de corpos celulares em gânglios do plexo mioentérico (Furness *et al.*, 1981a). Neste estudo de Furness *et al.* (1981), foi observado no plexo mioentérico que axônios varicosos formam uma densa rede ao redor de todos os corpos celulares em um gânglio, sendo a densidade da inervação feita pela SP considerada como maior do que a de outros neuropeptídios como o VIP e a somatostatina. Foi descrito ainda, que uma grande rede de fibras varicosas IR-SP se origina de neurônios, na maioria, no plexo mioentérico, sendo que a maiorias destes axônios varicosos surgem de corpos celulares de gânglios adjacentes, não percorrendo distâncias maiores do que 1mm, se projetando nas direções oral-anal e anal-oral.

Em outro estudo com o alvo no intestino humano foi observado em amostras coletadas do intestino, de pacientes que passaram por ressecção do cólon em decorrência de

alguma patologia, que ambas as camadas da musculatura lisa apresentavam finas fibras IR-SP que corriam paralelas às fibras musculares. O plexo mioentérico continha alguns neurônios IR-SP e poucas fibras IR-SP (Vento *et al.*, 2001).

Ainda neste trabalho (Vento *et al.*, 2001), em amostras de cólon coletadas de pacientes com colite ulcerativa, ao ser avaliada a região menos afetada por esta patologia, foi observado um aumento no número de fibras nervosas IR-SP na lâmina própria, quando comparadas com amostras de cólon de pacientes normais. Nesta mesma região foram também analisadas outras áreas como a muscular da mucosa, submucosa, as camadas de musculatura lisa e os dois plexos, em que não foi observada diferença entre o cólon de pacientes com colite ulcerativa quando comparado com pacientes sem colite, no que diz respeito às fibras IR-SP.

Em amostras ressectadas de regiões moderadamente afetadas pela colite ulcerativa o número de fibras nervosas IR-SP na lâmina própria foi significativamente maior e as mesmas também apresentavam maior intensidade do que os outros grupos (pacientes normais e pacientes com o cólon menos afetado pela colite). A muscular da mucosa também parecia espessada e contendo muitos fragmentos de muitas fibras nervosas. A área mais severamente afetada, a qual continha somente vilos destruídos ou nenhum vilo, mostrou poucos fragmentos ou nenhuma fibra IR-SP. As áreas da camada submucosa, das camadas musculares e dos gânglios mioentéricos e submucosos era similar ao cólon normal (Vento *et al.*, 2001).

Com este trabalho de Vento *et al.* (2001), a partir das amostras coletadas de pacientes com colite ulcerativa, acredita-se que o aumento da imunorreatividade da SP na lâmina própria é provavelmente o resultado de um aumento na síntese de SP, que também teria feito com que aumentasse a densidade das fibras IR-SP e também que as mesmas se tornassem mais visíveis. Os autores acreditam que outros possíveis mecanismos que poderiam gerar as alterações nas fibras IR-SP, e que podem ser considerados, são o aumento do transporte pelo axônio e redistribuição da SP dentro do terminal, ou a modulação de endopeptidases responsáveis por catalisar a clivagem para a eliminação da SP.

No jejuno de coelhos, a SP também é reconhecida como um neurotransmissor que modula a contração da musculatura lisa, sendo descrito que no intestino delgado tanto a camada longitudinal quanto a circular da musculatura lisa são supridas por fibras nervosas localizadas no plexo mioentérico (Arciszewski *et al.*, 2009). Neste estudo, verificou-se uma redução no número de fibras IR-SP que se projetam para a musculatura lisa, o poderia ser uma

das razões da dismotilidade intestinal persistente, observada em decorrência de um processo infeccioso causado por parasita.

Esta plasticidade das fibras nervosas IR-SP em estados inflamatórios indica que alterações, como o aumento do número e da densidade das fibras IR-SP, progridem na fase ativa da doença, fato que confirma o papel da SP como um mediador do processo inflamatório, especialmente como um agente pró-inflamatório (Godlewski e Kaleczyc, 2010). Estes autores acreditam ainda que esta característica pro-inflamatória da SP também pode ser confirmada por um aumento no conteúdo de SP na parede do intestino, o qual induz à inflamação neurogênica, pela dilatação dos vasos sanguíneos, degranulação de mastócitos e liberação de histamina da membrana mucosa.

Tanto pelos seus efeitos sobre a motilidade quanto pela sua participação no desenvolvimento de processo inflamatórios em toda a parede do intestino, torna-se importante avaliar a resposta da SP frente a quaisquer processos que possam comprometer a fisiologia intestinal como é o caso da toxicidade do F.

2.11. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

O CGRP é um dos mais potentes vasodilatadores endógenos conhecidos (Wimalawansa, 1996). Este peptídeo controla o desenvolvimento da aterosclerose através da inibição da proliferação de células vasculares na musculatura lisa (Li *et al.*, 1997), sendo este efeito sinergicamente aumentado pelo NO (Wang *et al.*, 1999). O CGRP também está envolvido na regulação da pressão sanguínea, e a deleção do seu gene resulta em hipertensão (Gangula *et al.*, 2000), logo, uma diminuição nos níveis de CGRP induz a uma resposta nos vasos sanguíneos, e no caso do envelhecimento, onde pode ocorrer uma diminuição na sua expressão, existe um aumento no risco do desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão (Chan e Fiscus, 2002).

Formado por 37 aminoácidos, o CGRP foi inicialmente isolado a partir de extratos do hipotálamo (Rosenfeld *et al.*, 1983), e se encontra distribuído tanto no SNC quanto no SNP, e faz parte da inervação sensitiva e motora (Fehér *et al.*, 1986).

Evidências neuroanatômicas e farmacológicas têm mostrado que o CGRP, produzido por uma expressão alternativa do gene da calcitonina (Amara *et al.*, 1982; Rosenfeld *et al.*, 1983), apresenta um papel crucial em muitas funções regulatórias fisiológicas e patológicas no SNE de espécies de vertebrados, incluindo a regulação do controle da musculatura lisa gastrointestinal e motilidade (Palmer *et al.*, 1986; Barthó,

Lembeck e Holzer, 1987; Rasmussen *et al.*, 1992; Grider, 1994); funções sensoriais (Sternini, 1991; Rasmussen *et al.*, 2001b); microcirculação intestinal (Vanner, 1994; Kawasaki, 2002), secreção (Taché, 1992); microcirculação linfática e função linfocitária (Ichikawa *et al.*, 1994).

No intestino delgado de porcos da Guiné, fibras nervosas contendo o CGRP foram também encontradas, e seu papel dentro do TGI destes animais foi confirmado como relacionado tanto à atividade de regulação da contração da musculatura lisa, quanto da secreção mucosa intestinal (Fehér *et al.*, 1986).

O CGRP está presente em neurônios do SNE e é particularmente abundante em nervos do plexo mioentérico (Clague, Sternini e Brecha, 1985). Outros estudos também confirmam que o CGRP é capaz de excitar neurônios do plexo mioentérico (PALMER *et al.*, 1986) e estimular a liberação de ACh nesses neurônios (MULHOLLAND e JAFFER, 1990).

Até pouco tempo atrás, poucos estudos estavam disponíveis a respeito do efeito do CGRP na motilidade gastrointestinal (RASMUSSEN, T. N. *et al.*, 2001). Em um trabalho em que foram testados os efeitos do CGRP sobre a motilidade intestinal foi observado, após a aplicação de CGRP sobre preparações contendo o plexo mioentérico e a camada muscular longitudinal (preparados totais), que o CGRP causava uma despolarização de longa-duração nas membranas celulares; levando também a um aumento na resistência da membrana à entrada de íons, supressão dos potenciais após despolarização e aumento da excitabilidade em todos os neurônios (Palmer *et al.*, 1986). Neste trabalho, os autores destacam que o aumento da excitabilidade foi notado devido a um b aumento no número dos potenciais de ação gerados pela injeção intracelular de pulsos despolarizantes e também por uma sucessão de picos que aparecem na crista da despolarização induzida pelo CGRP.

A ação excitatória do CGRP estimula a excitação sináptica lenta, caracterizando o CGRP como um neurotransmissor e também como um neuromodulador do SNE, sugerindo que este peptídeo participa na regulação neuro-humoral do sistema efetor do TGI (Palmer *et al.*, 1986).

É comprovada a existência de fibras imunorreativas ao CGRP (IR-CGRP) nas camadas da musculatura lisa do intestino de peixes a mamíferos, indicando o envolvimento do CGRP no controle da musculatura lisa do TGI dos vertebrados (Ohtani *et al.*, 1989). Neste estudo de Ohtani *et al.* (1989) foi verificada a presença de fibras IR-CGRP no intestino delgado de diferentes vertebrados, sendo que nos mamíferos, foi observado que tanto o plexo mioentérico quanto o plexo submucoso estavam repletos de fibras nervosas IR-CGRP. Também foram observados gânglios IR-CGRP e fibras varicosas ao redor dos gânglios, sendo

que corpos celulares só foram verificados quando a colchicina foi aplicada nos animais antes do sacrifício, pois a mesma aumenta a imunorreatividade de alguns anticorpos nos corpos celulares. Em outro estudo realizado em ratos, são observados poucos corpos celulares de neurônios IR-CGRP e IR-SP no plexo mioentérico (Sand *et al.*, 2014).

Estudos com o objetivo de identificar a distribuição da inervação intrínseca do CGRP apresentam a sua imunorreatividade em vários modelos animais distintos, nos quais são verificados padrões diferentes. O íleo de cavalos, por exemplo, apresenta neurônios contendo o CGRP somente no plexo submucoso (Chiocchetti *et al.*, 2009). No intestino delgado de camundongos, os neurônios IR-CGRP representam aproximadamente 28% dos neurônios do plexo mioentérico (Qu *et al.*, 2008). Em outros modelos animais como caprinos, o plexo mioentérico apresenta 6% de neurônios IR-CGRP (Chiocchetti *et al.*, 2006), sendo de 15% em suínos (Pidsudko *et al.*, 2008).

No cólon de ratos, os neurônios IR-CGRP do plexo mioentérico apresentam a morfologia Dogiel tipo II (Mitsui, 2011), que caracteriza grandes corpos celulares, com 3-10 dendritos e um axônio (Furness e Costa, 1987). Neste trabalho, Mitsui (2011) verificou que estes corpos celulares também são imunorreativos à calretinina, e se projetam em direção à mucosa intestinal, mediando os reflexos da motilidade intrínseca que são evocados pela estimulação da mucosa no cólon de ratos. Por estes achados, o autor confirma que no cólon de ratos o CGRP é um mediador do reflexo intrínseco da motilidade; e que os reflexos peristálticos evocados por estímulos químicos e mecânicos, aplicados à mucosa intestinal, podem ser mediados por neurônios aferentes primários do plexo mioentérico. Mitsui (2011) ainda confirma a imunorreatividade ao CGRP em neurônios Dogiel tipo II dos plexos mioentérico e submucoso humano.

A via entérica neuronal envolvida no peristaltismo está sujeita à modulação de hormônios, neurônios eferentes e aferentes primários (Furness e Costa, 1987), e as implicações de alguns destes estímulos extrínsecos podem ser avaliadas utilizando a capsaicina, que exerce efeitos excitatórios e inibitórios sobre a motricidade do intestino (Barthó e Szolcsányi, 1978; Maggi, Meli e Santicioli, 1987).

O CGRP e a substância P são amplamente distribuídos em terminações de nervos sensoriais no TGI e são os maiores neurotransmissores em neurônios sensíveis à capsaicina (Wang *et al.*, 2006).

As ações específicas da capsaicina se iniciam com uma rápida dessensibilização, enquanto os efeitos de altas concentrações refletem uma depressão não-específica da

contractilidade da musculatura lisa (Barthó, Lembeck e Holzer, 1987). Ao se utilizar um antagonista do CGRP observou-se que foi atenuado o efeito tardio inibitório da capsaicina no peristaltismo, mas não houve influencia deste antagonista na atividade peristáltica básica que é o efeito estimulante inicial da capsaicina (Bartho e Holzer, 1995).

Sternini *et al.* (1987) avaliaram a distribuição e realizaram a caracterização da imunorreatividade ao CGRP no TGI de ratos. Estes autores avaliaram ratos normais e também animais em que era aplicada a capsaicina, com o objetivo de observar o comportamento do CGRP no estômago e no reto. A capsaicina causa a degeneração da maioria dos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, e em ratos neonatos causou uma redução no conteúdo de CGRP maior que 95% no esôfago e no estômago, e de 50% no intestino, sendo estes dados obtidos de extratos desses órgãos. Os autores (Sternini, Reeve e Brecha, 1987) também observaram que no esôfago e estômago, o CGRP é restrito às fibras nervosas, enquanto no intestino é localizado tanto nas fibras nervosas, quanto nos corpos celulares de neurônios. Em ratos tratados com a capsaicina, a qual receberam em solução via oral, houve uma completa eliminação das fibras nervosas IR-CGRP que inervam o esôfago e estômago, enquanto no intestino grosso e delgado houve uma eliminação nas fibras IR-CGRP associadas aos vasos sanguíneos e uma leve redução nas fibras que não eram associadas aos vasos sanguíneos. Os autores confirmaram a IR-CGRP em fibras extrínsecas e intrínsecas.

Outros pesquisadores avaliaram a imunorreatividade ao CGRP no intestino delgado humano e confirmaram a sua presença em corpos celulares e em feixes de fibras nervosas, tanto no plexo mioentérico quanto no plexo submucoso (Timmermans *et al.*, 1992). Os corpos celulares foram preferencialmente encontrados na periferia dos gânglios, com alguns na periferia de feixes interconectantes. Os corpos celulares foram abundantes no plexo submucoso, porém concentrados na porção interna e intermediária; enquanto eram escassos na parte intermediária deste plexo. Quanto ao plexo mioentérico, estes corpos celulares eram bastante raros.

Timmermans *et al.* (1992) avaliaram o jejuno e o íleo e não observaram muita diferença no número de corpos celulares e fibras nervosas IR-CGRP, porém, quanto às fibras varicosas, no plexo mioentérico foram observadas áreas densamente inervadas, localizadas na periferia dos gânglios ou nas fibras interconectantes, circundando corpos celulares que eram fracamente ou não marcados pelo CGRP. As fibras nervosas IR-CGRP estavam na sua maioria dentro dos plexos nervosos. Somente uma pequena parte das fibras nervosas se encontrava na lâmina própria e nas camadas da musculatura lisa. O plexo terciário da rede

mioentérica, o qual acredita-se que tenha uma grande importância na inervação da camada circular da musculatura lisa, não apresentou fibras IR-CGRP. A maioria dos vasos sanguíneos apresentou fibras IR-CGRP nas suas proximidades.

Timmermans *et al.* (1992) relataram que havia uma menor quantidade de fibras IR-CGRP no plexo mioentérico que no plexo submucoso. Ao comparar com o intestino delgado de porcos, observou que a musculatura lisa, especialmente a camada circular; a muscular da mucosa e a lâmina própria eram menos supridas por fibras IR-CGRP no intestino delgado humano do que no intestino de porcos. Também foi observada uma grande quantidade de fibras IR-CGRP que apresentavam origem extrínseca, como a maioria dos animais de laboratório (Furness e Costa, 1987). A abundância de fibras IR-CGRP também sugere que o CGRP produza efeitos em outros tipos de neurônios entéricos, e pode estar envolvido indiretamente na motilidade intestinal e transporte de água e íons. Quanto ao plexo submucoso, acredita-se que pelo fato do CGRP inibir a secreção gástrica no homem é possível que desempenhe um papel semelhante em células enteroendócrinas.

No Intestino delgado de ratos, outros pesquisadores verificaram que a distribuição das fibras IR-CGRP apresentavam o mesmo padrão para o duodeno, jejuno e íleo; com processos varicosos presentes tanto na camada longitudinal quanto na circular, com a mesma orientação das fibras musculares (Clague, Sternini e Brecha, 1985). Os autores observaram também que tanto no plexo mioentérico quanto no plexo submucoso, processos IR-CGRP são numerosos e circundam corpos celulares não-marcados. Os pesquisadores ainda verificaram processos direcionados à submucosa e à muscular da mucosa. Fibras IR-CGRP também foram identificadas ao redor de artérias e arteríolas, localizadas na serosa, musculatura lisa e submucosa. Neste trabalho ainda é confirmado que o tratamento com a capsaicina resulta em uma pequena diminuição nos efeitos do CGRP, sugerindo que este neuropeptídeo esteja presente em diversas classes de neurônios que inervam diferentes regiões do TGI.

Outros trabalhos realizados com ratos também mostraram que neurônios IR-CGRP apresentam no plexo mioentérico projeções tanto para o próprio plexo quanto para a camada circular da musculatura lisa (Belai e Burnstock, 1987; Ekblad *et al.*, 1987); assim como também foi verificada a presença de fibras extrínsecas IR-CGRP; sugerindo que este neuropeptídeo apresente um papel importante na motilidade do TGI.

É importante lembrar que, no que diz respeito ao TGI, existe uma diferença variável quanto à densidade e a inervação, em diferentes espécies (Sharkey, 1992). Na

mucosa gástrica e duodenal humana, por exemplo, não existe imunorreatividade ao CGRP (Sundler, Ekblad e Håkanson, 1991).

Holzer *et al.* (1989) avaliaram o efeito do CGRP sobre a camada circular da musculatura lisa de porcos da Guiné e descrevem que o CGRP inicia as contrações fásicas na musculatura devido à estimulação de neurônios colinérgicos; enquanto o peristaltismo é inibido pelo CGRP. Foi confirmado pelos autores, que o CGRP não apresentava efeito inibitório sobre a via colinérgica, considerada a principal da contração entérica reflexa ascendente, mas na realidade exerce uma leve influencia no reflexo entérico ascendente, que envolve tanto os neurônios colinérgicos motores quanto os interneurônios. Apesar da excitação nervosa mediada pela camada circular da musculatura lisa, o peristaltismo é levemente inibido pelo CGRP, sendo esta uma consequência da excitação exercida pelo CGRP à inervação colinérgica (Holzer *et al.*, 1989).

De acordo com Holzer *et al.* (1989), as contrações fásicas da musculatura lisa produzidas pelo CGRP resultam da ativação de nervos e são mediadas por neurônios motores colinérgicos e a transmissão neuroefetora através de receptores muscarínicos da acetilcolina. Adicionalmente, interneurônios colinérgicos e a neurotransmissão através de receptores nicotínicos da acetilcolina também participam, pelo menos em parte, da resposta contrátil ao CGRP (Holzer *et al.*, 1989).

Portanto, agindo através de diferentes mecanismos, o CGRP supre as camadas longitudinal e circular, evidenciando que participa da regulação da motilidade intestinal (Holzer *et al.*, 1989). A ação predominante do CGRP na camada longitudinal da musculatura lisa é o relaxamento (Barthó, Lembeck e Holzer, 1987; Maggi *et al.*, 1987). Entretanto, no íleo de porcos da Guiné, o CGRP pode causar uma leve contração na musculatura longitudinal que resulta da estimulação de neurônios mioentéricos específicos (Tippins *et al.*, 1984; Palmer *et al.*, 1986; Barthó, Lembeck e Holzer, 1987), por mecanismos explicados anteriormente.

Holzer (1998) observou que os agonistas do CGRP e SP são pouco ativos no TGI em seu estado normal, mas são capazes de corrigir as alterações da motilidade, aumento da secreção, homeostase do tecido e dor que são associadas a processos como infecção ou inflamação. Ao ser avaliada a distribuição da SP e do CGRP na colite induzida em ratos, utilizando TNBS, foi observado que a imunorreatividade à SP e ao CGRP era grandemente diminuída, tanto na mucosa quanto nas camadas musculares a partir do 1º ao 7º dia (Sharkey, 1992). Neste estudo, ao 14º dia, foram observadas uma reinervação das camadas musculares

com fibras IR-SP e ao CGRP. Esta reinervação foi considerada expressiva e consistente com a restituição das fibras nervosas. Os autores acreditam ainda que o aumento na produção destes peptídeos envolve citocinas e interleucinas que são elevadas no modelo de colite.

Por ser um importante vasodilatador, o CGRP protege o intestino de uma variedade de agressões e acelera a recuperação através do aumento do fluxo sanguíneo (Pawlik *et al.*, 2000); assim como também inibe as vias que promovem o edema de vários mediadores inflamatórios, incluindo a histamina, leucotrieno B4, serotonina (Raud *et al.*, 1991). Em ratos tratados com capsaicina é verificado um dano maior à mucosa exposta ao etanol (Holzer, Livingston e Guth, 1991). Porém, ao ser administrada a capsaicina de forma intra-gástrica, em dose aguda, existe uma liberação de SP e CGRP que protegem o estômago dos efeitos do etanol, através de um mecanismo que envolve um aumento no fluxo sanguíneo.

Quando a mucosa do TGI é afetada por estímulos danosos, fibras nervosas sensoriais intrínsecas liberam CGRP e NKA, os quais aumentam a resistência da mucosa às lesões, através de mecanismos que envolvem o NO, vasodilatação e hiperemia (Holzer, 1998).

Expresso também em fibras nervosas aferentes extrínsecas, o CGRP pode ser liberado em resposta a estímulos irritantes no TGI (Holzer, 1998). A liberação de taquicinas e CGRP dentro da parede dos órgãos do TGI facilita a sensibilização e a excitação de fibras aferentes extrínsecas (Plourde, St-Pierre e Quirion, 1997), assim como também promove a transmissão nociceptiva entre as fibras aferentes com neurônios da medula espinal (Bueno *et al.*, 1997).

Estas respostas das fibras extrínsecas são desencadeadas em decorrência de processos como infecção e inflamação, interferindo com a motilidade, comprometendo, por exemplo, o peristaltismo (Holzer, 1998).

Dada a quantidade de mecanismos importantes com os quais o CGRP está envolvido no TGI, torna-se relevante avaliar os efeitos de quaisquer processos sobre a sua subpopulação neuronal entérica. Informações a respeito do comportamento do CGRP podem fundamentar a compreensão, no caso do presente estudo, dos mecanismos envolvendo a toxicidade do F e sua grave sintomatologia no TGI.

2.12. Análise proteômica

Proteínas são representadas por centenas de modificações pós-traducionais, cujos estados funcionais variam, dependendo de alterações na conformação, mecanismos de

transporte envolvidos e translocação (Walsh, Garneau-Tsodikova e Gatto, 2005; Reinders e Sickmann, 2007).

Devido à necessidade de caracterizar um amplo número de proteínas nos organismos vivos, vários cientistas buscaram desenvolver novos métodos para a análise deste grande conjunto, denominado proteoma (Cravatt, Simon e Yates, 2007). A análise proteômica surge como um método com o objetivo de caracterizar e analisar o proteoma de procariontes e eucariontes, os quais apresentam inúmeras proteínas com funções não caracterizadas ou pleiotrópicas (Whisstock e Lesk, 2003).

A técnica proteômica permite a compreensão das redes de proteínas e das interações celulares através do proteoma de células, tecidos e fluidos biológicos, por exemplo, fornecendo a identificação de um grupo de proteínas, principalmente com o objetivo de caracterizar biomarcadores de processos fisiológicos ou patológicos (Vaiopoulou *et al.*, 2012). Biomarcadores são moléculas utilizadas para diagnóstico ou prognóstico em resposta a intervenções terapêuticas, que permitem a caracterização e monitoramento de importantes vias dentro do organismo (Ray *et al.*, 2012). A identificação dessas moléculas deve ser acurada, pois podem ser utilizadas para a detecção precoce de várias doenças importantes como o câncer e doenças autoimunes relevantes, assim como para a caracterização de processo patológicos, por exemplo.

Tecnologias proteômicas como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas (MS) são poderosas ferramentas para a identificação de biomarcadores, inclusive de patologias do TGI como a doença do intestino irritável, por exemplo (Alex, Gucek e Li, 2009). Da mesma forma, a associação da técnica de cromatografia líquida com a MS fornece uma poderosa ferramenta para a descoberta e análise de biomarcadores (Vaiopoulou *et al.*, 2012). A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas é um método de análise amplamente utilizado, devido a sua alta capacidade de separação, sensibilidade e seletividade (Zhu *et al.*, 2013).

Todos os estudos proteômicos apresentam uma sequência de trabalho que inclui: seleção da amostra; preparação, separação e identificação das proteínas; finalizando com uma análise utilizando bioinformática (Feng, Shang e Beretta, 2006). Para a realização da análise proteômica são necessárias amostras cuidadosamente selecionadas, assim como um fracionamento protéico acurado, aliado a bioinformática; para uma perfeita identificação e quantificação (Vaiopoulou *et al.*, 2012).

Existem, porém, alguns desafios no processo de identificação de proteínas. Em proteínas presentes no soro sanguíneo, por exemplo, é descrito que várias proteínas estão presentes em uma baixa concentração, o que torna difícil a sua identificação, pois as proteínas que estão em maior concentração podem mascarar a presença das menos abundantes; existindo ainda a possibilidade de atividade cruzada entre proteínas; e de ocorrer grande variação da quantidade de determinadas proteínas entre as amostras (Ebert *et al.*, 2006). A detecção destas proteínas menos abundantes depende do desenvolvimento de métodos acurados para separá-las das mais abundantes, assim como de métodos de detecção com alta sensibilidade e especificidade (Vaiopoulou *et al.*, 2012).

Nos últimos anos houve um grande avanço na tecnologia envolvendo a análise proteômica, sendo a MS considerada o método de escolha para a caracterização dos componentes proteicos dos sistemas biológicos (Cravatt, Simon e Yates, 2007). Com a MS, foram feitos novos achados a respeito da composição, regulação e função de complexos moleculares e importantes vias biológicas (Cravatt, Simon e Yates, 2007).

A MS é uma técnica de destaque, especialmente para a análise de amostras proteicas complexas (Aebersold e Mann, 2003), pois permite uma identificação altamente sensível e processada de proteínas ou peptídeos, assim como de modificações pós-translacionais (Cravatt, Simon e Yates, 2007). Por esta capacidade de detectar proteínas em concentrações mínimas, a MS auxilia na identificação de biomarcadores de inúmeras doenças (Schulte *et al.*, 2005). Estas tecnologias permitem não somente a identificação quanto a análise diferencial da expressão de proteínas em diversos tipos de tecidos, até mesmo para comparar estados patológicos a fisiológicos (Vaiopoulou *et al.*, 2012).

A proteômica permite ainda a determinação do gene e da função celular diretamente ao nível proteico (Aebersold e Mann, 2003), englobando diversas técnicas que permitem analisar diferentes aspectos da estrutura, função, atividade e interações proteicas (Cravatt, Simon e Yates, 2007). Utilizando um *software* para a identificação do perfil proteico, as proteínas são classificadas em uma base de dados de acordo com os possíveis processos biológicos em que podem estar envolvidas, segundo a descrição de vários pesquisadores (Chang *et al.*, 2008). A área mais explorada da proteômica é a utilização destas ferramentas para a descoberta de biomarcadores tanto nos fluidos corporais, quanto tecidos e amostras biológicas (Gulcicek *et al.*, 2005; Cravatt, Simon e Yates, 2007).

A análise em MS é feita utilizando um equipamento denominado espectrômetro de massas, o qual apresenta na sua estrutura básica uma fonte de íons, um analisador de

massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (Cantu, Wulff e Palma, 2008). As fontes de ionização podem envolver as técnicas como a ionização por “*eletrospray*” (ESI) e a Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), as quais ionizam as moléculas, porém mantendo a estrutura polipeptídica (Vaiopoulou *et al.*, 2012).

Os analisadores de massa selecionam os íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z), e podem ser do tipo quadrupólos, ion-traps, time-of-flight (TOF) ou Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR); os quais podem ser utilizados separadamente ou acoplados entre si, quando são denominados híbridos (Cantu, Wulff e Palma, 2008). Quando é utilizado mais de um analisador associado, o sistema é classificado como *tandem*, o qual permite a realização de vários experimentos em sequência.

Embora novas tecnologias estejam em desenvolvimento, as mais comumente utilizadas em MS são: MALDI-TOF; SELDI-TOF; e MS/MS (*Tandem*) (Mann, Furness e Southwell, 1999). MALDI-TOF é considerado um moderno instrumento que pode medir o peso molecular de cada peptídeo identificado, apresentando uma leitura com uma acurácia de 0,1 Da até 1000 Da; consultando bases de dados de peptídeos, tanto de proteínas conhecidas, como até mesmo de possíveis genomas (Kim, Page e Barnes, 2004).

O espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF, apresenta um ionizador (MALDI), um analisador (TOF) e um detector que registra o tempo de voo dos peptídeos ionizados. Os menores íons irão voar mais rápido que os maiores, e a razão massa/carga é calculada a partir dos tempos de voo registrados, permitindo identificar a massa de cada peptídeo (Santos, Teixeira e Sá-Correia, 2001).

A análise realizada pelo MALDI-TOF também calcula a probabilidade estatística de que os peptídeos identificados correspondam a determinadas proteínas, pois nas bases de dados, cada proteína apresenta um número de acesso e uma possível sequência de aminoácidos (Kim, Page e Barnes, 2004). É importante lembrar também, que alguns registros de proteínas nas bases de dados podem ser feitos por mais de um pesquisador, por esta razão também, o equipamento oferece estes dados estatísticos, para que seja direcionada a identificação da forma mais precisa.

No caso de estudos envolvendo o intestino, a análise do perfil transcricional, utilizando as ferramentas proteômicas, foi realizada, por exemplo, com o objetivo de determinar as alterações no proteoma durante a maturação celular *in vivo*, com a finalidade de oferecer importantes indícios que possam esclarecer vias de processos tumorais intestinais

(Chang *et al.*, 2008). Os autores observaram com este trabalho, que proteínas diferentemente expressas nas criptas e vilos intestinais podem ser alteradas por processos biológicos, como o de maturação celular.

Outros autores também utilizaram a análise proteômica para avaliar os efeitos da amônia atmosférica sobre a mucosa do intestino delgado de aves, uma vez que a amônia é altamente tóxica ao TGI, pois altera o metabolismo dos nutrientes e a produção de energia (Zhang *et al.*, 2015). A importância do estudo se dá pelo fato de que a mucosa está envolvida em diferentes funções fisiológicas como o metabolismo proteico, de lipídeos e carboidratos; assim como a produção de energia; e a manutenção da sua própria integridade. Neste trabalho, apresentavam-se suprarreguladas as proteínas envolvidas no metabolismo energético e apoptose, as quais os autores acreditam que possa induzir à apoptose mitocondrial. Quanto às subreguladas, foram encontradas proteínas envolvidas na resposta imune e metabolismo de nutrientes, as quais podem diminuir a habilidade antimicrobiana e a absorção de nutrientes no próprio intestino. Portanto, pelos dados obtidos neste estudo de Zhang *et al.* (2005) pode-se sugerir que a amônia seja bastante tóxica à mucosa intestinal.

As alterações na expressão proteica de células epiteliais primárias do intestino de camundongos também foram avaliadas utilizando a análise proteômica (Hansson *et al.*, 2011). Este estudo teve como objetivo identificar os efeitos do desenvolvimento do epitélio intestinal no período pós-natal, pois antes do nascimento os animais recebem a nutrição a partir do líquido amniótico, e depois que nascem passam a ingerir leite e então, alimentos sólidos, sendo necessárias alterações no epitélio para que o intestino se adapte às mudanças na dieta. Neste trabalho (Hansson *et al.*, 2011), os autores observaram a expressão diferencial de 520 proteínas durante o desenvolvimento intestinal, entre a amamentação e o início da dieta sólida, muitas delas envolvidas em vários processos metabólicos.

A principal função do cólon é a reabsorção de água e íons do conteúdo do intestino delgado, e para aumentar a área de reabsorção o epitélio possui criptas e vilos (Guyton e Hall, 2002). Com a aplicação da análise proteômica foram avaliadas as criptas do cólon intestinal de camundongos *knockout*, nos quais foram inativadas moléculas supressoras de tumores, pois o crescimento das criptas em regiões anormais caracteriza os estágios iniciais do câncer colorretal. Neste estudo (Cole, Ji e Simpson, 2000) observou-se uma subregulação da proteína anidrase carbônica que participa na absorção de íons do lúmen intestinal, a qual é

altamente expressa no epitélio normalmente, e que poderia comprometer o cólon nos casos de câncer.

Stephens *et al.* (2010) analisaram com a ferramenta proteômica, o processo de adaptação intestinal em resposta à ressecção de parte do intestino delgado. Esta adaptação é essencial para restaurar a autonomia intestinal em pacientes que passaram por este procedimento. Estes autores (Stephens *et al.*, 2010) ao realizar uma análise proteômica de amostras do intestino de porcos que passaram por ressecção, observaram uma alteração na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, assim como também proteínas envolvidas na proliferação e crescimento celular, as quais os pesquisadores acreditam que estejam envolvidas no processo de adaptação do epitélio intestinal.

Após a avaliação do perfil protéico do intestino de embriões bovinos, 74 proteínas foram identificadas, das quais 30 eram específicas para o intestino primitivo bovino (Mançanares, 2012). Foi observado um enriquecimento de ontologias relacionadas à ligação e atividade catalítica. Da mesma forma, foi verificado um enriquecimento na ontologia de modificações no citoesqueleto; processo de diferenciação, migração e metabolismo celular. As vias envolvidas no movimento do citoesqueleto de actina e a migração transendotelial de leucócitos foram extremamente enriquecidas. Todos estes dados apresentaram indícios de que as células do intestino primitivo bovino apresentam um alto perfil migratório, compostas por células em processo de diferenciação, com alto metabolismo celular.

Outro trabalho bastante interessante utilizando a análise proteômica em amostras de intestino foi realizado com o objetivo de elucidar a diferença sítio-específica da expressão de proteínas presentes normalmente no intestino delgado de ratos (Iizumi *et al.*, 2007). Com o objetivo de investigar a diferença funcional entre os segmentos foram coletadas amostras de ratos, das quais foram identificadas 180 proteínas com padrão de distribuição diferenciada ao longo do intestino delgado. Este trabalho apresentou a alteração gradativa na expressão de determinadas proteínas ao longo do intestino delgado e de proteínas importantes expressas unicamente em um dos segmentos, como a proteína ligante dos ácidos biliares, que foi encontrada somente no íleo. Neste estudo ainda comparou-se a expressão de algumas proteínas em diferentes segmentos, como a vilina, que tem uma expressão gradativa, do duodeno ao íleo, confirmando a sua função fisiológica, pois a quantidade de vilos realmente diminui a partir do duodeno em direção ao íleo.

Nesta análise, a maior diferença entre os segmentos foi observada quando o duodeno foi comparado ao íleo. Foram verificadas também proteínas que apresentam um

padrão de distribuição único ao longo do intestino delgado. A proteína celular ligante do retinol II e a proteína ligante dos ácidos graxos intestinal apresentaram a sua expressão abundante no jejuno, e muito escassa no íleo. A proteína ligante dos ácidos graxos foi fortemente observada no íleo, e sua expressão neste segmento é devida ao seu papel na circulação entero-hepática dos ácidos biliares. O canal aniônico voltagem-dependente 2 e a bifosfato-5 nucleotidase eram as mais abundantes no duodeno. O canal aniônico voltagem-dependente 2 é expresso na membrana externa das mitocôndrias de células eucariontes e participa do processo de apoptose. O papel da outra proteína ainda não foi esclarecido.

A isquemia/reperfusão intestinal é uma condição crítica associada a uma alta morbidade e mortalidade. Este quadro ocorre em condições clínicas como hemorragias, traumas, choque séptico, queimadura severa, transplante de intestino delgado, cirurgia na aorta abdominal ou cirurgia cardiovascular (Liu *et al.*, 2010). Este processo de isquemia/reperfusão não causa problemas graves somente ao intestino como também causa destruição de órgãos remotos, ou disfunção de múltiplos órgãos devido ao dano à barreira mucosa intestinal (Mallick *et al.*, 2004).

Liu *et al.* (2010) utilizaram a análise proteômica para avaliar o efeito da oclusão/reperfusão da artéria mesentérica superior em ratos, com o objetivo de verificar comparativamente e identificar a expressão de proteínas da mucosa intestinal. Dentre as 16 proteínas que foram significativamente moduladas pelo processo de isquemia/reperfusão na mucosa intestinal, 8 estão relacionadas a vários processos metabólicos, especialmente o metabolismo energético. Dentre elas estão a desidrogenase isocitrato e a hidratase aconitato citoplasmática, envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico; a piruvato quinase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que atuam na glicólise; a complexo citocromo bc1, relacionada à fosforilação oxidativa; a glutamato desidrogenase, no metabolismo de aminoácidos; e a enoil-coA-hidratase, no metabolismo lipídico. Todas estas se apresentavam subreguladas pelo processo de isquemia/reperfusão, sendo que especialmente as 3 últimas indicaram uma diminuição no metabolismo da mucosa intestinal.

Além destas, Liu *et al.* (2010) também observaram a alteração na expressão de 3 proteínas envolvidas na anti-oxidação e anti-apoptose, as quais estavam subreguladas, incluindo a aldose-redutase, desidrogenase aldeído e a proteínas dissulfeto isomerase. Proteínas envolvidas na manutenção da estrutura proteica foram encontradas, como a α -tubulina 1B, que estava suprarregulada; e a intelectina 1 que estava subregulada. Proteínas de

ligação também foram identificadas, sendo a albumina suprarregulada; enquanto a proteína ligante de retinol 2 e a anexina A2 estavam subreguladas.

Atualmente, existe um crescente interesse em utilizar a proteômica em estudos de toxicologia com o objetivo de revelar os mecanismos e vias importantes que possam estar envolvidos na toxicidade de várias substâncias (Ramm *et al.*, 2015).

A análise proteômica já foi aplicada para avaliar os efeitos do F e do chumbo sobre o SNC, especificamente no córtex de camundongos (Niu *et al.*, 2014), onde verificou-se uma diminuição na expressão de proteínas tubulinas. Quanto à função biológica destas proteínas, é descrito que as mesmas estão envolvidas na formação do citoesqueleto; assim como também na diferenciação, migração e orientação do axônio. Os pesquisadores acreditam que as alterações na expressão dessas proteínas, devem estar relacionadas com a diminuição na capacidade de aprendizado, comumente encontrada em crianças, em consequência da ingestão de altas concentrações de F. Com este estudo, acredita-se ainda, que a redução na expressão destas proteínas possa estar relacionada ao comportamento locomotor anormal observado em ratos (Niu *et al.*, 2008) e camundongos (Niu *et al.*, 2014).

Da mesma maneira, foi identificado o perfil proteico hepático após exposição crônica ao F, como forma de buscar biomarcadores específicos da sua toxicidade (Pereira, Leite, *et al.*, 2013). Ao avaliar o perfil proteico do fígado, foram identificadas várias proteínas supra e subreguladas nos grupos das doses de 5 e 50 ppm F em relação ao grupo controle. Neste trabalho a maioria das proteínas com a expressão alterada estava relacionada com processos metabólicos, especialmente no grupo que recebeu a dose de 50 ppm F. Em especial, neste trabalho, foram identificadas duas proteínas de papel importante, com a sua expressão alterada no grupo de 50 ppm F, a apolipoproteína E e a GRP-78. Estas proteínas relacionam-se às funções de transporte de lipídeos e anti-estresse oxidativo, respectivamente. Como resultado, observou-se que o aumento na expressão da proteína GRP-78 levou a uma redução na esteatose hepática, devido a uma redução da capacidade de transporte de lipídeos, causada pela diminuição da biodisponibilidade das lipoproteínas que transportam a gordura no fígado.

Pelos resultados obtidos com a análise do fígado, fica evidente como a análise proteômica pode ser uma importante ferramenta, para identificar as proteínas envolvidas na toxicidade do F; e dessa forma direcionar e esclarecer os mecanismos envolvidos neste processo, também em outros órgãos.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Justificativa

O presente estudo se justifica em função dos seguintes considerandos:

- Diversidade de trabalhos que destacam quadros de sintomatologia grave de dores abdominais, constipação intestinal e diarreia, que podem comprometer gravemente a vida dos indivíduos em decorrência da toxicidade do F;
- Ausência de dados da literatura que descrevam alterações morfofisiológicas dos neurônios do SNE que podem ser causadas pela exposição aguda ou crônica ao F;
- Ausência de dados da literatura que descrevam alterações proteicas envolvendo manifestações intestinais decorrentes da exposição à dose aguda ou crônica ao F.

3.2. Objetivo Geral

Em virtude destas considerações, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar o efeito da exposição aguda ou crônica ao F, em diferentes concentrações ou doses, sobre diferentes sub-populações neuronais do SNE, especificamente nos segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos, através de técnicas de imunofluorescência associadas à análise morfológica da inervação entérica, assim como avaliar a expressão diferencial de proteínas no segmento intestinal mais afetado na análise da inervação entérica (duodeno), através da análise proteômica.

3.3. Objetivos específicos

Em segmentos específicos (duodeno, jejuno e íleo), no plexo mioentérico do intestino delgado de ratos expostos à dose aguda ou crônica de F:

- Avaliar, sob os aspectos quantitativos e morfométricos, a população geral de neurônios mioentéricos (neurônios IR-HuC/D);
- Avaliar, sob os aspectos quantitativos e morfométricos, a subpopulação de neurônios mioentéricos nitrérgicos (neurônios IR-nNOS);
- Avaliar, sob os aspectos morfométricos, as varicosidades colinérgicas (IR-ChAT), IR-VIP, IR-CGRP e IR-SP de neurônios mioentéricos.

Avaliar, sob aspectos morfométricos, a espessura total e a espessura da túnica muscular da parede de cada segmento do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) separadamente.

No segmento intestinal considerado mais afetado no que diz respeito a alterações

morfométricas de seus neurônios entéricos (duodeno):

- Realizar a análise proteômica com o objetivo de observar, simultaneamente, várias proteínas com expressão alterada após exposição à dose aguda ou crônica de F.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e período de exposição dos animais

Estudos com enfoque no SNE são descritos em diferentes tipos de animais de laboratório, como em porcos da Guiné (Costa *et al.*, 1980; Furness *et al.*, 1981b; Furness, Costa e Eckenstein, 1983; Mawe *et al.*, 1989; Lomax e Furness, 2000); camundongos (Qu *et al.*, 2008; Chiocchetti *et al.*, 2009; Mongardi Fantaguzzi *et al.*, 2009); ratos (Sayegh e Ritter, 2003; Mitsui, 2011); coelhos (Gábelriel *et al.*, 1998; Dénes *et al.*, 2003).

Em nosso estudo escolhemos trabalhar com ratos, por ser este um modelo bastante viável e frequentemente aplicado em estudos envolvendo o SNE (Alves *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012; Hermes-Uliana *et al.*, 2014) e a análise da toxicidade do F (Nopakun e Messer, 1990; Gharzouli e Senator, 1994; Kobayashi *et al.*, 2009; Pereira, Leite, *et al.*, 2013).

Para todas as técnicas realizadas neste trabalho, foram utilizados segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, com 60 dias de vida, período em que os animais são considerados adultos jovens (Andreollo *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo técnicas de imunohistoquímica, utilizados para a demonstração dos padrões de inervação entérica, indicam que os neurônios motores e secretomotores em seres humanos são similares aos encontrados em outros mamíferos, e que tipos neuronais equivalentes aos neurônios intrínsecos aferentes primários são identificados em seres humanos (Furness e Costa, 1987). Dessa forma, embora as diferenças entre o SNE de animais e humanos existam, dados obtidos em estudos experimentais com animais, como o presente estudo, podem fornecer informações importantes sobre como o comportamento do SNE humano, em nosso caso, após a exposição ao F.

Após aprovação da utilização dos animais pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais nº 014/2011; Anexo 1), os mesmos foram adquiridos junto ao Biotério Central da FOB/USP/Bauru.

Para a execução deste projeto, o trabalho foi dividido em etapas, sendo as duas primeiras destinadas à análise da inervação entérica, nas quais foram utilizados 125 animais para a obtenção de um “n” mínimo de 6 para todas as técnicas de imunofluorescência. Na 1ª etapa foram utilizados os animais destinados às técnicas de imunofluorescência para a marcação de HuC/D, nNOS, VIP, CGRP e ChAT em neurônios mioentéricos do intestino delgado; enquanto a 2ª etapa foi realizada para a obtenção dos animais destinados à técnica de imunofluorescência para a marcação da SP em neurônios mioentéricos. Na terceira etapa, foi

realizada a análise proteômica de um segmento do intestino delgado, na qual foram utilizados outros 60 animais, divididos em 2 períodos de exposição, para a obtenção de um “n” de 6 animais por grupo.

No total, nas 3 etapas, foram utilizados 185 animais. Em cada etapa foi realizado um período de exposição aguda com NaF, compreendendo 2 grupos experimentais; e um período de exposição crônica com 3 grupos experimentais. Os animais que foram expostos cronicamente ao F receberam a partir de 60 dias de vida, recebendo durante 30 dias, concentrações fixas de F (10 ppm F ou 50 ppm F), na forma de NaF, dissolvido em água deionizada, com um grupo controle recebendo apenas água deionizada (0 ppm F).

Os animais que foram expostos à dose aguda de F, também receberam a partir de 60 dias de vida, recebendo água deionizada por 30 dias, e no último dia da exposição receberam, por gavagem gástrica, uma dose única de 25 mg F/Kg, na forma de NaF dissolvido em água deionizada, com o objetivo de simular uma intoxicação aguda acidental com F. Resumidamente, os grupos animais estão descritos abaixo:

- GRUPO I (CONTROLE-DOSE CRÔNICA): 0 ppm F (apenas água deionizada)
- GRUPO II: 10 ppm de F (água deionizada com NaF)
- GRUPO III: 50 ppm de F (água deionizada com NaF)
- GRUPO IV (CONTROLE-DOSE AGUDA): Gavagem - 0 mgF/Kg (água deionizada)
- GRUPO V: Gavagem - Dose aguda de 25 mg F/Kg

Por 30 dias, os animais tiveram livre acesso à água de beber, tanto nos casos da água deionizada (grupos I, IV e V), quanto da água pré-preparada com NaF (grupos II e III). Durante o período de exposição de 30 dias para a exposição ao F, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, numa sala com um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro; temperatura e umidade controladas; e livre acesso a uma dieta industrializada (ração) da marca Purina® (Nestlé, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com baixo conteúdo de F (<1 mg/Kg).

Os 125 animais destinados à análise da inervação entérica foram utilizados em 5 períodos diferentes, por ser este número total uma grande quantidade de animais para um único período, devido ao fato de existir um número reduzido de gaiolas metabólicas (apenas 30), nas quais os animais eram acomodados individualmente; e também para que após a realização das técnicas de imunofluorescência houvesse um período para a captura das imagens entre os períodos de exposição, dado que algumas técnicas podem perder a fluorescência em um curto período de tempo. Portanto, em cada um desses 5 períodos foram utilizados 25 animais distribuídos em 5 grupos diferentes, como descrito anteriormente (5

gaiolas eram deixadas vazias). Cada período de exposição consistia em 30 dias, os quais foram realizados em fevereiro, abril, junho e agosto de 2012; e julho de 2013.

Quanto à análise proteômica, foram utilizados 60 animais, divididos em 2 períodos, realizados exatamente da mesma maneira como os períodos de exposição dos animais da análise da inervação entérica, os quais foram feitos em março de 2013 e janeiro de 2014.

No plano inicial, para a exposição crônica havia sido escolhida, para um dos grupos, a concentração de 5 ppm F; e no caso da exposição aguda, a dose de 100 mg F/Kg. Porém, com o objetivo de melhor executar este trabalho, alteramos a concentração de 5 ppm F para 10 ppm F, enquanto a dose aguda de 100 mgF/kg foi alterada para 25 mg F/kg. Embora a dose de 5 ppm F já tenha sido utilizada em outros trabalhos do nosso grupo (De Carvalho *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2009), estas alterações foram necessárias, pois após a realização de um projeto “piloto” percebemos que os animais que receberam a concentração de 5 ppm F apresentaram níveis plasmáticos de F semelhantes aos encontrados no grupo controle, o que poderia tornar a comparação entre os grupos pouco proveitosa.

Ainda como forma de justificar esta alteração desta concentração, verificamos que é descrito na literatura que o metabolismo do rato é 10 vezes mais rápido do que o humano, no que diz respeito à distribuição do F (Smith, Nanci e Denbesten, 1993). Dado que, com esta concentração buscávamos mimetizar os efeitos da concentração de F utilizada na água de abastecimento (1 ppm F), administramos aos animais da exposição crônica uma dose de 10 ppm F, que seria então a equivalente à concentração de 1 ppm F. Também mantivemos a concentração máxima da exposição crônica do nosso estudo em 50 ppm F, a qual corresponde à uma alta concentração de F presente naturalmente na água de algumas regiões onde ocorre fluorose endêmica (Dunipace *et al.*, 1995), assim como também corresponde à concentração a qual indivíduos podem ser expostos em atividades laborais (Who, 2002).

Além destas evidências, a concentração de 50 ppm F também foi utilizada em outros trabalhos do nosso grupo, comprovando a sua alta toxicidade (Kobayashi *et al.*, 2009; Pereira, Leite, *et al.*, 2013; Lobo *et al.*, 2015).

A alteração realizada na dose da exposição aguda foi feita devido ao fato da dose de 100 mg F/Kg, por gavagem gástrica, ter levado à morte quase imediata dos animais, por um processo de absorção e intoxicação extremamente rápido. Embora esta dose de 100 mg F/kg já tenha sido utilizada em outros trabalhos do nosso grupo (Leite *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2015), acreditamos que a morte dos animais logo após a sua administração ocorreu devido

ao fato dos animais estarem em jejum prolongado antes da realização da gavagem. Este jejum era necessário, pois diferentemente de outros estudos do nosso grupo em que esta dose foi utilizada, necessitávamos que o intestino estivesse sem conteúdo, para que não fossem realizadas várias lavagens, com o objetivo de manipular o mínimo possível a amostra, para não danificá-la. A ausência de conteúdo intestinal também permite que a fixação seja realizada de uma forma mais rápida, logo após a sua coleta. Todos estes passos contribuem com um melhor resultado das técnicas de imunofluorescência. Dessa forma, como havia um grande esvaziamento gástrico e intestinal em decorrência do jejum, também era maior a absorção do F, e consequentemente o processo de intoxicação com esta alta dose de 100 mgF/kg ocorria de forma mais rápida, levando os animais à morte em um período menor que 2 horas.

Da mesma maneira, como realizado em outro estudo do nosso grupo (Leite *et al.*, 2007), também considerávamos necessário aguardar um período de 2 horas para a coleta intestinal, pois consideramos este período fundamental para a passagem do F por todo o intestino delgado, e consequentemente para a sua máxima absorção, como descrito por Messer e Ophaug (1991). Aliado a este fato, é descrito ainda que a maioria da morte dos animais ocorre após transcorridas 2 horas da dose aguda de F, portanto até duas horas, seria garantida a sobrevivência dos animais para a coleta das amostras, além de ter a máxima absorção intestinal.

Assim, após a realização do projeto “piloto” com as doses agudas de 100, 75, 50 e 25 mg F/Kg, optamos pela dose de 25 mg F/Kg, a qual também já foi utilizada por outros autores (De López, Smith e Hodge, 1976; Heindel *et al.*, 1996), assim como também é a única dose dentre as testadas no projeto piloto, que permitiu a sobrevivência dos animais por um período de 2 horas após a realização da gavagem gástrica, pois é mantido o jejum dos animais nas 18 horas anteriores.

Portanto, decorridos os períodos experimentais de 30 dias, removíamos a ração 18 horas antes da eutanásia, com o objetivo de promover o esvaziamento intestinal e impedir a presença de alimento no TGI. A água oferecida aos animais também era removida 6 horas antes da eutanásia para se obter o máximo esvaziamento gástrico, especialmente daqueles animais que passariam pela gavagem gástrica para aplicação da dose aguda.

No dia do sacrifício, os animais foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular de 0,5 mL/Kg de peso corporal de cloridato de xilazina (Anasedan-Agribrands,

USA) associada a uma dose de 1,5 mL/Kg de peso corporal de cloridrato de quetamina (Dopalen-Fort Dodge, Iowa, USA).

Em seguida, com os animais totalmente anestesiados, os mesmos foram posicionados para que se realizasse a incisão mediana da fúrcula até a púbis, para exposição da cavidade peritoneal e da torácica, e o coração foi puncionado com agulha para coleta do sangue com uma seringa plástica heparinizada (uma gota de Heparina contendo 5.000 UI/mL). Logo após, o sangue foi transferido para tubos plásticos (tipo Eppendorf), homogeneizado e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (Jouan A14) para obtenção do plasma, com o objetivo de confirmar a concentração de F no sangue dos animais e consequentemente da exposição ao F. A concentração de F no plasma foi quantificada pelo método potenciométrico utilizando um eletrodo íon-seletivo (Rocha, Vélez e Devesa, 2012; Rocha, Devesa e Vélez, 2013), de acordo com uma metodologia estabelecida (Taves, 1968a), a qual foi modificada por Whitford (1996).

Três importantes trabalhos comprovaram que o F não se liga às proteínas plasmáticas ou a nenhum outro constituinte do plasma (Chen *et al.*, 1956; Taves, 1968a; Ekstrand, Ericsson e Rosell, 1977), e que, portanto, a concentração de F no plasma e no líquido intersticial é exatamente a mesma. Dessa forma, em estudos que avaliam a distribuição do F nos tecidos moles, a utilização da análise dos níveis de F no plasma fornece um valor fidedigno da real concentração de F nos tecidos (Whitford, 1990), e por esta razão, realizamos a análise do F no plasma sanguíneo.

Após a coleta do sangue, foram retirados os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), sendo: 5 cm do duodeno, a partir do piloro (ligamentode Treitz); 15 cm do jejuno (desprezando 10 cm após o músculo suspensor do duodeno); e 10 cm do íleo terminal; sendo a coleta orientada a partir de estruturas anatômicas. Em seguida, os segmentos intestinais foram lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), e preenchidos com solução fixadora de Zamboni (Stefanini, De Martino e Zamboni, 1967). Após as 18 horas de fixação, as extremidades dos segmentos intestinais foram abertas para que o conteúdo (fixador) fosse drenado, e os segmentos também foram abertos ao longo da margem mesentérica; sucessivamente lavados em álcool 80% até remoção completa do fixador. A seguir, foi realizada a desidratação em série ascendente de álcoois (95% e 100%); diafanização em xilol; reidratação em série descendente de álcoois (100%, 90%, 80%, 50%); seguida de lavagem com PBS.

Na sequência, os segmentos intestinais foram cortados em pequenas fatias de aproximadamente 1x1cm, as quais foram microdissecadas para obtenção dos preparados totais (remoção da túnica mucosa e tela submucosa, obtendo-se um preparado total da túnica muscular).

Utilizamos estes preparados totais para a realização de técnicas de imunofluorescência, pois eles permitem uma estimativa apurada da proporção de neurônios entéricos e da distribuição das suas fibras nervosas, especialmente devido à possibilidade de se estudar o plexo mioentérico sem a presença da inervação extrínseca (Costa *et al.*, 1980). Da mesma forma, avaliamos em nosso estudo apenas o plexo mioentérico, dado que a sintomatologia descrita na literatura em decorrência da ingestão do F (Saady e Rose, 1988; Susheela *et al.*, 1993; Shashi, 2002) relaciona-se grandemente a alterações na motilidade intestinal. Dessa forma, consideramos mais pertinente avaliar os neurônios envolvidos principalmente no controle desta função.

4.2. Análise da Inervação Entérica

Em seguida, com os preparados totais, foram realizadas as técnicas de imunofluorescência para a marcação de HuC/D, nNOS, VIP, CGRP, ChAT e SP. Neste projeto, fizemos uma parceria com a UEM (Universidade Estadual de Maringá), através da co-orientação deste doutorado pela Professora Jacqueline Nelisis Zanoni, das disciplinas de Anatomia e Histologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas. Esta parceria foi fundamental para a realização de todas as técnicas de imunofluorescência, dado que o estudo do SNE, em especial a realização destas técnicas, é considerado o *expertise* desta professora.

No plano inicial de trabalho, acreditávamos que seria possível a identificação dos corpos celulares dos neurônios colinérgicos, os quais apresentam a acetilcolina como neurotransmissor, através da técnica de imunofluorescência para marcação da ChAT. Porém, embora a Professora Jacqueline Nelisis Zanoni tivesse bastante experiência na realização das técnicas de imunofluorescência para vários neurotransmissores entéricos, esta técnica para marcação de neurônios colinérgicos era inédita em seu laboratório. Dessa forma, realizamos várias tentativas até conseguirmos a marcação para a ChAT, e embora fosse possível a visualização de alguns corpos celulares de neurônios, após a análise de todas as imagens obtidas, consideramos a marcação dos corpos celulares muito discreta, a qual poderia oferecer dados errôneos quanto à quantificação e morfometria dos corpos celulares. Por outro lado, nas imagens produzidas, foi possível identificar com bastante clareza as varicosidades

imunorreativas à ChAT. Portanto, nos pareceu bastante pertinente realizar a morfometria de suas varicosidades como já descritas na literatura (Sharrad, Chen e Brookes, 2013), uma vez que desta forma poderíamos oferecer um dado fidedigno.

Segue a descrição detalhada de cada técnica de imunofluorescência realizada neste estudo. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se nos Anexos 2 e 3.

4.2.A. Técnica de imunofluorescência para a marcação dos neurônios imunorreativos à HuC/D

Os preparados totais da túnica muscular foram processados de acordo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 + Triton 0,5% - (2 x 10 minutos).
2. Primeiro bloqueio: PBS 0,1 M, BSA (albumina soro bovina) 2%, 10% soro de cabra, Triton X-100 0,5% por 1 hora.
3. Incubação em anticorpo primário 1:500 (anti-HuC/D produzido em camundongo) por 48 horas – Temperatura ambiente (T.A.)
4. Lavagem em PBS 0,1 M – (3 x 5 minutos)
5. Incubação em anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fluoresceína por 2 horas – T.A.
6. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 – (3 x 5 minutos)
7. Montagem em lâmina com glicerol tamponado

4.2.B. Técnica de imunofluorescência para marcação dos neurônios imunorreativos à nNOS

Os preparados totais da túnica muscular foram processados de acordo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 + Triton 0,5% - (2 x 10 minutos).
2. Primeiro bloqueio: PBS 0,1 M, BSA (albumina soro bovina) 2%, 10% soro de cabra, Triton X-100 0,5% por 1 hora.
3. Incubação em anticorpo primário 1:500 (anti nNOS produzido em coelho) por 48 horas – T.A.
4. Lavagem em PBS 0,1M – (3 x 5 minutos)
5. Incubação em anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fluoresceína por 2 horas – T.A.

6. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 – (3 x 5 minutos)
7. Montagem em lâmina com glicerol tamponado.

4.2.C. Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imunorreativas à Colina Acetiltransferase (ChAT)

Os preparados totais da túnica muscular foram processados de acordo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS 0,1 M pH7,4 + Triton 0,5% - (2 x 10 minutos).
2. Primeiro bloqueio: PBS 0,1 M, BSA (albumina soro bovina) 2%, 10% soro de cabra, Triton X-100 0,5% por 1 hora.
3. Incubação em anticorpo primário 1:200 (anti-ChAT produzido em cabra) por 48 horas – T.A.
4. Lavagem em PBS 0,1M – (3 x 5 minutos).
5. Incubação em anticorpo secundário anti-cabra conjugado com fluoresceína por 2 horas – T.A.
6. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 – (3 x 5 minutos).
7. Montagem em lâmina com glicerol tamponado.

4.2.D. Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imunorreativas ao CGRP e ao VIP

Os preparados totais da túnica muscular foram processados de acordo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 (3x10 minutos);
2. Incubação em soro normal de cabra 10% (30 minutos);
3. Incubação em anticorpo primário anti-VIP (produzido em coelho) (1:200) e anti CGRP (produzido em coelho) por 24 horas à temperatura ambiente;
4. Lavagem em PBS 0,1M pH 7,4 (3x10 minutos);
5. Incubação com anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho) conjugado com fluoresceína (60 minutos, temperatura ambiente).
6. Lavagem em PBS 0,1M pH 7,4 (3x10 minutos);
7. Montagem em lâmina com glicerol tamponado.

4.2.E. Técnica de imunofluorescência para a marcação das varicosidades imunorreativas à SP

Os preparados totais da túnica muscular foram processados de acordo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 (3x10 minutos);
2. Incubação em soro normal de cabra 10% (30 minutos);
3. Incubação em anticorpo primário anti-SP (produzido em coelho) (1:300) por 24 horas à temperatura ambiente;
4. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 (3x10 minutos);
5. Incubação com anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho) conjugado com fluoresceína (60 minutos, temperatura ambiente).
6. Lavagem em PBS 0,1 M pH 7,4 (3x10 minutos);
7. Montagem em lâmina com glicerol tamponado.

4.2.F. Captura das imagens

Após a realização das técnicas, foi feita a captura das imagens das lâminas, utilizando um microscópio com filtros para imunofluorescência (modelo LEICA DM IRBE®, Heerbrugg-Switzerland) que apresenta uma câmera de alta resolução (LEICA DFC 310 FX®, Heerbrugg-Switzerland), acoplados a um microcomputador. Para as técnicas em que foram avaliadas as varicosidades, foi utilizada a objetiva de 40X; enquanto para as técnicas em que foram avaliados os corpos celulares de neurônios, foi utilizada a objetiva de 20X. Para a visualização das imagens da câmera, foi utilizado um *software* (Leica Application Suite, v 4.0. Leica Microsystems, Heerbrugg-Switzerland). Adicionalmente, foram feitas imagens no microscópio confocal de varredura a laser (LEICA, modelo TCS SPE, Heerbrugg-Switzerland). Ambos os microscópios utilizados pertencem ao CIP/FOB/USP/Bauru.

Das técnicas de imunofluorescência para a proteína Hu (HuC/HuD) e a enzima nNOS foram feitas um total de 5.760 imagens (2 técnicas X 3 segmentos intestinais X 5 grupos X 6 animais por grupo X 32 imagens por animal).

Das técnicas de imunofluorescência para a marcação das fibras imunorreativas à SP/VIP/CGRP/ChAT foram feitas um total 14.400 imagens (4 técnicas X 3 segmentos intestinais X 5 grupos X 6 animais por grupo X 40 imagens por animal).

A captura das imagens foi realizada por amostragem na região intermediária do duodeno, jejuno e íleo (Figura 1). A partir das imagens foram realizadas as análises

morfométricas e quantitativas, através do *software* de análises de imagens *Image Pro Plus 4* (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

a) Intestino fechado

b) Intestino aberto na margem mesentérica

FIGURA 1. O esquema representa (a) intestino fechado: 0° compreende a inserção do mesentério; (b) intestino aberto na margem mesentérica: M corresponde à região mesentérica, I a região intermediária e AM a região anti-mesentérica.

4.2.G. Análise das amostras obtidas com as técnicas de imunofluorescência

4.2.G.1. Quantificação dos neurônios imunoreativos à HuC/D e nNOS em preparados totais da túnica muscular

A quantificação foi realizada nas imagens capturadas por amostragem na região intermediária e todos os neurônios de cada imagem foram quantificados. Os resultados são expressos como neurônios por cm².

4.2.G.2. Análise morfométrica dos neurônios imunoreativos à HuC/D e nNOS dos preparados totais da túnica muscular

Foram realizadas análises morfométricas da população geral de neurônios, evidenciados pela técnica imunohistoquímica para a proteína Hu (HuC/D); e para a subpopulação do plexo mioentérico evidenciada pela técnica imunohistoquímica para a enzima nNOS, nas imagens previamente capturadas e armazenadas em HD externo. As áreas

em μm^2 de 100 corpos celulares de neurônios por animal foram mensuradas, totalizando 100 corpos celulares/animal/técnica.

4.2.G.3. Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos imunoreativos à SP/VIP/CGRP/ChAT

Nestas sub-populações neuronais foram analisadas as suas varicosidades, pois os corpos celulares foram pouco evidentes. As imagens das fibras imunorreativas foram capturadas com câmera de alta resolução e transferidas para computador. A área de 400 varicosidades (μm^2) foi mensurada para cada animal em cada técnica, perfazendo um total de 2400 varicosidades por grupo. Os resultados das morfometrias foram expressos em μm^2 , enquanto a análise quantitativa foi dada em neurônios por cm^2 .

4.3. Análise estatística dos dados morfométricos e quantitativos da inervação entérica

Os resultados de análise da inervação entérica (morfométricos e quantitativos) foram submetidos à análise estatística através dos *softwares* Statistica 8.0 e GraphPad Prism 6.0, sendo expressos como média $\pm$ erro padrão. Inicialmente foram realizados os teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados e o teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade. Para os dados morfométricos foi considerado o delineamento em blocos (ANOVA blocked), seguido de Teste de Fisher para os grupos da exposição crônica, enquanto que para os grupos da exposição aguda foi utilizado o teste *t* de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.4. Análise estatística dos dados da morfologia básica do intestino

Os dados foram analisados utilizando-se os *softwares* Statistica 8.0 e GraphPad Prism 6.0, após checagem da normalidade e homogeneidade. Para a exposição aguda, foi utilizado o teste *t* de Student, enquanto para a crônica foi utilizada ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.5. Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados às técnicas da 1ª Etapa (imunofluorescência para a marcação de HuC/D, nNOS, VIP, CGRP e ChAT em neurônios mioentéricos)

Para análise da concentração plasmática de F foi utilizado o software GraphPad InStat versão 3,0 para Windows (GraphPad Software Inc., LA Jolla, CA, EUA). Inicialmente os dados foram checados em relação à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett) para seleção do teste estatístico apropriado. Para a concentração plasmática de F dos animais que passaram pela exposição crônica, os dados apresentaram distribuição normal, mas não eram homogêneos. Foram então analisados por ANOVA após transformação logarítmica, e pelo teste de Tukey para comparações individuais. Para a concentração plasmática de F dos animais que passaram por exposição aguda, os dados apresentaram distribuição normal, mas a diferença entre os desvios-padrão foi significativa. A análise foi feita então através do teste *t* não pareado com correção de Welch. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.6. Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 2ª Etapa (imunofluorescência para a marcação da SP em neurônios mioentéricos)

Para a concentração plasmática de F dos animais destinados à análise da substância P, que foram submetidos à exposição crônica e aguda ao F, os dados não apresentaram distribuição normal, nem mesmo após transformação logarítmica e foram então analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais e pelo teste de Mann-Whitney, respectivamente. O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%.

4.7. Análise estatística da concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 3ª Etapa (Análise proteômica do intestino)

Os dados foram analisados pelo *software* InStat versão 3,0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, Ca, EUA). Inicialmente foram checados quando à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett), para seleção do teste estatístico apropriado. Para a concentração plasmática de F dos animais que passaram pela exposição crônica, os dados apresentaram distribuição normal, mas não eram homogêneos. Foram então analisados por ANOVA após transformação logarítmica, e pelo

teste de Tukey para comparações individuais. Para a concentração plasmática de F dos animais que passaram por exposição aguda, os dados apresentaram distribuição normal, mas a diferença entre os desvios-padrão foi significativa. A análise foi feita então através do teste *t* não pareado com correção de Welch. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.8. Análise Proteômica

Para o estudo proteômico, foi utilizado um “n” de 6 animais por grupo. Após transcorridos os 30 dias do período de exposição ao F, realizado exatamente como os anteriores, foram coletadas novas amostras de sangue, para análise da concentração plasmática de F (para comprovação da exposição ao F), e também os 3 segmentos intestinais, seguido do sacrifício dos animais.

As amostras de intestino foram coletadas, lavadas rapidamente por várias vezes em solução de PBS gelada, para eliminação total de conteúdo fecal, sendo em seguida acondicionadas em tubos criogênicos identificados, e ultracongeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, foram acondicionadas no freezer a -80°C.

Em seguida, iniciou-se o processo de manipulação do tecido para extração das proteínas. Inicialmente as amostras de intestino foram pesadas e foi realizada a sua homogeneização em moinho criogênico (FREEZER MILL 6770 – SPEX SAMPLE PREPARATION, Metuchen, NJ, EUA). No total foram homogeneizadas 90 amostras intestinais (3 segmentos intestinais X 30 animais=90 amostras). Com o moinho criogênico, as amostras foram pulverizadas em baixas temperaturas, pois o mesmo realiza a sua moagem em recipiente imerso em nitrogênio líquido. Dessa forma, a amostra era mantida congelada e evitava-se a degradação das proteínas do tecido mesmo durante a sua manipulação.

Após a homogeneização, as amostras passaram para a etapa da extração das proteínas. Inicialmente foi feita a homogeneização de 100 mg de tecido em 500 µL de tampão de lise (A ou B), incubação por 1 hora em gelo, agitando ocasionalmente, centrifugação a 20000 g por 30 min a 4°C, seguida da coleta do sobrenadante. Para a realização destas etapas foram preparadas várias soluções conforme descrito abaixo.

Tampão de Lise A: Uréia/Tiouréia (25 mL)

Reagente	Quantidade
Uréia 7 M	10,5 g
Tiouréia 2 M	3,8 g

2% CHAPS	0,5 g
Ditiotreitol 40 mM	154 mg
Água deionizada	Completar para 25 mL

Tampão de Lise B: Uréia (25 mL)

Reagente	Quantidade
Uréia 8 M	10,5 g
2% CHAPS	0,5 g
Ditiotreitol 40 mM	154 mg
Água deionizada	Completar para 25 mL

Tampão RIPA (50 mL)

- 1- Homogeneizar 50 mg de tecido em 500 µL de tampão RIPA;
- 2- Incubar 1 hora em gelo, misturando ocasionalmente;
- 3- Centrifugar a 20000 g por 30 min a 4°C;
- 4- Coletar o sobrenadante.

Reagente	Quantidade
Tris 50mM	302,8 mg
NaCl 150 mM	438,3 mg
SDS 0,1 %	50 mg
Na.Deoxycholate 0,5 %	205 mg
Triton X 100 1%	0,5 mL
Água deionizada	Completar para 50 mL

Em seguida, as amostras foram dessalinizadas com o auxílio de uma coluna Amicon® Ultra da Millipore 3 KDa (UFC8003), sendo em seguida realizado o Teste de Bradford, para a quantificação total de proteínas utilizando o *kit* Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-rad, Hercules, CA, EUA), em triplicata, segundo descrito na literatura (Bradford, 1976). Para cada reação feita com o *kit*, foram utilizados 2,5 µL de amostra e 1,0 mL do reagente de coloração, e após a incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em espectrofotômetro. As concentrações proteicas

foram calculadas através da comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de soro bovino (BSA).

Neste projeto foi utilizado um *pool* de amostras de animais do mesmo grupo, pois seria inviável financeiramente que uma amostra de cada animal fosse analisada separadamente. Como a concentração de F no sangue dos animais foi avaliada e comprovada, temos certeza de que trabalhamos com uma amostra homogênea, e que o *pool* oferece um valor fidedigno. Adicionalmente, foram analisadas 3 amostras por grupo (triplicata), dado que o mínimo de três determinações é recomendado para obter-se resultados estatísticos representativos.

As amostras foram subdivididas em alíquotas de 50 µL contendo 50 µg (1 µg/µL), com o objetivo de prepará-las para digestão com tripsina. Foram transferidos 50 µL de amostra (1µg/µL) para um microtubo de 1,5 mL (Axygen, cat# MCT-150-L-C) e foram adicionados 10 µL de AMBIC 50 mM e 25µL de uma solução RapiGest SF 0,2% (Waters cat#186001861), seguido da agitação em vórtex. Em seguida, a amostra (em um tubo) foi transferida para um bloco aquecido (80°C) e, incubada por 15 min. Após esse período o tubo foi centrifugado (função-pulso).

Foram adicionados 2,5 µL de DTT (ditiotreitól) na concentração de 100 mM (BioRad, cat# 161-0611) e novamente agitou-se em vórtex. O tubo foi transferido para um bloco aquecido (60°C) e incubado por 30 minutos. Após esse período, o bloco permaneceu em temperatura ambiente por 2 minutos, sendo centrifugado em seguida (função-pulso).

Adicionou-se então a iodoacetamida na concentração de 300 mM (GE, cat# RPN 6302V), e agitou-se em vórtex. As amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Após serem adicionados 10 µL de solução de tripsina (Promega, cat# V5280) em 50 mM AMBIC, procedeu-se imediatamente para a digestão a 37°C *overnight*.

Após a digestão, foram adicionados 10 µL de TFA 5% preparados em H₂O ultrapura (Pierce, Part No. 53102, HPLC Grade, 10 x 1 mL), e seguiu-se à agitação em vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 90 min. Logo após foi realizada a centrifugação em 14000 rpm a 6°C, por 30 min. O sobrenadante foi transferido para o *vial* (Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c) e foram adicionados 5 µL de ADH 1 pmol/µL (*MassPREP Digestion Standart Alcohol Dehydrogenase*, cat# 186002328) à amostra purificada, e seguiu-se a agitação em vórtex.

Foram acrescentados 85 μL de uma solução de ácido fórmico 0,1% em ACN 3% (AF/ACN). Em seguida, foi verificado o volume final, o qual deve ser de 200 μL , caso contrário, é adicionada a solução de AF/ACN até completar o volume.

A amostra, então, foi levada ao Nano-UPLC (Nano-Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters®, Barueri, SP, Brazil), um equipamento de cromatografia líquida que apresenta elevado desempenho em separação de proteínas, para posterior identificação por espectrometria de massas.

A identificação dos peptídeos foi feita num sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS system (Waters, Manchester, UK). O nanoACQUITY UPLC® foi equipado com uma coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 μm X 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 μm , Waters Manchester, UK). A coluna foi equilibrada com 93% da fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água) e 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1% ácido fórmico). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85 % (ácido fórmico 0,1 % em ACN 100%) por 70 min num fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{min}$. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C.

O espectrômetro de massas Xevo® G2 Q-TOF foi operado em modo iônico positivo de nanoeletrospray e os dados foram coletados usando o método MSE em elevada energia (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos numa única injeção. As condições de fonte usadas incluíram voltage do capilar de 2,5 kV, cone de amostra de 30 V, cone de extração de 5,0 V e temperatura da fonte de 80°C. Os dados foram adquiridos durante 70 min, com varredura na faixa de 50–2000 Da. O *lockspray*, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1]fibrinopeptídeo (1 pmol/ μL), com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, como um íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427. A identificação das proteínas foi obtida utilizando o *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3,0, através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Rattus* (revisado apenas, UniProtKB/Swiss-Prot) baixado em Julho de 2014 a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

A diferença de expressão entre os grupos foi obtida usando o *software* PLGS e expressão como $p < 0,05$ para as proteínas subreguladas e $1 - p > 0,95$ para as proteínas suprarreguladas.

Após a obtenção do perfil proteico, o *software* CYTOSCAPE® 3.0.2 (Java®) foi utilizado para construção de redes de interação molecular entre as proteínas identificadas.

Embora esta análise detalhada do perfil proteico com o uso do *software* demande bastante tempo, é de fundamental importância para estabelecer as possíveis correlações entre as proteínas encontradas com expressão alterada em decorrência da exposição aguda ou crônica ao F, assim como também pode contribuir com a interpretação dos resultados obtidos com a análise da inervação entérica.

Inicialmente, ao utilizar o CYTOSCAPE®, todas as proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas são inseridas no software, utilizando o seu número de acesso, o qual pode ser conferido na base de dados do UNIPROT, que se encontra gratuitamente disponível em seu website (www.uniprot.org). Após a inclusão de todos os números de identificação, as interações são encontradas através da pesquisa utilizando o PSICQUIC, que oferece as bases de dados disponíveis para consulta. No presente trabalho foram escolhidas as bases Interporc, IntAct, BindingDB, APID, MINT, DIP, UniProt e ChEMBL, por apresentarem as interações mais interessantes. É então criada a primeira *network* global de interação proteica.

Após a formação desta primeira *network* global, as proteínas devem ser filtradas para a taxonomia em questão (*Rattus norvegicus*; 10116). As proteínas filtradas são então classificadas, sendo atribuído o valor 1 para as proteínas com expressão suprarregulada (ou presentes apenas no grupo exposto ao F) e o valor -1 para as proteínas com a expressão subrregulada (ou ausentes no grupo exposto ao F). Após esta classificação manual, como supra ou subrreguladas (1 ou -1), outros recursos do CYTOSCAPE® foram utilizados, como os seus *JActiveModules*, os quais geraram 5 módulos, cada um com uma *subnetwork*, com o objetivo de restringir com mais especificidade as possíveis interações proteicas. Da mesma forma, o CYTOSCAPE® também oferece algumas proteínas de interação, para melhor conectar funcionalmente as proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas, as quais muitas vezes apresentam papéis centrais e que podem ajudar a melhor interpretar a função das proteínas presentes no módulo. Estas proteínas de interação, portanto, não são identificadas no tecido, elas são apenas oferecidas pelo CYTOSCAPE® para integrar a análise e contribuir com a compreensão da rede proteica. Inicialmente, todos estes 5 módulos são avaliados, sendo escolhido apenas um, o qual apresenta o maior número de proteínas, assim como também a rede funcional mais importante e mais relacionada ao órgão/tecido em análise. Em seguida, realizamos uma busca com os nomes das proteínas presentes no módulo escolhido para estabelecer as suas possíveis interações em bases de dados como o PUBMED, WEB OF SCIENCE ou SCIENCE DIRECT, com o objetivo de identificar trabalhos descritos na literatura científica, que citam funções importantes destas proteínas. A partir desta revisão de

literatura das proteínas observadas no módulo escolhido procuramos estabelecer conexões que possam nos ajudar a integrar os resultados obtidos em nosso estudo, e também oferecer indícios dos mecanismos envolvidos no processo que buscamos esclarecer, no caso do presente estudo, alterações causadas no intestino pelo F. Utilizando estes recursos, foi criada uma *subnetwork* para cada comparação.

Além dos *JActiveModules*, o CYTOSCAPE® também apresenta alguns outros recursos importantes, como os seus *plugins*. O ClueGo® e o CluePedia®, os quais são ferramentas que permitem classificar as proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas, de acordo com características como: processo biológico, relação com componentes celulares, processos do sistema imune, função molecular, *KEGG* (vias envolvendo genes e genomas), *REACTOME* (vias biológicas em seres humanos) e *WikiPathways* (vias biológicas gerais). Ao escolher uma destas funções, as proteínas são analisadas e agregadas pelo termo mais significativo capaz de descrevê-las.

Dessa forma, genes, proteínas e RNAm podem ser conectados e integrados dentro de uma *subnetwork* criada pelo ClueGo®. Com esta ferramenta, interrelações podem ser melhor investigadas e novas associações potenciais podem ser criadas utilizando o layout oferecido pelo ClueGo®, as quais são também importantes para a interpretação dos dados e geração de novas hipóteses (Bindea, Galon e Mlecnik, 2013).

Em nosso estudo, ao utilizar o *plugin* ClueGo®, as proteínas foram classificadas em categorias baseadas na ontologia gênica de acordo com o processo biológico de que participam. Somente os termos considerados significantes foram utilizados, com um valor de kappa significativo ($\kappa = 0,04$), e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados por termo (Bindea *et al.*, 2009; Bindea, Galon e Mlecnik, 2013), a qual é oferecida pelo próprio CYTOSCAPE®. Para finalizar, descrevemos as possíveis interações de interesse a partir das análises obtidas com o *software* CYTOSCAPE®.

4.9. Análise da morfologia básica do intestino delgado

Na 3ª etapa, juntamente com o material destinado à análise proteômica, foram coletadas amostras dos 3 segmentos do intestino delgado para a inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina. Este processamento foi realizado, pois acreditamos que é de suma importância apresentar também uma análise morfologia básica do intestino associada aos dados da inervação entérica.

O preparo deste material assim como o seu corte foram realizados no laboratório de Histologia da Universidade do Sagrado Coração (USC/Bauru), com a ajuda de parceiros deste laboratório. Todos os cortes histológicos, dos três segmentos intestinais coletados (duodeno, jejuno e íleo), dos 5 grupos avaliados (3 grupos da exposição crônica e 2 grupos da exposição aguda), foram corados com hematoxilina/eosina, para posterior análise.

As amostras foram coletadas e foi realizada a lavagem do lúmen intestinal, os segmentos foram abertos, através da margem mesentérica, e colocados numa placa de cortiça com a superfície epitelial para cima. As amostras foram então fixadas em formol a 10% por 48 horas, submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Finalmente, cortes semi-seriados (5 µm de espessura) no sentido longitudinal do órgão foram corados com hematoxilina e eosina.

As imagens dos cortes preparados foram capturadas com câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co, Shanghai, China), acoplado a um microscópio de fluorescência Olympus®BX40 (Olympus Co, Japan), transferido para um computador usando o programa Motic Images Plus® 2.0 ml (Motic China Group Co, Shanghai, China) e gravadas em HD externo.

A espessura da túnica muscular e espessura total da parede foram mensuradas através do programa de análise de imagens Image-Pro Plus, em imagens capturas com a objetiva de 10x, em 10 secções por animal em 5 regiões diferentes (um total de 50 medições/animal). Os resultados foram expressos em micrômetros.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 1ª Etapa (imunofluorescência para a marcação de HuC/D, nNOS, VIP, CGRP e ChAT em neurônios mioentéricos).

A Tabela 1 mostra a concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL}$, $\pm\text{DP}$) em ratos expostos cronicamente ou não ao F através da água de beber por 30 dias. Para a concentração plasmática de F neste experimento de exposição crônica, a ANOVA após transformação logarítmica encontrou diferença significativa entre os grupos ($F=53,57$, $p<0,0001$). Apesar de o grupo que recebeu 10 ppm F ter apresentado concentrações plasmáticas de F ligeiramente superiores ao grupo controle, não houve diferença significativa entre ambos. Entretanto, os mesmos tiveram concentrações plasmáticas significativamente inferiores ao grupo que recebeu 50 ppm F ($p<0,001$). Já durante o experimento de exposição aguda, foi observada uma concentração plasmática de F significativamente maior no grupo que recebeu 25 mg F/kg em relação ao controle (teste t não pareado com correção de Welch, $t=5,255$, $p=0,0008$), como mostrado na Tabela 2.

5.2. Concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 2ª Etapa (imunofluorescência para a marcação da SP em neurônios mioentéricos).

Para a concentração plasmática de F neste experimento de exposição crônica (Tabela 1), o teste de Kruskal-Wallis encontrou diferença significativa entre os grupos ($KW=12,819$, $p=0,0016$). Nas 2ª e 3ª etapas, foi observada uma dose-resposta, com diferença significativa entre todos os grupos ($p<0,01$).

Já durante o experimento de exposição aguda, foi observada uma concentração plasmática de F significativamente maior no grupo que recebeu 25 mg F/kg em relação ao controle (teste de Mann-Whitney, $U'=30.000$, $p=0,0076$), como mostrado na Tabela 2.

5.3. Concentração plasmática de F dos animais destinados à técnica da 3ª Etapa (Análise proteômica do intestino)

Para os ratos expostos cronicamente ao F, os dados apresentaram distribuição normal, mas não homogênea. Foram então transformados em logaritmo e analisados por

ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparações individuais. A Tabela 1 mostra a concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) em ratos expostos cronicamente ou não ao F através da água de beber por 30 dias. Para a concentração plasmática de F neste experimento de exposição crônica, a ANOVA após transformação logarítmica encontrou diferença significativa entre os grupos ($F=14,159$, $p=0,0003$). Foi observada uma dose-resposta, com diferença significativa entre todos os grupos.

Já para os ratos submetidos à dose aguda de F, os dados apresentaram distribuição normal, mas não homogênea. Foram então analisados pelo teste t não pareado com correção de Welch. Foi observada uma concentração plasmática de F significativamente maior no grupo que recebeu 25 mg F/kg em relação ao controle (teste t não pareado com correção de Welch, $t=6,260$, $p=0,0015$), como mostrado na Tabela 2.

Tabela 1. Concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) em ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias, para a realização das 3 etapas do projeto. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.

GRUPOS	[F] plasma ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$)		
	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa
Controle	0,010 $\pm$ 0,003 ^a	0,008 $\pm$ 0,003 ^a	0,011 $\pm$ 0,003 ^a
10 ppm F	0,014 $\pm$ 0,005 ^a	0,016 $\pm$ 0,006 ^b	0,021 $\pm$ 0,010 ^b
50 ppm F	0,039 $\pm$ 0,015 ^b	0,059 $\pm$ 0,022 ^c	0,036 $\pm$ 0,012 ^c

* Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA após transformação logarítmica e teste de Tukey, $p < 0,001$). n=12-16 (1ª etapa). n=5-6 (2ª etapa). n=6-7 (3ª etapa).

Tabela 2. Concentração plasmática média de F ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) em ratos, após administração de dose única de F por gavagem gástrica, para a realização das 3 etapas do projeto. Grupos animais: Controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).

GRUPOS	[F] plasma ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$)		
	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa
Controle	0,012 $\pm$ 0,003 ^a	0,007 $\pm$ 0,003 ^a	0,009 $\pm$ 0,003 ^a
25 mg F/Kg	4,882 $\pm$ 2,780 ^b	3,951 $\pm$ 2,782 ^b	12,735 $\pm$ 4,980 ^b

* Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições. Na 1ª e 3ª etapas foi utilizado o teste *t* não pareado com correção de Welch, $p=0,0008$. Na 2ª etapa foi utilizado o teste *t* não pareado após transformação logarítmica, $p<0,0001$). $n=9-12$ (1ª etapa). $n=6$ (2ª e 3ª etapas).

5.4. Análise quantitativa da inervação entérica

5.4.1. Exposição crônica

5.4.1.1. Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à HuC/D

No duodeno não foram verificadas alterações estatisticamente significativas da densidade da população geral de neurônios nos animais dos grupos de 10 e 50 ppm F. Já para o jejuno e o íleo foi observada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade da população geral de neurônios nos animais que receberam as concentrações de 10 e 50 ppm F, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3; Anexos 4, 5 e 6).

5.4.1.2. Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à proteína nNOS

No duodeno e jejuno foi verificada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade dos neurônios nitrérgicos do grupo que recebeu a concentração de 50 ppm F quando comparado ao grupo controle. Já para íleo não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa na densidade da população geral de neurônios dos grupos de 10 e 50 ppm F quando comparados ao grupo controle (Tabela 3; Anexos 4, 5 e 6).

5.4.2. Exposição aguda

5.4.2.1. Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à HuC/D

No jejuno foi verificada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade da população geral de neurônios do grupo da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparado ao grupo controle (Tabela 4; Anexos 7, 8 e 9), enquanto no duodeno e no íleo não foram verificadas alterações estatisticamente significativas.

5.4.2.2. Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos à proteína nNOS

Nos três segmentos analisados (duodeno, jejuno e íleo) foi verificada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade de neurônios nitrérgicos nos animais do grupo que recebeu a dose aguda (25 mg F/kg) quando comparado ao grupo controle (Tabela 4; Anexos 7, 8 e 9).

Tabela 3. Densidade de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e nNOS (neurônios/cm²), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

GRUPOS	HuC/D (neurônios/cm ²)			nNOS (neurônios/cm ²)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	13.663,3 $\pm$ 290,9 ^a	16.968 $\pm$ 349,6 ^a	16.626,7 $\pm$ 493,6 ^a	5.339,6 $\pm$ 125,2 ^a	5.725,3 $\pm$ 122,9 ^a	4.563,4 $\pm$ 130,5 ^a
10 ppm F	13.823,6 $\pm$ 390,8 ^a	15.420,4 $\pm$ 392,1 ^b	14.990,2 $\pm$ 419,1 ^b	5.257,1 $\pm$ 135,0 ^a	5.558,6 $\pm$ 134,2 ^a	4.334,9 $\pm$ 119,6 ^a
50 ppm F	13.872,8 $\pm$ 319,2 ^a	15.299,8 $\pm$ 380,2 ^b	14.615,6 $\pm$ 461,9 ^b	4.706,3 $\pm$ 124,4 ^b	5.176,1 $\pm$ 145,7 ^b	4.353,9 $\pm$ 136,1 ^a

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Fisher ($p < 0,05$). (n=6).

Tabela 4. Densidade de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e à nNOS (neurônios/cm²), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupos animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal). Resultados expressos em média ± erro padrão.

GRUPOS	HuC/D (neurônios/cm ²)			nNOS (neurônios/cm ²)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	15.365,5±392,0 ^a	16.594±343,1 ^a	13.099,8±420,9 ^a	5.539,9±164,9 ^a	5.959,9±138,7 ^a	4.657,1±145,4 ^a
25 mg F/Kg	14.996,9±345,4 ^a	13.848,4±324,3 ^b	12.756,9±347,7 ^a	5.097,1±122,9 ^b	5.219,9±151,6 ^b	3.905,6±129,7 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t de *Student* ($p < 0,05$). (n=6).

5.5. Análise morfológica da inervação entérica

5.5.1. Exposição crônica

5.5.1.1. Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imuno-reativos à HuC/D

No duodeno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a uma diminuição no valor médio das áreas para o grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. Nos outros dois segmentos (jejuno e íleo) não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos ao F quando comparados ao grupo controle (Tabela 5; Anexos 4, 5 e 6).

5.5.1.2. Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imuno-reativos à nNOS

No duodeno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a uma diminuição no valor médio das áreas para o grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. Nos outros dois segmentos (jejuno e íleo) não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos ao F quando comparados ao grupo controle (Tabela 5; Anexos 4, 5 e 6).

5.5.1.3. Análise morfométrica das varicosidades imuno-reativas ao CGRP

No duodeno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a um aumento no valor médio das áreas para o grupo de 10 ppm F e uma diminuição para o grupo de 50 ppm F, em relação ao grupo controle. Entretanto, no jejuno não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos ao F quando comparados ao grupo controle. Já no íleo ocorreu um aumento significativo tanto para a concentração de 10 ppm F quanto para a de 50 ppm F, sendo maior para a concentração de 50 ppm F (Tabela 6; Anexos 10, 11 e 12).

5.5.1.4. Análise morfométrica das varicosidades imuno-reativas ao VIP

No duodeno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a um aumento no valor médio das áreas para os dois outros grupos (10 ppm F e 50 ppm F),

em relação ao grupo controle. Para o jejuno e o íleo, o aumento estatisticamente significativo ocorreu apenas no grupo de 50 ppm F (Tabelas 6; anexos 13, 14 e 15).

5.5.1.5. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à ChAT

No duodeno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a um aumento no valor médio das áreas para o grupo de 50 ppm F e uma diminuição para o grupo de 10 ppm F, em relação ao grupo controle. No jejuno houve aumento estatisticamente significativo para os dois grupos 10 e 50 ppm de F quando comparados ao controle, sendo maior para o grupo de 50 ppm F. Já no íleo, houve uma diminuição significativa para o grupo de 10 ppm F e um aumento significativo para o grupo de 50 ppm F, quando comparados ao controle (Tabela 7; Anexos 16, 17 e 18).

5.5.1.6. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à SP

No duodeno e no jejuno, os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondem a um aumento no valor médio das áreas para os grupos de 10 e 50 ppm F em relação ao grupo controle, sendo que houve um maior aumento no duodeno para o grupo de 50 ppm. Para o íleo, também foi verificado um aumento estatisticamente significativo para os grupos de 10 e 50 ppm F, porém os valores entre os dois grupos não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 7; Anexos 19, 20 e 21).

Tabela 5. Médias e erro padrão dos valores das áreas dos corpos celulares de neurônios mioentéricos imunorreativos à HuC/D e nNOS (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.

GRUPOS	HuC/D (μm^2)			nNOS (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	288,63 $\pm$ 3,17 ^a	304,9 $\pm$ 3,54 ^a	315,1 $\pm$ 3,96 ^a	281,8 $\pm$ 2,90 ^a	291,4 $\pm$ 3,16 ^a	293,1 $\pm$ 3,11 ^a
10 ppm F	286,04 $\pm$ 3,64 ^a	310,7 $\pm$ 3,80 ^a	311,8 $\pm$ 3,86 ^a	274,9 $\pm$ 2,97 ^{ab}	296,6 $\pm$ 3,45 ^a	300 $\pm$ 3,424 ^a
50 ppm F	263,24 $\pm$ 3,10 ^b	304,8 $\pm$ 3,75 ^a	321,6 $\pm$ 3,62 ^a	267,5 $\pm$ 2,99 ^b	289,6 $\pm$ 2,91 ^a	290,2 $\pm$ 3,25 ^a

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=6).

Tabela 6. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas ao VIP e ao CGRP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.

GRUPOS	VIP (μm^2)			CGRP (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	2,64 $\pm$ 0,02 ^a	3,08 $\pm$ 0,52 ^a	3,55 $\pm$ 0,03 ^a	3,44 $\pm$ 0,03 ^a	3,31 $\pm$ 0,03 ^a	3,24 $\pm$ 0,02 ^a
10 ppm F	2,94 $\pm$ 0,03 ^b	3,98 $\pm$ 0,03 ^{ab}	3,55 $\pm$ 0,04 ^a	3,58 $\pm$ 0,03 ^b	3,35 $\pm$ 0,04 ^a	3,42 $\pm$ 0,03 ^b
50 ppm F	2,93 $\pm$ 0,03 ^b	4,46 $\pm$ 0,04 ^b	4,67 $\pm$ 0,05 ^b	3,25 $\pm$ 0,03 ^c	3,38 $\pm$ 0,03 ^a	3,58 $\pm$ 0,03 ^c

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (n = 6).

Tabela 7. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas à ChAT e à SP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.

GRUPOS	ChAT (μm^2)			SP (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	3,275 $\pm$ 0,03 ^a	2,931 $\pm$ 0,01 ^a	3,145 $\pm$ 0,02 ^a	3,177 $\pm$ 0,03 ^a	2,812 $\pm$ 0,01 ^a	2,894 $\pm$ 0,02 ^a
10 ppm F	3,119 $\pm$ 0,02 ^b	3,261 $\pm$ 0,02 ^b	3,028 $\pm$ 0,02 ^b	4,341 $\pm$ 0,02 ^b	4,860 $\pm$ 0,03 ^b	4,578 $\pm$ 0,02 ^b
50 ppm F	3,772 $\pm$ 0,03 ^c	3,596 $\pm$ 0,02 ^c	3,363 $\pm$ 0,02 ^c	5,159 $\pm$ 0,03 ^c	4,641 $\pm$ 0,03 ^c	4,636 $\pm$ 0,03 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). (n = 6).

5.5.2. Exposição aguda

5.5.2.1. Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à HuC/D

Tanto no duodeno quanto no íleo, foram observados resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) correspondentes a um aumento no valor médio das áreas para o grupo da dose aguda (25 mg F/kg) em relação ao grupo controle. No outro segmento (jejuno) não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos ao F quando comparados ao controle (Tabela 8; Anexos 7, 8 e 9).

5.5.2.2. Análise morfométrica dos corpos celulares dos neurônios imunorreativos à nNOS

Nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo), foram observados resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) do grupo da dose aguda de 25 mg F/kg em relação ao grupo controle. No duodeno e íleo houve uma diminuição nos valores das áreas dos neurônios, enquanto no jejuno ocorreu um aumento (Tabela 8; Anexos 7, 8 e 9).

5.5.2.3. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao CGRP

No duodeno e jejuno não houve alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos grupos da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados com o grupo controle. Já para o íleo foi verificado uma diminuição no valor médio das áreas para o grupo da dose aguda em relação ao controle (Tabela 9; Anexos 22, 23 e 24).

5.5.2.4. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas ao VIP

No duodeno não houve alteração estatisticamente significativa no grupo da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados com o grupo controle. Já para o jejuno foi verificado um aumento estatisticamente significativo no valor das áreas das varicosidades, enquanto no íleo ocorreu uma diminuição significativa para o grupo da dose aguda em relação ao controle (Tabela 9; Anexos 25, 26 e 27).

5.5.2.5. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à ChAT

No duodeno e no íleo ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa nos valores das áreas das varicosidades no grupo da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados com o grupo controle. No jejuno foi verificado um aumento significativo para o grupo da dose aguda em relação ao controle (Tabela 10; Anexos 28, 29 e 30).

5.5.2.6. Análise morfométrica das varicosidades imunorreativas à SP

Nos três segmentos analisados (duodeno, jejuno e íleo) foi verificado um aumento estatisticamente significativo no valor médio das áreas das varicosidades imunorreativas à SP nos animais do grupo que recebeu a dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados ao grupo controle (Tabela 10; Anexos 31, 32 e 33).

Tabela 8. Médias e erro padrão dos valores das áreas dos corpos celulares de neurônios mioentéricos imunorreativos à proteína HuC/D e à nNOS (neurônios/cm²), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupos animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).

GRUPOS	HuC/D (μm^2)			nNOS (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	279,2 $\pm$ 3,4 ^a	319,5 $\pm$ 3,5 ^a	298,0 $\pm$ 3,6 ^a	275 $\pm$ 2,9 ^a	288,7 $\pm$ 3,0 ^a	300,4 $\pm$ 3,3 ^a
25 mg F/Kg	302,1 $\pm$ 3,8 ^b	316,2 $\pm$ 3,9 ^a	312,3 $\pm$ 4,0 ^b	263,7 $\pm$ 2,8 ^b	300,8 $\pm$ 3,0 ^b	287,6 $\pm$ 3,1 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t de *Student* ($p < 0,05$). (n=6).

Tabela 9. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunoreativas ao VIP e ao CGRP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).

GRUPOS	VIP (μm^2)			CGRP (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	3,482 $\pm$ 0,94 ^a	2,818 $\pm$ 0,03 ^a	3,271 $\pm$ 0,03 ^a	3,189 $\pm$ 0,03 ^a	3,460 $\pm$ 0,03 ^a	3,388 $\pm$ 0,02 ^a
25 mg F/Kg	3,919 $\pm$ 0,03 ^a	2,981 $\pm$ 0,03 ^b	3,092 $\pm$ 0,03 ^b	3,181 $\pm$ 0,03 ^a	3,523 $\pm$ 0,03 ^a	3,166 $\pm$ 0,02 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t de *Student* ($p < 0,05$). (n=6).

Tabela 10. Médias e erro padrão dos valores das áreas das varicosidades mioentéricas imunorreativas à ChAT e à SP (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal).

GRUPOS	ChAT (μm^2)			SP (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	3,435 $\pm$ 0,02 ^a	3,37 $\pm$ 0,02 ^a	3,355 $\pm$ 0,02 ^a	3,358 $\pm$ 0,02 ^a	3,071 $\pm$ 0,019 ^a	2,893 $\pm$ 0,013 ^a
25 mg F/Kg	3,305 $\pm$ 0,02 ^b	3,44 $\pm$ 0,02 ^b	3,266 $\pm$ 0,02 ^b	4,857 $\pm$ 0,03 ^b	4,824 $\pm$ 0,030 ^b	4,515 $\pm$ 0,028 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t de *Student* ($p < 0,05$). (n=6).

5.6. Análise proteômica

5.6.1. Exposição crônica

Na exposição crônica ao F, foram identificadas 699, 643 e 591 proteínas nos grupos controle, expostos à concentração de 10 ppm F e 50 ppm F, respectivamente. As análises quantitativa e qualitativa são mostradas nos anexos 34 a 38. A análise quantitativa detectou 229 e 284 proteínas com alteração de expressão para as comparações 10 ppm F vs. controle (Anexo 34) e 50 ppm F vs. controle (Anexo 35), respectivamente. A maioria das proteínas com alteração de expressão encontravam-se suprarreguladas no grupo 10 ppm F vs. controle (143 proteínas; Anexo 34), enquanto que para a comparação 50 ppm F vs. controle, a maioria das proteínas com alteração de expressão encontravam-se subrreguladas no grupo exposto ao F (270 proteínas; Anexo 35). Em adição, 220, 179 e 155 proteínas foram identificadas exclusivamente nos grupos controle, 10 ppm F e 50 ppm F, respectivamente (Anexos 36, 37 e 38).

As Figuras 2 e 3 mostram a classificação funcional de acordo com o processo biológico com termo mais significativo, para as comparações 10 ppm F vs. controle e 50 ppm F vs. controle, respectivamente. A exposição à baixa concentração de F levou à alteração do maior número de categorias funcionais (43; Figura 2). Entre elas, a categoria com a maior porcentagem de genes foi *pyridine nucleotide metabolic process* (41%), seguida por *carboxylic acid metabolic process* (38%), *nicotinamide nucleotide metabolic process* (36%), *cellular component assembly* (29%), *myofibril assembly* (24%), *actomyosin structure organization* (20%) e *cytoskeleton organization* (20%). Já a exposição à concentração mais elevada de F afetou 27 categorias funcionais (Figura 3). Entre elas, as categorias com a maior porcentagem de genes associados foram *protein polymerization* (33%), *positive regulation of organelle organization* (33%), *actin filament organization* (29%), *response to metal ion* (23%), *response to inorganic substance* (23%), *nicotinamide nucleotide metabolic process* (19%), *purine ribonucleoside triphosphate metabolic process* (18%) and *regulation of translation* (18%).

FIGURA 2. Distribuição das proteínas identificadas com a expressão subregulada no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle. As categorias estão apresentadas baseadas na ontologia gênica de acordo com o processo biológico de que participam, fornecida pelo *software*

Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados por termo. Os números de acesso das proteínas foram fornecidos pelo UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o *plugin* ClueGo® v2.0.7 do *software* Cytoscape® (Bindea *et al.*, 2009; Bindea, Galon e Mlecnik, 2013).

FIGURA 3. Distribuição das proteínas identificadas com a expressão subregulada no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com o processo biológico de que participam, fornecida pelo *software*

Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados por termo. Os números de acesso das proteínas foram fornecidos pelo UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o *pluggin* ClueGo® do *software* Cytoscape® (Bindea *et al.*, 2009; Bindea, Galon e Mlecnik, 2013).

Resultados

As Figuras 4 e 5 mostram as *subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para cada comparação. Quando os animais foram submetidos a 10 ppm F (Figura 4), a maioria das proteínas com alteração de expressão apresentavam interação com *Pleiotrophin* (P63090) e *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* (P50398) sendo que algumas interagiam com a *RNA-binding protein PNO1* (Q6VBQ8) e outras com a *Mitogen-activated protein kinase 14* (MAPK14; P70618). Já a exposição à concentração mais alta de F levou à geração de uma *network* extremamente complexa (Figura 5). Neste caso, muitas das proteínas com alteração de expressão interagiam com proteínas envolvidas em vias de sinalização gerais e especializadas, como *Mitogen-activated protein kinase 3* (MAPK3; P21708), *Mothers against decapentaplegic homolog 2* (SMAD2; O70436), *14-3-3 Protein gamma* (P61983), *14-3-3 protein zeta/delta* (P63102), *Beta-arrestin-1* (P29066), *Casein kinase 1 epsilon* (Q9JJ76), *Serine/threonine-protein kinase* (PAK2; Q64303), *Tumor necrosis factor* (TNF; P16599), *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* (Q00960), *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2; P62994), *Protein kinase C epsilon type* (KPCE; P09216) e *Receptor interacting kinase 2* (RIPK2; Q3B7U0).

FIGURA 4. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente. Os nodos em cinza e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem à: *Pleiotrophin* (P63090), *RNA-binding protein PNO1* (Q6VBQ8), *Mitogen-activated protein kinase 14* (P70618) e *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* (P50398). Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (P63245), *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase* (O35077), *Protein disulfide-isomerase* (P04785), *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (P97577), *Glutathione S-transferase P* (P04906), *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Lymphocyte cytosolic protein 1* (Q5XI38), *Ras-related protein Rab-1A* (Q6NYB7), *Ras-related protein Rab-8B* (P70550), *Protein Rab5b* (A1L1J8) e *Protein Rab5c* (B0BNK1).

FIGURA 5. Subnetwork criada pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e

verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, porém estas proteínas não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem à: *Putative RNA exonuclease NEF-sp* (A1A5R7), *PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1* (A4L691), *Aplp1 protein* (B1WBV6), *Mthfd1l protein* (B2GUZ3), *Mothers against decapentaplegic homolog 2* (O70436), *Transthyretin* (P02767), *Protein kinase C epsilon type* (P09216), *Tumor necrosis factor-TNF* (P16599), *Mitogen-activated protein kinase 3-Mapk3* (P21708), *Beta-arrestin-1* (P29066), *Melatonin receptor type 1A* (P49218), *14-3-3 protein gamma* (P63102), *40S ribosomal protein S8* (P62243), *14-3-3 protein epsilon* (P62260), *40S ribosomal protein S13* (P62278), *Growth factor receptor-bound protein 2* (P62994), *14-3-3 protein zeta/delta* (P63102), *Unconventional myosin-Vb* (P70569), *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* (Q00960), *Ripk2 protein* (Q3B7U0), *Tubulin beta-3 chain* (Q4QQS4), *Transducin beta-like protein 3* (Q5U2W5), *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100* (Q5U2Z4), *Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit* (Q63369), *Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor* (Q64259), *Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha* (Q64270), *Serine/threonine-protein kinase PAK 2* (Q64303), *Polyglutamine-binding protein 1* (Q6PCT5), *Cb1-727* (Q7TP21), *Protein quaking* (Q91XU1), *E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63* (Q91Z63), *Epidermal growth factor receptor related protein* (Q91Z63), *Epidermal growth factor receptor related protein* (Q9ESE0), *Drebrin-like protein* (Q9JHL4), *Casein kinase 1 epsilon* (Q9JJ76) e *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta* (Q9QY78). Os números de acesso nos nodos verdes correspondem à: *78 kDa glucose-regulated protein* (P06761), *40S ribosomal protein S14* (P13471), *Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial* (P14604), *60S ribosomal protein L6* (P21533), *40S ribosomal protein S3* (P62909). Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: *Protein Rab5b* (A1L1J8), *Coactosin-like protein* (B0BNA5), *Protein Rab5c* (B0BNK1), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (B1WBQ8), *PWWP domain containing 2* (B1WC60), *Actin related protein 2/3 complex, subunit 4* (Predicted), *isoform CRA_a* (B2RZ72), *Protein Sec61b* (B2RZD1), *Ndufa4 protein* (B2RZD6), *Epithelial cell adhesion molecule* (O55159), *UDP-glucose 6-dehydrogenase* (O70199), *60S acidic ribosomal protein P2* (P02401), *Ornithine aminotransferase, mitochondrial* (P04182), *Malate dehydrogenase, mitochondrial* (P04636), *L-lactate dehydrogenase A chain* (P04642), *Tropomyosin alpha-1 chain* (P04692), *Alpha-enolase* (P04764), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (P04797), *Glutathione S-transferase P* (P04906), *Fructose-bisphosphate aldolase A* (P05065), *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2* (P06686), *Creatine kinase B-type* (P07335), *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1* (P07340), *Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial* (P07756), *Aldose reductase* (P07943), *Glutathione S-transferase Mu 2* (P08010), *Cationic trypsin-3* (P08426), *Histone H2A.Z* (P0C0S7), *Histone H2A type 1-C* (P0C169), *Histone H2A type 1-E* (P0C170), *Ras-related protein Rab-1B* (P10536), *ATP synthase subunit beta, mitochondrial* (P10719), *Clathrin heavy chain 1* (P11442), *Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial* (P11884), *Serotransferrin* (P12346), *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial* (P15999), *Phosphate carrier protein, mitochondrial* (P16036), *Phosphoglycerate kinase 1* (P16617), *Calreticulin* (P18418), *Proteasome subunit beta type-1* (P18421), *Myosin regulatory light chain 12B* (P18421), *Myosin regulatory light chain 12B* (P18666), *Alpha-internexin* (P23565), *Phosphoglycerate mutase 1* (P25113), *Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2* (P25235), *Creatine kinase U-type, mitochondrial* (P25809), *Vimentin* (P31000), *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1* (P31044), *Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial* (P32551), *Ras-related protein Rab-10* (P35281), *ATP synthase subunit delta, mitochondrial* (P35434), *Galectin-4* (P38552), *40S ribosomal protein SA* (P38983), *L-lactate dehydrogenase B chain* (P42123), *Glutathione S-transferase alpha-5* (P46418), *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* (P46462), *60S ribosomal protein L22* (P47198), *Annexin A6* (P48037), *Desmin* (P48675), *40S ribosomal protein S3a* (P49242), *Transketolase* (P50137), *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* (P50398), *Rab GDP dissociation inhibitor beta* (P50399), *Ras-related protein Rab-26* (P51156), *Caspase-3* (P55213), *Annexin A4* (P55260), *Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial* (P56574), *Actin-cytoplasmic 1* (P60711), *Ras-related protein Rab-14* (P61107), *Calmodulin* (P62161), *40S ribosomal protein S15a* (P62246), *Elongation factor 1-alpha 1* (P62630), *Elongation factor 1-alpha 2* (P62632), *GTP-binding nuclear protein Ran* (P62828), *Actin, aortic smooth*

muscle (P62738), *40S ribosomal protein S25* (P62853), *Nuclease-sensitive element-binding protein 1* (P62961), *Profilin-1* (P62963), *Ras-related protein Rab-3A* (P63012), *Heat shock cognate 71 kDa protein* (P63018), *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (P63245), *Actin-cytoplasmic 2* (P63259), *Actin-gamma-enteric smooth muscle* (P63269), *Prohibitin* (P67779), *Actin-alpha cardiac muscle 1* (P68035), *Actin-alpha skeletal muscle* (P68136), *Tubulin alpha-1A chain* (P68370), *Tubulin beta-5 chain* (P69897), *Ras-related protein Rab-8B* (P70550), *Heat shock protein HSP 90-alpha* (P82995), *Tubulin beta-2A chain* (P85108), *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (P97577), *Polypyrimidine tract-binding protein 1* (Q00438), *Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial* (Q01205), *ADP/ATP translocase 1* (Q05962), *Annexin A2* (Q07936), *Adenylyl cyclase-associated protein 1* (Q08163), *ADP/ATP translocase 2* (Q09073), *Tubulin beta-2B chain* (Q3KRE8), *Eukaryotic translation initiation factor 5A-1* (Q3T1J1), *Peroxisomal biogenesis factor 7* (Q498S5), *Protein Tubb6* (Q4QQV0), *Tubulin beta-3 chain* (Q4QRB4), *Aspartyl aminopeptidase* (Q4V8H5), *Glutathione S-transferase mu 4* (Q5BK56), *Leucine-rich repeat-containing protein 59* (Q5RJR8), *WD repeat-containing protein 1* (Q5RKI0), *Rho GDP-dissociation inhibitor 1* (Q5XI73), *2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial* (Q5XI78), *Tubulin alpha-4A chain* (Q5XIF6), *Protein disulfide-isomerase A6* (Q63081), *Peroxiredoxin-1* (Q63716), *Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial* (Q64428), *Endoplasmic reticulum chaperone BiP* (Q66HD0), *Elongation factor 1-gamma* (Q68FR6), *Tubulin alpha-3 chain* (Q68FR8), *Cytochrome b-c1 complex subunit 1-mitochondrial* (Q68FY0), *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (Q6AXV0), *Tubulin alpha-8 chain* (Q6AY56), *Tubulin alpha-1C chain* (Q6AYZ1), *Keratin-type II cytoskeletal 7* (Q6IG12), *Ras-related protein Rab-1A* (Q6NYB7), *Eukaryotic translation initiation factor 4A1* (Q6P3V8), *Tubulin beta-4B chain* (Q6P9T8), *Tubulin alpha-1B chain* (Q6P9V9), *Nuclear distribution protein nudE-like 1Ndel1* (Q78PB6), *ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1* (Q811U3), *Citrate synthase, mitochondrial* (Q8VHF5), *Selenium-binding protein 1* (Q8VIF7), *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Aconitate hydratase-mitochondrialAco2* (Q9ER34), *Myosin phosphatase Rho-interacting protein* (Q9ERE6), *Alpha-actinin-4* (Q9QXQ0), *Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain* (Q9QXU8), *Peroxiredoxin-5, mitochondrial* (Q9R063), *Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1* (Q9WVB9), *Glutathione S-transferase Mu 5* (Q9Z1B2) e *3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1* (Q9Z1N4).

5.6.2. Exposição aguda

Na exposição aguda ao F, foram identificadas 520 e 508 proteínas, nos grupos controle e dose aguda de 25 mg F/Kg, respectivamente. As análises quantitativa e qualitativa são mostradas nos Anexos 39, 40 e 41. A análise quantitativa detectou 356 proteínas com alteração de expressão para as comparações controle *vs.* 25 mg F/Kg. A maioria das proteínas com alteração de expressão encontravam-se subreguladas no grupo 25 mg F/Kg *vs.* controle (89 proteínas; Anexo 39). Em adição, 164 e 152 proteínas foram identificadas exclusivamente nos grupos controle (Anexo 40) e 25 mg F/Kg (Anexo 41), respectivamente.

A Figura 6 mostra a classificação funcional de acordo com o processo biológico com termo mais significativo para a comparação 25 mgF/Kg *vs.* controle. A exposição aguda ao F afetou 18 categorias funcionais. Dentre estas, as que apresentaram maior porcentagem de genes por termo foram: *generation of precursor metabolites and energy* (27%), *NADH metabolic process* (21%), *glutathione metabolic process* (15%), *muscle structure development* (18%), *muscle system process* (17%), *myofibril assembly* (14%) e *purine ribonucleoside triphosphate process* (15%).

A Figura 7 mostra as *subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para a comparação entre o grupo exposto ao F e o grupo controle. As proteínas com alteração de expressão identificadas interagem com as seguintes proteínas: *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Mitogen-activated protein kinase 3-MAPK3* (Uniprot-P21708, 2015), *Synaptojanin-1* (Q62910), *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (P13569), *14-3-3 Protein zeta/delta* (P63102), *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* (B0BNL2), *Plastin-3* (Q63598) e *Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit* (Q5BJ92).

FIGURA 6. Distribuição das proteínas identificadas com a expressão subregulada no grupo de 25 mg F/kg em relação ao grupo controle. As categorias estão apresentadas baseada na ontologia gênica de acordo com o processo biológico de que participam, fornecida pelo *software* Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados por termo. Os números de acesso das proteínas foram fornecidos pelo UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o *plugin* ClueGo® do *software* Cytoscape® (Bindea *et al.*, 2009; Bindea, Galon e Mlecnik, 2013).

FIGURA 7. *Subnetwork* criada pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de 25 mg F/kg em relação ao grupo controle. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo

CYTOSCAPE®, porém estas proteínas não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos das proteínas de interação (cor cinza) correspondem a: *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Mitogen-activated protein kinase 3-MAPK3* (P21708), *Synaptojanin-1* (Q62910), *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (P13569), *14-3-3 Protein zeta/delta* (P63102), *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* (B0BNL2), *Plastin-3* (Q63598) e *Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit* (Q5BJ92). Uma única proteína apresentou a sua expressão suprarregulada (cor verde): *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480). Todas as outras proteínas apresentaram sua expressão subregulada, dentre elas: *Ccdc94 protein* (A2VD11), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (B1WBQ8), *60S acidic ribosomal protein P2* (P02401), *Malate dehydrogenase, mitochondrial* (P04636), *L-lactate dehydrogenase A chain* (P04642), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (P04797), *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3* (P06687), *Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial* (P07756), *Histone H2A.Z* (P0C0S7), *Histone H2A type 1-C* (P0C169), *Histone H2A type 1-E* (P0C170), *ATP synthase subunit beta, mitochondrial* (P10719), *Aspartate aminotransferase, cytoplasmic* (P13221), *Phosphoglycerate kinase 1* (P16617), *Creatine kinase U-type, mitochondrial* (P25809), *Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial* (P32551), *ATP synthase subunit delta, mitochondrial* (P35434), *Adenine phosphoribosyltransferase* (P36972), *Heat shock protein beta-1* (P42930), *Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial* (Q60587), *Major vault protein* (Q62667), *Keratin, type I cytoskeletal 19* (Q63279), *Polyubiquitin-C* (Q63429), *Peroxiredoxin-1* (Q63716), *Elongation factor 1-gamma* (Q68FR6), *Histone H3.1* (Q6LED0), *Citrate synthase, mitochondrial* (Q8VHF5), *Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1* (Q9JJ19).

5.7. Análise da morfologia básica do intestino delgado**5.7.1. Exposição crônica**

Após a exposição crônica, em relação ao grupo controle, não foram observadas alterações significativas para a espessura total da parede intestinal no duodeno. Porém, na espessura da túnica muscular deste segmento, foi observado um aumento significativo no grupo de 50 ppm F. No jejuno, foram observados uma diminuição estatisticamente significativa na espessura total da parede intestinal no grupo que recebeu a concentração de 50 ppm F; e um aumento estatisticamente significativo na espessura da túnica muscular também para o grupo de 50 ppm F. No íleo, foi observado um aumento significativo na espessura total da parede do intestino para os grupos de 10 e 50 ppm F, sendo o aumento maior para o grupo de 10 ppm F. Quanto à espessura da túnica muscular do íleo, foi observado um aumento significativo nos grupos de 10 e 50 ppm F, sendo o maior aumento para o grupo de 10 ppm F (Tabela 11).

5.7.2. Exposição aguda

Em relação ao grupo controle, observou-se no duodeno no grupo da dose aguda, um aumento estatisticamente significativo no valor da espessura total da parede intestinal, enquanto na espessura da túnica muscular foi observada uma diminuição estatisticamente significativa. No jejuno e no íleo foi observada uma diminuição estatisticamente significativa tanto na espessura total da parede do intestino quanto na espessura da túnica muscular do grupo da dose aguda (Tabela 12).

Tabela 11. Espessura total da parede espessura da túnica muscular (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos expostos ou não cronicamente ao F, através da água de beber por 30 dias. Grupos animais: Controle (água deionizada - 0 ppm F), 10 ppm F e 50 ppm de F.

GRUPOS	Espessura da túnica muscular (μm^2)			Espessura total da parede (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	129,65 $\pm$ 1,73 ^a	81,47 $\pm$ 1,08 ^a	111,85 $\pm$ 1,81 ^a	1028,30 $\pm$ 13,17 ^a	783,15 $\pm$ 5,80 ^a	774,05 $\pm$ 9,47 ^a
10 ppm F	137,17 $\pm$ 2,24 ^a	84,23 $\pm$ 2,47 ^a	160,79 $\pm$ 4,98 ^b	1224,15 $\pm$ 10,14 ^a	734,36 $\pm$ 11,78 ^b	1165,77 $\pm$ 10,75 ^b
50 ppm F	161,55 $\pm$ 3,73 ^b	92,97 $\pm$ 1,37 ^b	135,06 $\pm$ 3,54 ^c	1245,75 $\pm$ 13,00 ^a	742,25 $\pm$ 7,78 ^b	833,63 $\pm$ 10,09 ^c

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 12. Espessura total da parede espessura da túnica muscular (μm^2), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), após administração de dose única de F por gavagem gástrica. Grupo animais: controle (água deionizada) e grupo exposto ao F (dose de 25 mg F/Kg peso corporal). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão. (n = 6).

GRUPOS	Espessura da túnica muscular (μm^2)			Espessura total da parede (μm^2)		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle	197,5 $\pm$ 9,83 ^a	116,4 $\pm$ 3,76 ^a	223,6 $\pm$ 7,808 ^a	1.006,00 $\pm$ 15,93 ^a	784,4 $\pm$ 10,44 ^a	784,1 $\pm$ 17,05 ^a
25 ppm F	172,9 $\pm$ 4,25 ^b	90,07 $\pm$ 1,91 ^b	134,0 $\pm$ 2,485 ^b	1.194,00 $\pm$ 9,33 ^b	697,1 $\pm$ 9,599 ^a	756,5 $\pm$ 12,92 ^b

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t de Student ($p < 0,05$).

Discussão

6. Discussão

O F é capaz de entrar no corpo humano através do TGI, trato respiratório e da pele, sendo o TGI considerado a principal rota de exposição ao F, uma vez que a água e os alimentos são as maiores fontes do F ingerido (Zheng *et al.*, 2002). A partir do TGI, o F é em parte absorvido e distribuído ao organismo pelo sangue (Barbier, Arreola-Mendoza e Del Razo, 2010), sendo transportado principalmente através do plasma (Zheng *et al.*, 2002).

No que diz respeito à distribuição do F pelo organismo, existe uma taxa constante entre os níveis de F que existem no plasma e nos tecidos moles (Whitford, Pashley e Reynolds, 1979). Isto significa que, embora os níveis de F plasmáticos e intracelulares em muitos tecidos não sejam iguais, a razão das concentrações é constante, mesmo quando os níveis plasmáticos mudam rapidamente (Whitford, 1990). Esta razão constante é mantida porque as membranas celulares estão sempre permeáveis, e as ligações do F aos componentes celulares são mínimas (Gutknecht e Walter, 1981).

Os resultados obtidos em nosso trabalho, com a análise da concentração do F no plasma, comprovam que os animais foram expostos à dose de 25 mg F/Kg e às concentrações de 10 e 50 ppm F. Especialmente no caso da exposição aguda, em que o sangue foi coletado dos animais após duas horas da aplicação da dose de 25 mg F/Kg, ficou evidenciada a sua absorção tanto pelo estômago quanto pelo intestino delgado, pelos elevados níveis plasmáticos de F.

Em nosso estudo, a exposição ao F foi executada várias vezes, em diferentes períodos, para que fosse alcançado o “n” necessário para a realização de todas as técnicas. Foram observados valores médios da concentração plasmática de $0,014 \pm 0,005$, $0,016 \pm 0,006$ e $0,021 \pm 0,010$ mg/L para a dose de 10 ppm F. Para a dose de 50 ppm F, foram encontrados os valores de $0,039 \pm 0,015$, $0,059 \pm 0,022$ e $0,036 \pm 0,012$ µg/mL. Nossos valores estavam dentro do apresentado em outros estudos do nosso grupo, em que foi avaliada a concentração plasmática de F com objetivo de investigar os seus efeitos no fígado (Pereira, Leite, *et al.*, 2013) e rins (Kobayashi *et al.*, 2009).

No caso da exposição aguda, verificamos em nosso estudo os valores de $4,882 \pm 2,780$, $3,951 \pm 2,782$ e $12,735 \pm 4,980$ µg/mL. Embora no último período de exposição os valores médios tenham sido significativamente maiores, estes valores estão de acordo com resultados prévios encontrados pelo nosso grupo, nos quais são também observadas variações. Ao ser administrada uma dose de 50 mgF/Kg (peso corporal) a ratos *Wistar*, por exemplo, após 2 horas, os níveis plasmáticos de F encontrados foram de $8,19 \pm 1,67$ µg/mL

(Leite, 2010). Entretanto, em um outro estudo do nosso grupo, valores diferentes foram observados em ratos *Wistar* de 70 dias, os quais receberam uma dose de 50 mgF/Kg peso corporal e apresentaram uma concentração plasmática média ($\pm$ SD) de $3,390 \pm 1,280 \mu\text{g/mL}$ (Buzalaf *et al.*, 2004). Portanto, variações são admissíveis.

A concentração plasmática de F é considerada um indício tão importante da sua absorção, que em casos em que é verificada a intoxicação sistêmica com HF, a Organização Mundial da Saúde determina que o sangue deve ser coletado imediatamente para a avaliação da quantidade de Ca^{2+} , K^+ e outros eletrólitos (Gutknecht e Walter, 1981), dado que o F interage e se liga fortemente a estes outros íons, sendo que grandes diminuições nas suas concentrações são consideradas um indicativo da alta absorção do F, e consequentemente da sua toxicidade. Neste caso, a análise da concentração de F não é solicitada, pois esta análise exige um método preciso (Taves, 1968b), que normalmente não é padronizado como rotina em laboratórios de análises clínicas, sendo a análise dos outros íons considerada mais rápida.

É importante lembrar que, no caso do F ingerido, a sua concentração plasmática é diretamente relacionada à sua taxa de absorção pelo TGI (Whitford e Pashley, 1984; Nopakun, Messer e Voller, 1989).

No que diz respeito à absorção do F, o seu transporte através de membranas biológicas ocorre principalmente por difusão, sendo o HF altamente permeável, com um coeficiente de permeabilidade próximo ao da água, descrito como de 1 milhão de vezes maior do que a do íon F (Gutknecht e Walter, 1981). Por esta razão, a taxa de absorção gástrica é inversamente proporcional ao pH (Whitford, 1994), pois quanto menor o pH; maior será a concentração de íons H^+ , a formação de HF, e consequentemente da sua absorção neste sítio. Dessa forma, a absorção do F pelo TGI é considerada significativamente importante, sendo que no estômago o F ingerido é convertido em HF, e se inicia o seu processo de absorção sistêmica, através do qual o F se difunde pelo organismo através do sangue.

A absorção de F pelo estômago tem sido avaliada através de inúmeras técnicas, nas quais pode representar de 25% (Nopakun, Messer e Voller, 1989) a 40% da absorção total do F pelo TGI (Whitford e Pashley, 1984). A absorção gástrica é evidenciada pelo tempo observado para o aumento significativo da concentração plasmática de F, o qual ocorre após 5 minutos da sua ingestão (Whitford, 1994), com picos plasmáticos entre 30 a 60 minutos, confirmando o estômago como o sítio inicial da sua absorção pelo TGI (Whitford e Pashley, 1984; Messer e Ophaug, 1991). Dessa forma, a determinação da concentração plasmática de F

oferece um dado importante sobre a dinâmica da absorção de F, especialmente pelo TGI (Gharzouli e Senator, 1994).

Em nosso trabalho, utilizamos o NaF, o qual também apresenta toxicidade relacionada a altos picos plasmáticos, o que valida a sua utilização em estudos experimentais (Whitford e Pashley, 1984). Quando o NaF é administrado em uma dose de 4,5 mg F/kg, por exemplo, a concentração plasmática do F se encontra em uma faixa de $0,07 \pm 0,01$ µg/mL (inicialmente) e de $3,13 \pm 0,69$ µg/mL (após uma hora), sendo este último valor considerado como o correspondente ao nível máximo de F assimilado a partir da dose de NaF aplicada (Suarez, Quintana e Hernandez, 2008).

Infelizmente, em nosso estudo, não coletamos o sangue em diferentes períodos para sabermos a hora exata em que foi alcançado o pico plasmático para a dose de 25 mgF/kg, mas acreditamos que o período de 2 horas é suficiente para que ocorra quase a totalidade da absorção do F pelo intestino delgado, dado que Messer e Ophaug (1991) descrevem que 95,9% da dose inicial de F, a partir da ingestão de NaF, é totalmente absorvida pelo TGI de ratos, em até 2 horas, sendo que, após este período, a concentração plasmática de F diminui progressivamente (Buzalaf *et al.*, 2004).

Mullenix *et al.* (1995) observaram em ratos, que em 6 semanas de consumo de água nas concentrações de 75 e 100 ppm F, eram produzidos níveis plasmáticos mais altos de F do que com a concentração de 125 ppm F. Neste caso, além da característica da absorção controlada por mecanismos epiteliais, os autores acreditam que a aversão ao sabor da água com um alta concentração de F, também pode ter limitado o consumo da dose de 125 ppm F, prolongando o período necessário para atingir o mesmo nível plasmático alcançado pelas doses de 75 e 100 ppm F. Também por estas características, não utilizamos doses maiores. É interessante ressaltar o resultado deste estudo de Mullenix *et al.* (1995), pois concentrações maiores de F, não necessariamente irão aumentar a sua toxicidade na mesma proporção, embora normalmente aumentem os danos celulares (Chouhan e Flora, 2008).

Outra importante característica a respeito da absorção de F está no fato de que as altas concentrações podem comprometer a sua própria absorção, dado que a presença deste íon aumenta a formação do HF, o qual apresenta um efeito corrosivo sobre a mucosa (Mitsui *et al.*, 2007), fato que pode ativar uma reação gastro-protetora contra a agressão causada pela alta concentração de HF no estômago (Schicho *et al.*, 2003). Embora a acidez facilite a absorção gástrica de F, este processo também é limitado pelas próprias características morfofisiológicas do estômago, dado que dentre suas principais funções estão o

armazenamento e a mistura do alimento ingerido com a secreção gástrica; e não a absorção (Guyton e Hall, 2002).

Embora a absorção gástrica do F seja considerada importante, ainda é considerada menor, quando comparada à intestinal, a qual é responsável por cerca de 45% (He *et al.*, 1998) a 75% (Nopakun, Messer e Voller, 1989) da absorção total do F ingerido.

Da mesma forma como foi realizada a avaliação da absorção do F pelo estômago, Messer e Ophaug (1991) também utilizaram a análise da concentração plasmática de F, para confirmar que o estômago não é o maior sítio de absorção, embora o F seja mais facilmente absorvido na forma de HF e inicialmente a absorção se inicia neste sítio. Neste estudo realizado com ratos (Messer e Ophaug, 1991), ao ser dada a dose de F dissolvida em água, a concentração plasmática aumentava rapidamente, alcançando o máximo de 8,0 $\mu\text{mol/L}$ após 20 minutos e declinava para 1,5 $\mu\text{mol/L}$ em 2 horas.

Ainda neste trabalho de Messer e Ophaug (1991), os pesquisadores aplicaram o F juntamente com a pectina, a qual promove um atraso no esvaziamento gástrico, observando um aumento mais gradual na concentração de F, que alcançou o máximo de 5 $\mu\text{mol/L}$ após 40 minutos. Neste trabalho também foi verificado nos animais do grupo controle (NaF em solução aquosa, sem pectina), que 50% da dose de 50 $\mu\text{g F/mL}$ era absorvida em 20 minutos, chegando a 85% na primeira hora, sendo que em 2 horas, 95,9% da dose inicial de F havia sido absorvida, como citado nesta discussão anteriormente. Com a utilização da pectina, atrasando o esvaziamento gástrico, a absorção inicial foi menor, menos de 40%; 53% da absorção total ocorreu em 40 minutos; e em 2 horas, foi alcançado um valor próximo ao obtido pelo grupo controle, com 93,8% de absorção do total da dose aplicada. Este trabalho confirma que, embora o estômago seja o sítio inicial, o maior responsável pela absorção do F é o intestino delgado, sendo que o esvaziamento gástrico contribui grandemente com este processo, ressaltando a importância da absorção intestinal do F.

Os níveis plasmáticos de F também podem ser calculados a partir de extrapolação dos níveis de F na urina, uma vez que a própria urina é considerada um marcador da sua farmacocinética, e pode oferecer o perfil da absorção e distribuição de F (Milgrom *et al.*, 2014). Neste trabalho de Milgrom *et al.* 2014, foi utilizada a análise da urina para avaliar a absorção de F a partir de um verniz odontológico, frequentemente aplicado em crianças, o qual apresenta 5% de NaF. Após 5 horas da sua aplicação, em crianças de 12 a 15 meses, a urina foi coletada para análise a partir das fraldas usadas pelas crianças. Neste caso, os níveis

de F no plasma foram determinados por extrapolação com os dados obtidos através da análise da urina, uma vez que a coleta de sangue para análise não é permitida por razões éticas.

Neste estudo, a quantidade da urina coletada foi dividida pelo tempo entre as micções e peso da criança; e o *clearance* renal de F foi estimado para idades determinadas. Este dado foi multiplicado pela razão dos níveis de F no plasma em função da sua excreção, e foram estimados também os picos dos níveis de F no plasma ($\mu\text{g F/L}$). Por estes cálculos, foi encontrado um valor de retenção de F de 84% do total ingerido. Entretanto, embora a sua absorção tenha sido alta, os autores consideraram tanto os níveis quanto os picos plasmáticos de F, dentro de limites seguros no que diz respeito à sua toxicidade, e também abaixo dos limites no nível de F que podem levar ao manchamento dentário característico da fluorose. Dessa forma, a aplicação deste verniz foi considerada segura.

Atualmente, o controle da exposição ao F é feito principalmente pela área da odontologia, com o objetivo de evitar o comprometimento da estrutura e estética dentária, uma vez que a fluorose afeta o esmalte dentário, gerando um manchamento que pode ser visto em vários níveis, de moderado a grave (Mullenix *et al.*, 1995). Juntamente com a dentição, o sistema esquelético também é considerado bastante afetado pelo F, porém outras estruturas como o músculo esquelético, medula espinal e cérebro podem ser comprometidos (Chouhan e Flora, 2010).

No que diz respeito ao sistema nervoso, também é estabelecida uma correlação importante entre os níveis plasmáticos de F e a sua neurotoxicidade. É descrito, por exemplo, que a severidade dos efeitos tóxicos do F sobre o comportamento de ratos está diretamente relacionada às concentrações desse íon no plasma e no cérebro (Chen, J. *et al.*, 2003), sendo confirmado também em outros trabalhos, que o F se acumula no cérebro de animais expostos experimentalmente à altas doses por um período prolongado (Geeraerts *et al.*, 1986; Guan *et al.*, 1998), alterando suas funções (Flora, Mittal e Mishra, 2009).

Os efeitos neurológicos da fluorose humana foram relatados no início do século passado, e nesta descrição foram citados sintomas como cansaço excessivo, letargia, dores de cabeça e tonturas (Roholm, 1937). Atualmente, estudos epidemiológicos têm feito associações entre a exposição ao F e alterações no coeficiente de inteligência em crianças, na China (Yang *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011); Índia (Saxena, Sahay e Goel, 2012); Iran (Poureslami, Horri e Garrusib, 2011); e México (Rocha-Amador, Navarro e Carrizales, 2007).

De fato, é estabelecida uma conexão entre a exposição excessiva ao F e disfunções no SNC (Whitford, Pashley e Reynolds, 1979), sendo observadas também

numerosas alterações histopatológicas no cérebro de animais expostos ao F experimentalmente, incluindo a desmielinização; diminuição do número de células de Purkinje; espessamento e desaparecimento de dendritos; inchaço das mitocôndrias e dilatação do retículo endoplasmático em neurônios (Guan *et al.*, 1998).

É interessante lembrar, que o sítio inicial da absorção de F, o estômago, tem sua inervação realizada por diferentes tipos neuronais, incluindo neurônios extrínsecos, representados pela inervação vagal e pelas fibras nervosas periféricas simpáticas e parassimpáticas; assim como pelas fibras intrínsecas, pertencentes ao SNE (Schicho *et al.*, 2003). Em uma situação em que ocorre um aumento na acidez, por exemplo, é desencadeado um mecanismo protetor em resposta ao conteúdo do lúmen gástrico, utilizando tanto a via nervosa extrínseca, quanto a intrínseca (Holzer, 2001).

Alterações na mucosa gástrica, como a presença de HCl, estimulam neurônios intrínsecos do plexo mioentérico do estômago (neurônios motores inibitórios), assim como fibras extrínsecas aferentes sensíveis à capsaicina e colinérgicas (Schicho, Holzer e Lippe, 2004). Portanto, é possível que o F consiga desencadear uma resposta semelhante à apresentada pelo HCl, inicialmente no estômago, pela presença do HF formado após a ingestão de F.

Dessa forma, acreditamos que existem inúmeras evidências de que o SNE pode ser afetado pelo F, tanto por estes indícios que envolvem uma resposta ao conteúdo do lúmen e a toxicidade no SNC, quanto pelos resultados obtidos em nosso estudo, dado que encontramos alterações na plasticidade neuronal entérica, evidenciada pelos dados da análise morfológica, tanto na parte quantitativa quanto na morfométrica, após a exposição aguda e crônica ao F, sendo estes resultados descritos adiante.

Apesar de alguns autores ainda considerarem a avaliação da densidade neuronal entérica um desafio, este método é fundamental para analisar os efeitos patológicos sobre os gânglios entéricos, especialmente sobre os neurônios, com o objetivo de descrever com maior precisão as desordens relacionadas à inervação intestinal (Wieloch *et al.*, 2012). A avaliação da densidade neuronal entérica pode contribuir, por exemplo, com a análise do desenvolvimento de processos inflamatórios no intestino, como a doença do intestino irritável, na qual a alteração no número de neurônios está correlacionada com o nível da inflamação (Margolis *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, após a exposição crônica ao F, não foi observada nenhuma alteração na densidade da população geral de neurônios do duodeno. Entretanto, no jejuno, foi

observada uma diminuição significativa de 10% na densidade neuronal dos animais do grupo de 10 e 50 ppm F, em relação ao controle. Já no íleo, foi observada também uma redução significativa de 10% na densidade neuronal para o grupo de 10 ppm F, enquanto que para o grupo de 50 ppm F, a redução foi um pouco maior, sendo de 12% em relação ao controle, porém estes dois grupos não diferiram significativamente entre si (10 e 50 ppm F). Quanto à exposição aguda ao F, foi observada apenas no jejuno uma diminuição significativa na densidade da população geral de neurônios em 17%.

No caso do SNC, é descrito que a exposição a altas doses de F resulta em degeneração da estrutura neuronal, com significativa redução da mielina nas fibras nervosas (Sesikeran *et al.*, 1994), assim como também é observado um aumento no processo de apoptose (Ge *et al.*, 2006); e perda neuronal (Mullenix *et al.*, 1995; Bhatnagar *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2005).

Da mesma forma como ocorre no SNC, por nossos resultados, podemos sugerir que existe uma possibilidade de que o F também seja tóxico ao SNE, tanto após períodos de exposição crônica quanto aguda, e que pode ainda causar uma redução neuronal no plexo mioentérico do intestino delgado, especialmente no jejuno e no íleo, com valores variáveis para cada segmento. Este dado é bastante importante, pois reduções neuronais entéricas comprometem o funcionamento intestinal, que ocorre em várias patologias descritas a seguir, como: a) no diabetes mellitus, em que alguns pesquisadores descrevem que a diminuição observada na densidade neuronal da população geral é decorrente de uma diminuição na capacidade de defesa antioxidante e de desordens metabólicas que resultam no estresse oxidativo, formação de AGEs (produtos finais da glicação avançada), peroxidação lipídica e aumento na produção de radicais livres (Lopes *et al.*, 2012); b) no caso da colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), na qual a inflamação do cólon é frequentemente associada a uma perda neuronal de 20 a 25% dos neurônios mioentéricos (Linden *et al.*, 2005; Linden, 2012); c) na doença de Crohn, na qual alterações na morfologia neuronal são acompanhadas pela diminuição da densidade neuronal entérica assim como na densidade de fibras nervosas extrínsecas (Schneider *et al.*, 2001); d) na síndrome do intestino irritável, ou a doença do intestino irritável, em que é descrita alteração da motilidade, desconforto e dor, como sintomas bastante debilitantes, os quais também são associados à perda neuronal (Brierley e Linden, 2014).

Embora os processos patológicos sejam os mais citados, até mesmo hábitos alimentares podem promover perda neuronal. No duodeno de ratos que receberam uma dieta

rica em gordura, por exemplo, são verificadas alterações na densidade, com uma diminuição de 2% na população geral do plexo mioentérico (Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013).

Em decorrência da toxicidade do F, são descritos diversos tipos de sintomas semelhantes aos decorrentes das patologias acima mencionadas, que vão desde diarreia até constipação, tanto para a exposição aguda (Sharma, Sohu e Jain, 2009), quanto crônica (Susheela *et al.*, 1992); assim como é descrito também que o F apresenta efeitos tóxicos em diferentes partes do TGI, desde o estômago (Desai *et al.*, 1986), intestino delgado (Dasarathy *et al.*, 1996), a até o intestino grosso (Waldbott e Lee, 1978b). No caso, especificamente da fluorose endêmica, a sintomatologia gastrointestinal grave é também descrita (Susheela *et al.*, 1992; Susheela *et al.*, 1993), como ocorre na China, por exemplo, onde milhares de pessoas são afetadas pela fluorose (Tang *et al.*, 2008).

Dessa forma, a perda neuronal observada em nosso estudo também nos ajuda a explicar e oferecer indícios importantes a respeito dos mecanismos envolvendo estes sintomas da toxicidade do F.

Ao analisar a morfologia dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos IR-HuC/D do intestino delgado, verificamos que a exposição crônica ao F gerou alterações morfométricas estatisticamente significativas apenas no duodeno. Esta alteração correspondeu a uma diminuição no valor médio das áreas dos corpos celulares dos neurônios, dos animais do grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle.

A concentração de 50 ppm F utilizada corresponde à verificada em áreas com altos níveis de F na água de beber naturalmente, assim como exposições devido a atividades laborais (Organization, 2002), sendo considerada excessiva e relacionada ao desenvolvimento da fluorose (Pendrys, 2001). Adicionalmente, a concentração de 50 ppm F também está entre as máximas concentrações tóxicas utilizadas em estudos realizados com animais (Mullenix *et al.*, 1995; Shashi, 2002; Chouhan e Flora, 2008; Chauhan, Ojha e Mahmood, 2011). Dessa forma, é possível que esta alteração morfométrica observada seja um reflexo da toxicidade produzida por esta concentração.

Em contraste à exposição crônica, em que foi observada uma diminuição estatisticamente significativa nos valores das áreas, na análise morfométrica das áreas dos corpos celulares de neurônios dos animais da exposição aguda, foi verificado um aumento no valor médio das áreas dos neurônios IR-HuC/D tanto no duodeno quanto no íleo para a dose de 25mg F/Kg, enquanto no jejuno não houve alteração significativa.

Consideramos estes dados bastante interessantes, pois inicialmente não acreditávamos que uma dose aguda, seguida do sacrifício dos animais após 2 horas da sua aplicação, fosse suficiente para causar alterações significativas em neurônios entéricos, pois este é considerado um curto período; ainda mais porque foi utilizada uma dose de 25 mg F/Kg, sendo esta menor do que as doses agudas de F comumente aplicadas em estudos com animais, sendo comum o uso de doses maiores como a de 50 mg F/Kg (Buzalaf *et al.*, 2004).

É interessante lembrar que os animais receberam a dose aguda em jejum, e a dose era calculada de acordo com o peso corporal do animal, com o objetivo de preencher o maior volume possível do estômago. Este jejum era feito, pois o animal poderia preencher o estômago com alimento, o que levaria ao vômito da dose aguda de F, ou mesmo a uma menor absorção do F em meio ao conteúdo alimentar. Dessa forma, acreditamos que o jejum permitiu a máxima absorção da dose de F.

Pelos nossos resultados, é possível que a concentração de 50 ppm F e a dose de 25 mg F/kg sejam tóxicas aos neurônios entéricos e que possam comprometer o funcionamento do TGI. Podemos sugerir ainda, que habitantes de áreas em que a fluorose é endêmica, onde são verificados vários sintomas gastrointestinais (Susheela *et al.*, 1992; Susheela *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1994; Dasarathy *et al.*, 1996), podem apresentar um comprometimento das funções do TGI, causado pelas alterações em neurônios entéricos, o que levaria não somente a alterações na motilidade como também à capacidade absorptiva, pois o SNE é considerado uma grande rede interconectada dentro do TGI, comunicando diversas profundidades da sua parede com o conteúdo do lúmen.

Estas alterações morfológicas podem ainda ser relacionadas a mecanismos intracelulares complexos, envolvendo até mesmo a produção de neurotransmissores (Lopes *et al.*, 2012) ou a diminuição na expressão de inúmeras proteínas que participam de mecanismos neuronais. Com o objetivo de melhor esclarecer estes mecanismos envolvendo proteínas, oferecemos ainda neste nosso estudo, os resultados da análise proteômica do intestino, os quais são discutidos em detalhe mais adiante, e que podem ajudar a esclarecer o comprometimento do funcionamento do TGI causado pelo F.

Ainda na análise quantitativa, ao avaliarmos a densidade da população nitrérgica dos neurônios mioentéricos, verificamos que após a exposição crônica ao F, o grupo que recebeu a concentração de 50 ppm F apresentou uma redução na densidade no duodeno e jejuno, de 12% e 10% respectivamente. Já no íleo, não foi observada nenhuma alteração significativa. Quanto à exposição aguda, no grupo que recebeu a gavagem gástrica na dose de

25 mg F/kg, foi observada uma redução na densidade dos neurônios nitrérgicos nos 3 segmentos avaliados (duodeno, jejuno e íleo), de 8%, 13% e 16%, respectivamente.

Estes resultados nos chamaram a atenção, pois no TGI, o NO produzido pelos neurônios entéricos está envolvido na regulação da motilidade, secreção e fluxo sanguíneo (Bagyánszki *et al.*, 2011), sendo que a subpopulação nitrérgica constitui um total de 34% dos neurônios entéricos (Bult *et al.*, 1990; Wester, O'briain e Puri, 1999; Rolle, Nemeth e Puri, 2002). Dessa forma, diminuições na sua densidade podem resultar em um comprometimento significativo da função intestinal, especialmente no plexo mioentérico, no qual o NO é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa (Sanders e Ward, 1992; Garthwaite, 1995), sendo considerado o principal neurotransmissor inibitório (Bult *et al.*, 1990; Takahashi, 2003; Qu *et al.*, 2008).

Alterações na via de produção do NO implicam na patofisiologia de algumas desordens da motilidade do TGI (Rivera *et al.*, 2011; Rivera *et al.*, 2012), como a estenose pilórica hipertrófica, doença de Hirschsprung, hipoganglionose, displasia neuronal intestinal e acalásia do esfíncter anal interno (Vanderwinden *et al.*, 1992; Hanani *et al.*, 1995; Hirakawa *et al.*, 1995).

É importante lembrar que além de regular a motilidade (Daniel *et al.*, 1994), o NO também está envolvido em outras funções biológicas dentro do TGI modulando a neurotransmissão e inibição da proliferação de fibras da musculatura lisa (Rivera *et al.*, 2012).

No trato gastroduodenal existem numerosas fibras IR-nNOS na camada circular da musculatura lisa, e acredita-se que esta rica inervação nitrérgica seja um indicativo da dependência do NO para o controle da musculatura lisa intestinal (Adeghate *et al.*, 2003). Justamente na mucosa gastroduodenal é descrito que ocorre grande parte da absorção do F ingerido, sendo esta a primeira via da entrada do F para o sistema circulatório (Dunipace *et al.*, 1995).

Como os neurônios nitrérgicos apresentam um papel fundamental no funcionamento do TGI, e observamos alterações na densidade nitrérgica em decorrência da exposição crônica e aguda ao F, é possível que os vários sintomas gastrointestinais decorrentes da toxicidade do F, também estejam correlacionados com um comprometimento da inervação nitrérgica.

Vários outros estudos também ressaltam a importância de alterações na densidade nitrérgica, como no processo de envelhecimento, por exemplo, onde existe uma diminuição na densidade de neurônios entéricos IR-nNOS em ratos de 6 a 12 meses (Van Ginneken *et al.*,

2011). Neste estudo de Van Ginneken *et al.* (2011), foi observada uma diminuição na densidade dos neurônios IR-nNOS do plexo mioentérico, com um declínio maior na densidade das fibras que penetram na musculatura lisa, o que os autores acreditam que explicaria, em parte, a sintomatologia intestinal importante, de constipação e incontinência fecal em idosos.

Outros processos também são associados à perda neuronal nitrérgica, como descrito por Soares *et al.* (2015), os quais observaram que a dieta rica em gordura produz uma redução no número de neurônios IR-nNOS por gânglio (Soares *et al.* 2015). Stenkamp-Strahm *et al.* (2013) ainda descrevem que reduções no número de neurônios por gânglio podem também comprometer os neurônios remanescentes, como ocorre com o número de neurônios IR-nNOS por gânglio, no caso da ingestão da dieta rica em gordura.

No caso do diabetes mellitus a densidade nitrérgica pode ser alterada em decorrência do estresse oxidativo produzido (Lopes *et al.*, 2012). Neste estudo realizado em ratos, Lopes *et al.* (2012) observaram uma redução significativa de 21,7% na densidade de neurônios mioentéricos IR-nNOS no duodeno de ratos diabéticos.

Da mesma forma como ocorre no diabetes mellitus, é possível que a alta concentração de F também possa ter causado esta diminuição na densidade neuronal através do estresse oxidativo, uma vez que existe uma importante correlação entre o consumo excessivo de F e o desenvolvimento do estresse oxidativo no cérebro, sendo descrito que este mecanismo induz à degeneração de células neuronais, uma vez que o F atravessa a barreira hematoencefálica e pode, portanto comprometer o SNC (Nabavi *et al.*, 2011).

É conhecido também, que a acumulação de F nos tecidos induz ao estresse oxidativo através de um aumento na produção de ROS e da supressão das enzimas endógenas antioxidantes (Ranjan, Swarup e Patra, 2009). Flora *et al.* (2009) também descrevem que a exposição ao F causa uma significativa elevação dos níveis das EROs (espécies reativas de oxigênio) e TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) em todo o cérebro de camundongos, da mesma forma sugerindo que ocorra o estresse oxidativo em decorrência da sua toxicidade.

Em condições normais, o nível de produção e de eliminação das EROs é mantido em um equilíbrio dinâmico, porém, quando ocorre o estresse oxidativo, altos níveis de radicais livres são vistos como os principais fatores causadores de várias patologias, desafiando o papel compensatório do sistema antioxidante (Gao, Liu e Guana, 2009). A ingestão excessiva de F também leva a uma diminuição significativa das enzimas que

eliminam os radicais livres e a um concomitante aumento na peroxidação lipídica em vários tecidos, sugerindo da mesma forma, um aumento do estresse oxidativo (Bhatnagar *et al.*, 2006). Bhatnagar *et al.* (2006) relatam ainda, que este aumento dos radicais livres nos corpos celulares de neurônios pode estar correlacionado com a perda de neurônios do hipocampo e de estruturas sinápticas nas junções neuromusculares.

Como o dano causado aos componentes celulares, como aos lipídios e às membranas celulares pelos radicais livres e outras EROs está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Hassan e Abdel-Aziz, 2010). No SNC, processos de apoptose também podem apresentar vias de sinalização envolvendo o NO, o qual é considerado o maior mediador do dano neuronal causado pelo mal de Parkinson (Jaffrey e Snyder, 1995). Dessa forma, é possível que altas doses de F possam desencadear uma degeneração neuronal entérica, tal como observamos em nossos resultados.

Embora todas estas patologias aqui descritas ofereçam importantes indícios dos possíveis processos que podem levar a uma diminuição na densidade nitrérgica, é importante lembrar que o F atravessa a barreira hematoencefálica e se acumula no cérebro de animais expostos à altas concentrações de F, como o observado no hipocampo, causando degeneração neuronal (Chouhan e Flora, 2010). Também é comprovado que o F é um agente citotóxico, induzindo à apoptose, comprometendo o ciclo celular de neurônios (Ge *et al.*, 2005).

Portanto, pelos dados descritos na literatura, os dados do nosso estudo, a conhecida neurotoxicidade do F (Mullenix *et al.*, 1995), e o fato de que o F é facilmente absorvido pelo TGI (Whitford, 1994), onde causa inúmeros danos (Shashi, 1999; Shashi, 2002), é possível que o F comprometa a densidade do SNE tanto de uma forma geral, quanto de subpopulações específicas, como a nitrérgica.

Em nosso estudo, os efeitos da exposição crônica ao F sob a inervação nitrérgica do plexo mioentérico também foram avaliados através da análise morfométrica da área dos corpos celulares de neurônios IR-nNOS. Após a exposição crônica, foi observado no duodeno, uma diminuição significativa no valor médio das áreas para o grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. Nos outros dois segmentos (jejuno e íleo) não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos ao F quando comparados ao grupo controle.

Quanto à exposição aguda, nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo), foram observados resultados estatisticamente significativos do grupo da dose aguda de 25 mg F/kg em relação ao grupo controle. No duodeno e íleo houve uma diminuição nos valores das áreas dos neurônios, enquanto no jejuno ocorreu um aumento em relação ao grupo controle.

Em nosso estudo, o resultado observado no duodeno, após a exposição crônica pode ser explicado pelo fato do duodeno ser um importante sítio de absorção de F, sendo confirmado que a maior parte da absorção do F ocorre nas regiões proximais do intestino delgado (Nopakun, Messer e Voller, 1989), o que também pode ter facilitado um aumento da toxicidade do F neste segmento, especialmente sobre os neurônios nitrérgicos. O fato do duodeno apresentar um grande número de fibras nitrérgicas (Furness e Costa, 1987), também pode ter levado às alterações morfológicas mais evidentes neste segmento.

O NO apresenta um papel fisiológico e patológico no organismo (Inkielewicz-Stepniak e Czarnowski, 2010). Dessa forma, as alterações da análise morfométrica observadas a partir dos nossos dados, oferecem indícios de que o F pode alterar a neurotransmissão nitrérgica no SNE, especialmente no plexo mioentérico.

Alterações em neurônios nitrérgicos podem desencadear um comprometimento do funcionamento do TGI, pois o NO está envolvido na modulação do tônus da musculatura lisa, assim como no peristaltismo intestinal (Martín, Jiménez e Motilva, 2001). As alterações morfológicas observadas na inervação nitrérgica, em nosso estudo, podem explicar em parte a sintomatologia da exposição ao F, na qual o quadro de constipação é descrito por alguns autores como um dos primeiros sinais da toxicidade do F e da fluorose (Susheela *et al.*, 1993; Shashi, 2002).

Hermes-Uliana *et al.* (2014), ao avaliar o efeito do diabetes sobre os neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico, observaram um aumento nos valores da área dos corpos celulares de neurônios. Os autores confirmaram, através de análise com *western-blotting* que este aumento nos valores das áreas refletia um aumento na expressão da nNOS, e consequentemente um aumento na produção de NO, confirmando este achado com o de outros autores (Wrzos *et al.*, 1997).

Os autores acreditam que no caso do diabetes este aumento na produção de NO gera alterações na função motora intestinal, as quais ajudariam a explicar alguns dos sintomas gastrointestinais descritos em decorrência dessa patologia como náusea, vômito, diarreia, dores abdominais, disfagia, constipação e incontinência fecal (Rodrigues e Motta, 2012).

Um aumento na síntese de NO em neurônios mioentéricos pode gerar desordens da motilidade GI, como um atraso no trânsito intestinal (Bagyánszki *et al.*, 2011). Acredita-se que um comprometimento da produção local de NO no plexo mioentérico pode ser um importante fator contribuinte da patogênese da doença de Chagas (Takahashi, 2003), por exemplo.

Embora tenhamos avaliado os efeitos sobre o plexo mioentérico, não podemos deixar de dizer que outros mecanismos podem ser comprometidos em decorrência da alteração na produção do NO, pois este neurotransmissor também regula a agregação e adesão plaquetária; crescimento celular; apoptose e a resposta imune induzida por infecção (Rosselli, Keller e Dubey, 1998).

Já foi demonstrado que os inibidores da NOS atrasam o esvaziamento gástrico e o trânsito no cólon (Takahashi, 2003), portanto, mecanismos gástricos e do intestino grosso também poderiam ser afetados pelo F. Dado que o estômago é o sítio inicial da absorção do F é possível que alterações na síntese ou liberação de NO também possam representar uma resposta do TGI em frente ao dano causado pelo F, pois propriedades gastro-protetoras do NO são verificadas em estudos de isquemia/reperfusão (Kim e Hwan Kim, 2001).

Além do marcador de população total e do NO, qualquer estudo investigando alterações no código neuroquímico no SNE tem que considerar o padrão de colocação de vários importantes neurotransmissores como ACh, VIP, SP e CGRP (Schneider *et al.*, 2001), os quais também foram avaliados neste estudo.

A ACh é o maior neurotransmissor no SNE (Furness, 2000; Furness, J.B., 2006), sendo o primeiro dentro do plexo mioentérico, e provavelmente o neurotransmissor da maioria das fibras da camada longitudinal da musculatura lisa, sendo sua atividade essencial, pois medeia o peristaltismo reflexo (Sharrad, Chen e Brookes, 2013). Esta característica pode ser comprovada pela presença de numerosos receptores para ACh nas células da musculatura lisa (Yau, Youther e Verdun, 1985), confirmando sua participação ativa na estimulação da atividade motora (Kilbinger *et al.*, 2002). No plexo mioentérico todos os neurônios contêm ACh, com exceção dos neurônios motores IR-nNOS (Furness, 2000).

Como a ACh apresenta um papel fundamental na regulação da motilidade (Furness, Costa e Eckenstein, 1983), a identificação dos neurônios entéricos colinérgicos em diferentes processos patológicos/tóxicos se torna necessária (Sharrad, Chen e Brookes, 2013).

Em nosso estudo, embora tenhamos utilizado um marcador que pode identificar os corpos celulares colinérgicos, não obtivemos esta marcação, pois o anticorpo não necessariamente identifica fibras varicosas e corpos celulares simultaneamente, como o observado no íleo de porcos da Guiné (Sharrad, Chen e Brookes, 2013). Dessa maneira a técnica imunohistoquímica apresenta uma limitação em marcações da população colinérgica.

É interessante lembrar que além da ChAT, outra enzima também é utilizada para a síntese e recaptação da ACh nas vesículas sinápticas, denominada transportador vesicular de

acetilcolina (VChAT) (Sharrad, Chen e Brookes, 2013). Alguns autores consideram a VChAT o marcador específico para as todas as varicosidades colinérgicas, nos gânglios mioentéricos, e relatam que as varicosidades IR-VChAT pertencem na sua maioria aos interneurônios ascendentes e descendentes (Sharrad, Chen e Brookes, 2013).

Existe ainda uma diferença entre a expressão de marcadores colinérgicos para os corpos celulares e os axônios de alguns interneurônios, pois embora todos os corpos celulares dos interneurônios ascendentes são IR-ChAT, as varicosidades não se apresentam totalmente marcadas pela VChAT, mesmo que este seja considerado o marcador específico para as varicosidades em porcos da Guiné (Sharrad, Chen e Brookes, 2013). Dessa forma, a marcação dos corpos celulares dos interneurônios descendentes e ascendentes pode diferir do observado nos axônios varicosos.

Como as varicosidades identificadas pela VChAT marcam interneurônios, e o nosso objetivo era a marcação de neurônios motores; e a VChAT também não marca todas as varicosidades colinérgicas, acreditamos que nossa marcação de varicosidades IR-ChAT oferece dados importantes, e bastante específicos da inervação colinérgica motora. Sendo assim, nossos dados podem oferecer indícios importantes sobre os efeitos do F sobre a motilidade intestinal já que no plexo mioentérico a ACh é o maior neurotransmissor.

Ao avaliarmos os efeitos da exposição crônica sob as varicosidades mioentéricas IR-ChAT, encontramos uma grande variação no que diz respeito ao valor de suas áreas. No duodeno, foram encontrados resultados estatisticamente significativos que correspondem a um aumento no valor médio das áreas das varicosidades IR-ChAT para o grupo de 50 ppm F e uma diminuição para o grupo de 10 ppm F, em relação ao grupo controle. No jejuno houve um aumento estatisticamente significativo para os dois grupos (10 e 50 ppm de F) quando comparados ao controle, sendo maior para o grupo de 50 ppm F. Já no íleo, os resultados estatisticamente significativos correspondem a uma diminuição para o grupo de 10 ppm F e um aumento para o grupo de 50 ppm F quando comparados ao controle.

No duodeno e no íleo ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa nos valores das áreas das varicosidades no grupo da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados ao grupo controle. Enquanto no jejuno foi verificado um aumento significativo para o grupo da dose aguda em relação ao controle.

Embora seja descrito que a combinação do F com inúmeros íons metálicos pode também inibir o efeito da atividade de algumas enzimas, inclusive a colinesterase (Augenstein *et al.*, 1991; Suarez, Quintana e Hernandez, 2008), as alterações observadas em nosso estudo

não apresentam um mesmo padrão para os efeitos do F sobre essas varicosidades mioentéricas IR-ChAT, porém estas alterações neuroplásticas são um indicativo de que o F pode alterar a transmissão colinérgica, tanto após a exposição crônica quanto aguda.

A inervação colinérgica apresenta algumas particularidades, sendo interessante lembrar que alguns autores acreditam não ser possível desvincular os mecanismos extrínsecos, gerados pela ACh liberada a partir das fibras aferentes primárias extrínsecas; dos mecanismos intrínsecos, sendo estes os gerados pelos neurônios entéricos; no processo de contração da musculatura lisa do TGI (Li *et al.*, 2014). Portanto, não podemos afirmar que a transmissão colinérgica é totalmente comprometida pelo F, pois avaliamos em nosso estudo apenas as fibras intrínsecas.

Pelos nossos resultados, acreditamos que existe a possibilidade de que o F afete a contração da musculatura lisa, dado que a ACh é o principal neurotransmissor excitatório do SNE (Furness, 2000; Furness, J.B., 2006) e observamos alterações significativas na morfologia das varicosidades colinérgicas tanto após a exposição crônica quanto aguda. Um comprometimento na transmissão colinérgica entérica pode levar, por exemplo, ao desenvolvimento do quadro de constipação (Porter *et al.*, 1996), sendo este um dos sintomas reportados pela população de áreas endêmicas para a fluorose (Sharma, Sohu e Jain, 2009).

Sharrad *et al.* (2013) avaliaram a distribuição da inervação colinérgica no íleo em porcos da Guiné, observando a imunorreatividade de ChAT em corpos celulares e de VChAT em varicosidades, e especulou-se que por esta diferença nos marcadores colinérgicos pode ser um indicativo de uma mudança funcional cíclica, indicando que ora a neurotransmissão colinérgica é mais importante e ora outros neurotransmissores apresentarão uma atividade de destaque.

Alguns pesquisadores descrevem ainda que existe um número de axônios de neurônios colinérgicos, que normalmente não se envolve na neurotransmissão, mas que em determinadas condições podem ser ativados (Sharrad, Chen e Brookes, 2013). Estes neurônios podem contribuir com a manutenção da função gastrointestinal em patologias que levam à perda de neurônios colinérgicos, sendo que existem evidências de regiões em que a inervação colinérgica é eliminada no plexo mioentérico, mas no qual se observa, após algum tempo, a existência de potenciais de ação no local. Esta característica também confirma a neuroplasticidade colinérgica entérica.

Em nosso estudo, observamos que os segmentos intestinais são afetados de maneira diferente pelo F, o que pode ser um reflexo dessa mudança cíclica e também da

distribuição diferenciada das varicosidades colinérgicas em cada segmento, que ocorre de acordo com a necessidade funcional específica.

Juntamente com a ACh e o NO, outro neurotransmissor também participa do controle da motilidade intestinal, o VIP. No plexo mioentérico de porcos da Guiné, o VIP e o NO estão presentes em neurônios motores inibitórios e interneurônios descendentes (Furness, 2000). Em outras espécies também é descrito que existe a colocalização de NOS e VIP em subpopulações de neurônios inibitórios descendentes, no plexo mioentérico (Costa, Furness, *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 1994; Ekblad, Alm e Sundler, 1994; Furness, Young, *et al.*, 1995; Lefebvre, Smits e Timmermans, 1995; Wang *et al.*, 1998), inclusive na espécie humana (Porter *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, após a exposição crônica foi verificado, no duodeno, que os resultados estatisticamente significativos correspondem a um aumento no valor médio das áreas das varicosidades mioentéricas IR-VIP para os dois grupos (10 e 50 ppm F), em relação ao grupo controle. Para o jejuno e o íleo, o resultado estatisticamente significativo ocorreu na forma de um aumento dos valores das áreas apenas no grupo de 50 ppm F.

Na exposição aguda, não houve alteração estatisticamente significativa no grupo da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados com o grupo controle no duodeno. Já para o jejuno foi verificado um aumento estatisticamente significativo no valor das áreas das varicosidades, enquanto no íleo ocorreu uma diminuição significativa para o grupo da dose aguda em relação ao controle.

Pelos nossos resultados, com exceção do íleo da dose aguda, foi verificado de uma maneira geral, que o F causou um aumento no valor médio das áreas das varicosidades mioentéricas IR-VIP. Este aumento oferece indícios de que o F também pode comprometer a inervação VIPérgica do intestino delgado. Como para o controle inibitório da motilidade, os principais neurotransmissores envolvidos são o NO e o VIP (Benarroch, 2007), basicamente quaisquer alterações na inervação VIPérgica podem comprometer a motilidade intestinal.

Podemos sugerir ainda, neste caso, que este aumento pode significar uma suprarregulação na expressão do VIP, pois em processos como a axotomia, o bloqueio do transporte axonal ou alterações hipertróficas, é verificada uma suprarregulação do VIP em neurônios entéricos (Ekelund e Ekblad, 1999). Allescher *et al.* (1996), sugerem que o NO estimula a liberação do VIP por um mecanismo pré-sináptico ou pela ação em terminais nervosos e que estes mecanismos podem ocorrer facilmente em um mesmo terminal nervoso, uma vez que NO e VIP são colocalizados. Dessa forma, como observamos alterações

causadas pelo F na população nitrérgica, é possível que as alterações observadas nas varicosidades IR-VIP também sejam um reflexo dos efeitos do NO, e este seja um mecanismo possível para explicar o aumento na área das varicosidades IR-VIP em decorrência da diminuição observada nos neurônios nitrérgicos no duodeno.

O aumento da área das varicosidades pode significar ainda um processo neuroprotetor, uma vez que este peptídeo apresenta uma importante atividade antioxidante, assim como também estimula fatores de crescimento que podem regenerar neurônios entéricos (Hermes-Uliana *et al.*, 2014). Uma outra ação para o VIP foi descrita por Veit e Zanoni (2012), que observaram um aumento no tamanho das varicosidades IR-VIP, o qual acreditam estar relacionado a um aumento na síntese e liberação desse neuropeptídeo, e ainda sugerem que o aumento deve ser considerado positivo, uma vez que o VIP apresenta um papel neuroprotetor sobre os neurônios entéricos, pois age como um potente anti-inflamatório.

Por outro lado, o aumento na síntese de VIP pelos neurônios mioentéricos, pode conduzir a uma diminuição do tônus da musculatura lisa intestinal, o que poderia desencadear um quadro de diarreia, ou até mesmo aumentar a susceptibilidade à infecções intestinais pela diminuição do trânsito intestinal (Defani *et al.*, 2003). O aumento na expressão do RNAm do VIP também foi observado na hipertrofia induzida no íleo pela obstrução parcial do intestino de ratos (Ekblad *et al.*, 1998), assim como também foi verificado acompanhando mudanças adaptativas intestinais no caso do crescimento hipertrófico do intestino delgado de ratos (Lin, Sandgren e Ekblad, 2003).

É conhecido que o VIP não somente age como um neurotransmissor como também participa da neuroproteção, regulação do crescimento e atua como agente anti-inflamatório (Ekblad e Bauer, 2004). Junte-se a isto, o VIP é um dos mais importantes elementos envolvidos na neuroplasticidade entérica (Ekblad e Bauer, 2004). Pelas alterações morfológicas que observamos em nosso estudo, nas varicosidades vipérgicas, podemos sugerir que o F pode induzir importantes alterações neuroplásticas no TGI.

Embora o VIP apresente uma ampla rede de axônios varicosos no plexo mioentérico, a sua densidade ainda é menor do que a das fibras IR-SP, a qual se encontra amplamente distribuída neste plexo, em porcos da Guiné (Furness *et al.*, 1981a). Esta densa rede de axônios varicosos IR-SP é observada ao redor da maioria dos corpos celulares dos neurônios entéricos, tanto no plexo submucoso quanto no mioentérico (Costa *et al.*, 1981), existindo uma forte evidência de que a SP pode comprometer a motilidade intestinal, induzida por processos como inflamação, infecções, traumas e estresse (Holzer, 1998).

No TGI, embora existam fibras nervosas IR-SP provenientes das fibras extrínsecas, a maior parte das fibras nervosas IR-SP na parede intestinal se originam da inervação intrínseca, a partir de corpos celulares que se localizam nos plexos mioentérico e submucoso (Pernow, 1983). A SP apresenta-se como um neurotransmissor excitatório, porém com um papel secundário quando comparada à ACh (Moreira *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, ao avaliarmos as varicosidades mioentéricas IR-SP, verificamos no duodeno e no jejuno, um aumento estatisticamente significativo no valor médio das áreas para os grupos de 10 e 50 ppm F em relação ao grupo controle, sendo que houve um maior aumento no duodeno para o grupo de 50 ppm F. Para o íleo, também foi verificado um aumento estatisticamente significativo para os grupos de 10 e 50 ppm F, porém os valores entre os dois grupos não diferiram estatisticamente entre si.

Quanto à exposição à dose aguda, nos três segmentos analisados (duodeno, jejuno e íleo) foi verificado um aumento estatisticamente significativo no valor médio das áreas das varicosidades imunorreativas à SP nos animais do grupo que recebeu a dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados ao grupo controle.

O aumento da expressão da SP tem sido relacionado à inflamação em experimentos com um modelo de colite ulcerativa, dado que se verificou um aumento no número de neurônios IR-SP no plexo mioentérico e um aumento na densidade de fibras nervosas IR-SP nos dois plexos em decorrência dessa patologia (Godlewski e Kaleczyc, 2010). Esta plasticidade das fibras nervosas IR-SP em estados inflamatórios indica que alterações, como o aumento do número e da densidade das fibras IR-SP, progridem na fase ativa da doença, fato que confirma o papel da SP como um mediador do processo inflamatório, especialmente como um agente pró-inflamatório. Ao avaliar os efeitos desta mesma patologia em amostras provenientes de pacientes, Vento *et al.*, (2001) também observaram o aumento da expressão da SP na lâmina própria, relacionando esta elevação a um aumento do transporte pelo axônio e redistribuição da SP dentro do terminal axonal, ou à modulação de endopeptidases responsáveis por catalisar a clivagem para a eliminação da SP.

A relação entre a SP e processos inflamatórios também foi constatada no megacólon chagásico de pacientes, através de um aumento na quantidade de neurônios IR-SP, o qual foi relacionado a uma tentativa do organismo de eliminar o parasita através de um aumento na resposta inflamatória (Moreira *et al.*, 2013).

As paredes do TGI também contêm uma população residente de células inflamatórias que contribuem com os níveis mais simples da inflamação (Sharkey e Kroese,

2001). Em muitas patologias intestinais, a SP medeia a ativação das células da resposta imune e inflamatória, conduzindo a um aumento na produção e liberação de citocinas (Pernow, 1983), atuando no desenvolvimento e progressão da inflamação intestinal, produzindo esses efeitos ao se ligar aos receptores NK1 (Koon e Pothoulakis, 2006). O papel da SP na resposta inflamatória é considerado importante, e faz com que a maioria dos modelos animais de inflamação do TGI direcionem o seu foco para a sua avaliação, dado que a SP apresenta-se como um mediador da inflamação neurogênica (Sharkey e Kroese, 2001).

É interessante lembrar que no SNE os neuropeptídeos e neurotransmissores apresentam uma grande interação, e alterações observadas especificamente para um transmissor podem ser o reflexo da ativação de outros mecanismos envolvendo outros neurotransmissores. No íleo de porcos da Guiné, por exemplo, foi relatada a colocalização de receptores NK2 com a nNOS em 70% das varicosidades mioentéricas, fato que demonstrou que receptores NK2 pré-sinápticos são heteroreceptores ou terminais inibitórios, que carregam a nNOS. Embora a SP se ligue com alta afinidade ao receptor NK1, ela também interage com menor afinidade sobre os receptores NK2 e NK3 (Maggi *et al.*, 1993), sendo possível que alterações envolvendo a SP também desencadeiem uma resposta envolvendo o NO.

De uma maneira geral, após qualquer agressão ao TGI, a SP exacerba a inflamação, aumentando a produção de neutrófilos (Tanabe *et al.*, 1996), extravasamento de proteínas plasmáticas, produção de mastócitos e de fator de necrose tumoral (TNF- α) (Cocchiara *et al.*, 1999); combatendo a resposta hiperêmica causada pela agressão (Karmeli *et al.*, 1991).

Dessa forma, a avaliação do envolvimento da SP em processos patológicos se torna importante, dado que alterações na expressão da SP são observadas durante a inflamação crônica intestinal, sugerindo que os receptores para a SP podem ser alvos potenciais para a regulação terapêutica das respostas inflamatórias do TGI (Pernow, 1983), oferecendo alternativas de tratamento para inúmeras patologias.

Nossos dados nos oferecem indícios de que, pelas alterações morfológicas observadas, é possível que o F possa desencadear uma resposta inflamatória intestinal, especialmente na concentração de 50 ppm F, o que geraria um aumento na síntese de SP e aumento dos valores das áreas, provocando tanto os efeitos excitatórios sobre a musculatura lisa, quanto os seus pró-inflamatórios ativados pelo F. Portanto, existe uma possibilidade de que o F cause um processo inflamatório no TGI, especialmente na concentração de 50 ppm F,

dado que foram observados os maiores valores de área das varicosidades IR-SP para esta concentração.

Juntamente com a SP, outro importante neuropeptídeo pode ser ativado em processo inflamatórios, o CGRP, o qual é um dos mais potentes vasodilatadores endógenos conhecidos (Wimalawansa, 1996). Tanto a SP quanto o CGRP participam da inflamação neurogênica, porém com atividades distintas, sendo a SP pró-inflamatória e o CGRP anti-inflamatório (Holzer e Holzer-Petsche, 1997b). A imunorreatividade ao CGRP é verificada tanto no SNC quanto no SNP (Rosenfeld *et al.*, 1983), sendo que no intestino este peptídeo apresenta um efeito protetor sobre diferentes tipos de agressões, assim como também acelera a recuperação através do aumento do fluxo sanguíneo (Pawlik *et al.*, 2000).

O CGRP também apresenta um papel fundamental em várias das funções fisiológicas do SNE, participando do controle da musculatura lisa, ou seja, atuando na motilidade (Sadeghinezhad, Sorteni, *et al.*, 2013), sendo comprovada a existência de fibras IR-CGRP nas camadas da musculatura lisa do intestino de peixes a mamíferos, indicando o envolvimento do CGRP no controle destas fibras musculares do TGI dos vertebrados (Ohtani *et al.*, 1989). Em ratos, os neurônios IR-CGRP apresentam no plexo mioentérico projeções tanto para o próprio plexo quanto para a camada circular da musculatura lisa (Belai e Burnstock, 1987; Ekblad *et al.*, 1987), ressaltando, também neste modelo animal, a importância deste neuropeptídeo, especialmente no que diz respeito à motilidade intestinal.

Em nosso estudo, após a exposição crônica, foi verificado no duodeno, um aumento estatisticamente significativo no valor médio das áreas das varicosidades IR-CGRP para o grupo de 10 ppm F e uma diminuição para o grupo de 50 ppm F, em relação ao grupo controle. No jejuno não houve diferença significativa entre os valores dos grupos expostos quando comparados ao controle. Enquanto no íleo, ocorreu um aumento significativo tanto para a concentração de 10 ppm F quanto para a de 50 ppm F, quando comparadas ao grupo controle, sendo maior para a dose de 50 ppm F.

Quanto à exposição aguda, no duodeno e jejuno não houve alterações estatisticamente significativas nos grupos da dose aguda (25 mg F/kg) quando comparados com o grupo controle. Já para o íleo foi verificado uma diminuição no valor médio das áreas para o grupo da dose aguda em relação ao controle.

Quanto às fibras varicosas IR-CGRP do intestino humano, no plexo mioentérico são observadas áreas densamente innervadas (Timmermans *et al.*, 1992), ressaltando a importância da avaliação realizada em nosso estudo, pois este neuropeptídeo pode ser afetado

pelo F, dado que é um neurotransmissor abundantemente distribuído, e pode, portanto, comprometer a função intestinal. A sua ampla distribuição também foi confirmada por Timmermans *et al.* (1992), que demonstraram que no intestino humano as fibras IR-CGRP localizam-se tanto na periferia dos gânglios, quanto em distâncias consideráveis destes gânglios. Portanto, a própria distribuição das fibras IR-CGRP evidencia sua participação no controle da motilidade.

Em segmentos isolados do intestino delgado de porcos da Guiné, ao ser avaliado o efeito do CGRP sobre a camada circular da musculatura lisa, observou-se que o CGRP inicia as contrações fásicas na musculatura devido à estimulação de neurônios colinérgicos, assim como também inibe o peristaltismo por ativar neurônios entéricos inibitórios (Holzer *et al.*, 1989). Adicionalmente, o CGRP não inibe a via colinérgica, considerada a principal da contração entérica reflexa ascendente, portanto seu efeito sobre a ACh é apenas excitatório. O CGRP pode também contrair a musculatura lisa do intestino através da estimulação de outros neurônios entéricos, porém sua ação motora mais proeminente é o relaxamento muscular que surge a partir da sua ação direta sobre as fibras da camada longitudinal da musculatura lisa (Holzer *et al.*, 1989; Holzer, 1998).

Da mesma forma, a propriedade anti-inflamatória do CGRP também o torna um peptídeo importante, especialmente no intestino, onde inibe as ações dos mediadores inflamatórios, os quais geram edema intestinal como a histamina, leucotrienos, serotonina (Raud *et al.*, 1991).

Em animais em que foi produzida uma enteropatia causada por terapia com radiação, por exemplo, foi verificada por análise de reação em cadeia da polimerase (PCR), que havia um aumento nos níveis transcritos de SP e CGRP no tecido intestinal (Wang *et al.*, 2006). Os cortes histológicos revelaram danos à mucosa, ulcerações, espessamento da parede do intestino e presença de infiltrado inflamatório. Estas alterações foram associadas a uma significativa perda da área da superfície da mucosa, e aumento na proliferação de células da musculatura lisa e também aumento da deposição de colágeno na parede do intestino. Neste caso, devido à radiação, também foi observado que a aplicação de agonistas do CGRP atenuavam, enquanto os seus antagonistas (CGRP8-37) exacerbavam, os danos ao intestino.

A importância do CGRP não somente na motilidade intestinal, quanto na supressão da resposta inflamatória, nos faz crer que as alterações observadas em nosso estudo, especialmente pelo aumento na área das varicosidades, oferecem indícios de que, especialmente a concentração de 50 ppm F, poderia comprometer a motilidade intestinal

assim como desencadear uma resposta inflamatória no intestino delgado. Da mesma maneira, a diminuição no valor das áreas observada no íleo para a exposição aguda, sugere que a aplicação da dose aguda talvez não seja suficiente para comprometer a motilidade pela via que envolve o CGRP.

Como verificamos em nosso estudo que as doses de F causaram alterações morfológicas em diferentes tipos neuronais entéricos, os quais apresentam vários neurotransmissores envolvidos no peristaltismo, é possível que estas alterações afetem o funcionamento do TGI. Acreditamos ser possível que, especialmente no caso da concentração de 50 ppm F, exista um comprometimento da motilidade intestinal, em especial, do peristaltismo.

Também acreditamos que nossos resultados são bastante relevantes no que diz respeito ao funcionamento do SNE, pois mecanismos de degeneração das neuropatias entéricas são caracterizados basicamente por alterações, danos ou perda de neurônios entéricos, como observado em várias patologias importantes (De Giorgio *et al.*, 2004) e também em nosso estudo. Portanto, os efeitos do F, especialmente na concentração de 50 ppm F e na dose aguda (25 mg F/kg) podem causar importantes comprometimentos fisiológicos, como os verificados em outras patologias.

Estímulos danosos ao SNE podem resultar na disfunção de seus neurônios, e causar alterações em mecanismos como a secreção e a motilidade, conduzindo, por exemplo, a síndromes como a disfagia, doença do refluxo gastroesofágico, problemas no esvaziamento gástrico, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal (Wade e Cowen, 2004; Brierley e Linden, 2014). Dessa forma, a importante sintomatologia observada em decorrência da toxicidade do F também pode ser explicada pelas possíveis alterações que o F pode causar na inervação entérica.

Sharkey e Kroese (2001) também descrevem que em modelos animais de inflamação intestinal, alterações na morfologia intestinal podem ser decorrentes de mudanças estruturais e funcionais na inervação entérica. Portanto, é possível que as alterações na morfologia observadas em nosso estudo, sejam o reflexo de um processo inflamatório que o F desencadeia sobre o TGI, que pode influenciar a forma como os neurônios entéricos regulam a atividade de vários mecanismos no TGI.

Alguns trabalhos mostram que mediadores como as prostaglandinas, assim como vias nitrérgicas e colinérgicas podem estar envolvidos em alterações na motilidade observadas no intestino inflamado (Aube *et al.*, 1999). Em nosso estudo, também observamos alterações

morfométricas tanto nos neurônios nitrérgicos quanto nas varicosidades colinérgicas, na exposição aguda e crônica, sendo possível que a toxicidade do F conduza ao desenvolvimento de um processo inflamatório também pelas vias nitrérgicas e colinérgicas. Da mesma maneira, também verificamos alterações na morfologia das varicosidades IR-VIP, IR-SP e IR-CGRP, sendo estes três neurotransmissores envolvidos não somente no controle da motilidade (Rasmussen *et al.*, 2001a; Van Geldre e Lefebvre, 2004; Mitsui, 2011), como também no processo de inflamação intestinal (Raud *et al.*, 1991; Sharkey, 1992; Chandrasekharan, Nezami e Srinivasan, 2013).

Respostas inflamatórias locais no intestino podem influenciar uma diversidade de funções do SNE (Côté *et al.*, 2011), sendo citada até mesmo uma correlação entre a extensão da neuroplasticidade intestinal e a quantidade de infiltrado inflamatório presente ao redor dos gânglios mioentéricos, confirmando que o SNE pode passar por profundas alterações em decorrência da inflamação (Demir, I. E. *et al.*, 2013).

Todas estas alterações observadas em nosso estudo também caracterizam a própria neuroplasticidade entérica, que nada mais é do que a capacidade do SNE de se adaptar frente a qualquer alteração no seu microambiente (Oste *et al.*, 2005), sendo considerada a chave da manutenção intestinal durante o crescimento, maturação e envelhecimento; assim como em processos patológicos (Lin, Sandgren e Ekblad, 2004).

Dessa forma, a via pela qual o F gera a sintomatologia importante no TGI, decorrente da sua toxicidade, pode envolver neurônios entéricos, especialmente do plexo mioentérico, o que explicaria em parte os sintomas envolvendo a motilidade intestinal descritos por inúmeros autores como decorrentes da toxicidade do F.

Com o objetivo de oferecer outras informações a respeito das possíveis alterações na morfologia intestinal em decorrência da exposição ao F, realizamos também no presente estudo a avaliação do efeito da exposição crônica e aguda ao F sobre a parede do intestino delgado, analisando morfometricamente a sua espessura total e a espessura da sua túnica muscular, para que pudéssemos fazer associações com os resultados obtidos com a análise da inervação entérica, a qual foi realizada sobre o plexo mioentérico, assim como também com a análise proteômica do duodeno.

Em patologias importantes como a doença de Crohn, a qual normalmente envolve a parte direita do cólon e a porção terminal do íleo, é observado, por exemplo, um espessamento excêntrico ou assimétrico das paredes intestinais nestas regiões (Horton, Abrams e Fishman, 2000). Da mesma forma, no caso da tuberculose gastrointestinal, uma

patologia rara que envolve a região ileocecal, também é verificado um espessamento nesta área (Balthazar, Gordon e Hulnick, 1990). Espessamentos simétricos e circunferenciais do intestino são frequentemente atribuídos a condições inflamatórias, infecções, edema e isquemia; porém alguns tipos de câncer como adenocarcinomas também podem apresentar estas características de simetria e homogeneidade (Fernandes *et al.*, 2014).

Por alterações na morfologia da parede intestinal caracterizarem processos fisiopatológicos importantes neste órgão, em nosso estudo, realizamos a análise da espessura da parede intestinal, assim como da túnica muscular, com o objetivo de encontrar indícios relevantes a respeito da resposta do próprio intestino frente à exposição ao F.

No presente estudo, após a exposição crônica ao F, não foram observadas alterações significativas na espessura total da parede do duodeno, em nenhum dos grupos expostos (10 e 50 ppm F). Porém, na espessura da túnica muscular deste segmento, foi observado um aumento significativo no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. No jejuno, foram observados uma diminuição estatisticamente significativa na espessura total da parede intestinal no grupo que recebeu a concentração de 50 ppm F e um aumento estatisticamente significativo na espessura da túnica muscular também no grupo de 50 ppm F. No íleo, foi observado um aumento significativo na espessura total da sua parede nos grupos de 10 e 50 ppm F, sendo o aumento maior para o grupo de 10 ppm F. Quanto à espessura da túnica muscular do íleo, foi observado um aumento significativo nos grupos de 10 e 50 ppm F, sendo o maior aumento para o grupo de 10 ppm F.

Quanto à exposição aguda, observou-se no duodeno um aumento estatisticamente significativo no valor da espessura total da sua parede, e uma diminuição significativa na espessura da túnica muscular no grupo que recebeu a dose aguda em relação ao grupo controle. No jejuno e no íleo, tanto na espessura total, quanto na espessura da túnica muscular, no grupo que recebeu a dose aguda foi observada uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Como em nosso estudo, outros pesquisadores também utilizaram estas análises morfométricas da espessura da parede intestinal com inúmeras finalidades. Por exemplo, ao ser avaliada especificamente, a parede do íleo de ratos com o objetivo de verificar o efeito da desnutrição sobre a morfologia intestinal (Azevedo *et al.*, 2007), foi observada uma redução em mais de 50% da espessura da túnica muscular, sendo esta alteração considerada pelos autores como uma das possíveis explicações para o comprometimento da motilidade intestinal, descrita como uma consequência da desnutrição (Viteri e Schneider, 1974).

Em outro estudo avaliando o efeito do envelhecimento no duodeno de ratos, verificou-se que a espessura da túnica muscular não sofre alteração com esse processo (Marese, De Freitas e Natali, 2007). Porém, embora no estudo de Marese, De Freitas e Natali (2007) não tenham sido encontradas alterações significativas, estes autores comentam outro trabalho que descreve que mudanças no número e forma de corpos celulares de neurônios mioentéricos podem ser relacionadas a variações na espessura da túnica muscular, a qual é a responsável pela manutenção, desenvolvimento e plasticidade destes neurônios, dada a localização do plexo mioentérico entre as camadas da musculatura lisa (Gabella, 1987).

Esta conexão de informações descrita por Gabella (1987), é considerada bastante interessante e correlacionada ao presente estudo, pois alterações na densidade e na morfometria dos neurônios entéricos foram observadas nos 3 segmentos avaliados em decorrência das exposições crônica e aguda ao F, assim como alterações na espessura da túnica muscular dos 3 segmentos também foram verificadas. Adicionalmente, no duodeno, observamos ainda alterações na expressão de proteínas estruturais da musculatura lisa após a análise proteômica, o que ajudaria a explicar a correlação entre esses processos.

Ao ser avaliado o efeito da suplementação com creatina associada ao treinamento físico sobre a parede intestinal, foi observado que tanto a creatina quanto o treinamento físico separadamente, não promoviam alterações na espessura da túnica muscular, entretanto, uma redução na espessura foi observada quando ambos foram associados (De Moraes *et al.*, 2013). Neste estudo, De Moraes *et al.* (2013) também concordam que esta alteração na espessura da túnica muscular observada em seu trabalho é um reflexo dos efeitos associados da creatina aos treinamento físico, especialmente sobre as fibras da musculatura lisa. Da mesma maneira, acreditamos que o F pode comprometer a musculatura lisa, especialmente a sua estrutura proteica, dado que, no duodeno, duas proteínas importantes da composição desse tecido apresentaram alteração na sua expressão no grupo de 50 ppm F, sendo também neste segmento observado um aumento significativo na espessura da túnica muscular. As duas proteínas em questão, a *Myosin light chain* (P16409) e a *Calponin-1* (Q08290), apresentaram um aumento na sua expressão, o qual pode ser correlacionado ao aumento observado na espessura na túnica muscular verificado no duodeno. A *Myosin light chain*, participa intimamente da atividade contráctil da musculatura lisa intestinal (Chu *et al.*, 2013), enquanto a *Calponin-1* participa da regulação e modulação da contração da musculatura lisa, ao se ligar à proteínas como actina, calmodulina, troponina C e tropomiosina (UNIPROT).

A análise morfológica da parede intestinal também foi realizada em outro estudo com foco em um importante problema de saúde pública, a obesidade, no qual pesquisadores avaliaram os efeitos da dieta rica em gordura em ratos, submetendo os animais à uma dieta especial por 8 semanas (Soares *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi verificado um aumento na espessura da total da parede, assim como da túnica muscular, tanto no duodeno quanto no jejuno, enquanto no íleo foi observada uma diminuição em consequência da ingestão da dieta rica em gordura. Neste trabalho em que também foram observadas alterações morfológicas na população geral de neurônios e na população nitrérgica entérica, como descrito por outros pesquisadores anteriormente nesta discussão, os autores correlacionaram estas alterações neurológicas entéricas com os dados morfométricos da parede intestinal e da túnica muscular, e também citaram outros autores que concordam com esta correlação (Ekelund e Ekblad, 1999; Schäfer, Hänsen e Mestres, 1999), ressaltando que a fisiologia intestinal compreende muitos mecanismos interligados.

Também com o mesmo objetivo, analisar alterações histomorfométricas no intestino delgado, ratas em período gestacional foram avaliadas, sendo observado que durante a gestação, entre os dias 14 e 21, houve um aumento na espessura da túnica muscular no duodeno das ratas, o que os autores consideraram como uma tentativa do próprio organismo dos animais de aumentar a capacidade digestória do duodeno no período gestacional (Sabet Sarvestani, Rahmanifar e Tamadon, 2015). Os pesquisadores justificam esta hipótese pelo fato de que durante a gestação de ratas existe um aumento da ingestão de alimentos em mais de 50% (Cripps e Williams, 1975), e como o duodeno é responsável pela quebra enzimática do alimento no intestino, os autores acreditam que tais alterações são fundamentais para que sejam supridas tanto a digestão quanto o funcionamento intestinal, dado o volume extra de alimento no período gestacional.

Ressaltando a indicação clínica da utilização da análise da espessura da parede intestinal, em um estudo realizado em pacientes com fibrose cística, utilizando medidas obtidas com ultrassonografia, foi observado que estes indivíduos apresentavam um aumento na parede intestinal tanto no intestino delgado quanto no grosso, quando comparados com indivíduos saudáveis (controle) (Haber *et al.*, 1997). Entretanto, os pesquisadores notaram que nos indivíduos do grupo controle havia um aumento significativo na espessura da parede intestinal diretamente proporcional à idade. Os pesquisadores também comentam que no caso da fibrose cística, o aumento na espessura total da parede do intestino é devido a um aumento na espessura da submucosa, enquanto a mucosa e a túnica muscular não se alteram.

Pela relevância dos resultados descritos nestes estudos e das correlações estabelecidas por vários pesquisadores, acreditamos que nossos resultados à respeito da análise da espessura da parede intestinal e da túnica muscular também oferecem dados importantes à respeito da toxicidade do F, o qual acreditamos que pode comprometer estruturalmente a parede do intestino delgado, tanto após a exposição aguda quanto crônica através gerando alterações que podem refletir sobre os neurônios entéricos e sobre a fisiologia intestinal; e que podem ainda serem resultantes de alterações no perfil proteico intestinal.

Especialmente a análise da inervação entérica sugere que a exposição ao F induz à alterações plásticas no SNE, as quais podem representar uma tentativa do intestino de manter a sua homeostase e o funcionamento adequado frente a toxicidade do F.

Estas alterações neuroplásticas observadas através da análise morfológica da inervação entérica podem ser um reflexo de uma supra ou subregulação na expressão de neurotransmissores, ou até mesmo da indução de novos genes em neurônios entéricos (Pidsudko *et al.*, 2008). Desta forma, com o objetivo de melhor investigar estes achados da análise da inervação entérica, realizamos a análise proteômica de um dos segmentos intestinais, o duodeno, o qual foi escolhido devido às alterações observadas na análise morfológica da inervação entérica, após a exposição aguda e crônica ao F, e ao seu importante envolvimento na absorção do F no TGI.

É descrito na literatura que o F ingerido é absorvido especialmente através da mucosa gástrica e duodenal, e dessa forma entra no sistema circulatório (Dunipace *et al.*, 1995). Estudos avaliando a toxicidade crônica e aguda do F têm sido realizados em animais, assim como em seres humanos, nos quais os danos ao TGI são frequentemente descritos (Waldbott e Lee, 1978a; Susheela e Das, 1988; Sondhi, Gupta e Gupta, 1995; Shashi, 2002).

O intestino é o maior sítio de absorção do F (Nopakun, Messer e Voller, 1989), porém a concentração de F difusível é menor em algumas regiões intestinais do que no plasma, sendo provavelmente estas áreas o íleo e o cólon, devido à alta absorção nas regiões proximais do intestino e também à presença, nestas regiões distais do intestino, de cálcio e outros íons que não foram absorvidos em segmentos anteriores, os quais podem se ligar ao F, diminuindo a sua absorção nestes segmentos (Whitford, 1994). Outros trabalhos também descrevem a porção proximal do intestino como a maior responsável pela sua absorção neste órgão, sendo confirmado em ratos que, de toda a absorção intestinal, apenas 6% da dose inicial é absorvida pelos segmentos distais do jejuno, confirmando que a maior parte ocorre anteriormente a esta parte do intestino (Nopakun, Messer e Voller, 1989).

Messer e Ophaug (1991) também confirmam que a absorção do F depende de um rápido esvaziamento gástrico, ou seja, da sua passagem do estômago para o intestino delgado, sendo este considerado também por estes autores como o maior sítio de absorção do F em ratos, especialmente na parte proximal (Messer e Ophaug, 1991). Whitford (1994) também afirma que o F que não é absorvido no estômago, é absorvido nos segmentos iniciais do intestino delgado.

Outros estudos ainda relatam a sintomatologia importante do TGI em áreas endêmicas para a fluorose, em que são descritas as propriedades corrosivas, especialmente da forma não ionizada (HF), como causadoras de inflamação, ulceração, petéquias e outras anormalidades no intestino delgado, especialmente na sua porção proximal, onde se verifica um grande dano à mucosa, com perda das microvilosidades (Sharma, Sohu e Jain, 2009).

Todas estas evidências nos fazem crer que o duodeno é o segmento intestinal em que ocorre a maior parte da absorção do F. Junte-se a isto, em nosso estudo, observamos que o duodeno foi o segmento intestinal mais alterado na análise morfológica da população geral de neurônios. Dessa forma, escolhemos o duodeno como o segmento intestinal para a realização da análise proteômica, com o objetivo de fornecer todo o seu perfil, tanto após a exposição crônica, quanto aguda.

A MS é considerada o principal método para a análise da produção e função das proteínas nos sistemas biológicos, especialmente devido à habilidade em adquirir informações quantitativas de amostras biológicas de grande complexidade (Aebersold e Mann, 2003). No que diz respeito à toxicidade do F, a análise proteômica revelou alterações na expressão de proteínas nos rins de ratos submetidos à exposição crônica de F, nas concentrações de 5, 50 e 100 ppm F (Xu *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2009), bem como no fígado (Pereira, Leite, *et al.*, 2013).

O F é conhecido por atravessar as membranas celulares e penetrar nos tecidos moles, sendo demonstrado um prejuízo à função desses tecidos em animais intoxicados (Mullenix *et al.*, 1995). Também são observadas mudanças nos níveis de proteínas e neurotransmissores, assim como na atividade de algumas enzimas, no cérebro de camundongos em decorrência da ingestão de altas concentrações de F (Bhatnagar *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Chirumari e Reddy, 2007).

O intestino delgado é um órgão com uma grande variedade de funções, incluindo não apenas a absorção de nutrientes como também é responsável por uma resposta protetora contra os componentes tóxicos ou organismos patogênicos que são ingeridos (Iizumi *et al.*,

2007). Dadas as funções desempenhadas pelo intestino, ao oferecermos o seu perfil proteico, não somente identificamos as proteínas presentes como também o seu padrão de expressão, o qual pode ser supra ou subregulado, e podemos oferecer indícios importantes tanto de processos fisiológicos quanto patológicos, sendo no caso do presente estudo, o processo alvo a toxicidade do F.

Como um exemplo de estudo utilizando a MS para avaliação do intestino, podemos citar o trabalho que apresentou como objetivo analisar o efeito da alimentação parenteral em animais prematuros (Jiang *et al.*, 2008), no qual os autores justificaram a realização do estudo pelo fato da alimentação parenteral gerar em bebês prematuros o quadro de enterocolite necrozante. Neste trabalho foram observadas alterações no proteoma do jejuno que refletem um comprometimento funcional e fisiológico. A análise proteômica revelou a alteração na expressão de várias proteínas correlacionadas com a proteção fisiológica aos processos de hipóxia, estresse oxidativo, degradação protéica, morte celular, proliferação, maturação, transdução de sinais, geração de energia e metabolismo. Os autores afirmaram que todas estas proteínas apresentam uma importância funcional e patológica no desenvolvimento da enterocolite necrozante, e que a alimentação parenteral afeta o perfil proteico do intestino delgado prematuro de uma forma tecido-específica.

Ao oferecer a expressão proteica diferencial, a análise proteômica também permite estabelecer correlações importantes, como no caso do estudo realizado com amostras do intestino delgado humano com objetivo de identificar os efeitos da deficiência de cobre (Cu) e ferro (Fe). Neste trabalho foram observadas alterações significativas nos níveis de proteínas chaperonas; relacionadas ao metabolismo de glicose e ácidos graxos; plasticidade do citoesqueleto; e transporte de vitaminas (Tosco *et al.*, 2005). Os pesquisadores acreditam que seus achados apresentam novos indícios sobre o papel fisiológico dos dois elementos nas vias metabólicas, assim como também podem contribuir com a caracterização dos efeitos das deficiências destes metais, especialmente no caso de desordens nutricionais.

Em outro estudo, foi realizada a análise proteômica do intestino de ratos, após ser feita a oclusão seguida da reperfusão da artéria mesentérica superior, com o objetivo de analisar comparativamente e identificar as proteínas da mucosa intestinal, cuja expressão pode ser alterada por processo isquêmico (Liu *et al.*, 2010). Como resultado, foi observada a alteração significativa na expressão de 16 proteínas da mucosa intestinal, as quais estavam correlacionadas com processos como o metabolismo energético, anti-oxidação e anti-apoptose. Uma dessas proteínas, a aldose redutase, a qual remove as espécies reativas de

oxigênio, apresentou-se infrarregulada, a qual os autores acreditam que possa apresentar um papel importante na proteção contra os danos causados pela isquemia intestinal.

Ao ser analisada a expressão de proteínas envolvidas na absorção intestinal, verificou-se que hábitos alimentares também podem causar alterações na expressão proteica, sendo descrito que a expressão do transportador de glucose que tem alta afinidade por frutose (GLUT5), tem a sua expressão aumentada em 8 vezes após a ingestão por um determinado período de uma dieta enriquecida com frutose (Burant e Saxena, 1994).

Outros pesquisadores realizaram a análise proteômica do intestino delgado com o objetivo de identificar a expressão sítio-dependente de proteínas, e verificaram que as vitaminas lipo-solúveis, retinóides, são mais absorvidas no jejuno, e a sua atividade é acompanhada de uma alta expressão da proteína ligante do retinol celular neste segmento (Iiizumi *et al.*, 2007). Também foi observada pelos pesquisadores, uma alta expressão da proteína ligante do ácido biliar no íleo, o que se justifica pelo fato dos ácidos biliares excretados no duodeno serem absorvidos no íleo.

Neste trabalho de Iiizumi *et al.* (2007), das 180 proteínas identificadas, 8 apresentaram redução gradativa na expressão ao longo do intestino, partindo do duodeno em direção ao íleo, sendo 3 consideradas mais importantes. Dentre elas, a *Villin 2*, uma proteína caracterizada como um componente do citoesqueleto dos microvilos do intestino delgado, que age como um modulador da montagem da actina (Craig e Powell, 1980). Este achado foi considerado importante, pois se correlaciona com a diminuição gradual do número de vilos ao longo do intestino delgado, do duodeno em direção ao íleo. As outras duas proteínas, a *Glutathione S-transferase* é envolvida no metabolismo/detoxificação de xenobióticos (Kaminsky e Zhang, 2003); enquanto a *Catecol O-Metiltransferase*, ou simplesmente COMT, é uma das muitas enzimas que degradam catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina).

Iiizumi *et al.* (2007) observaram ainda que a proteína ligante do retinol celular II e a proteína ligante dos ácidos graxos intestinais foram expressas em maior abundância no jejuno. A proteína ligante do ácido biliar, também conhecida como gastrotropina foi observada somente no íleo. As proteínas nucleotidase bifosfato-5 e o canal aniônico dependente de voltagem foram principalmente expressas no duodeno; enquanto a proteína ligante dos ácidos graxos de fígado, foi mais expressa no jejuno; e a proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2, foi mais abundante no íleo. Por todos estes dados, os

autores comprovaram que existe uma diferença sítio-dependente na expressão de proteínas ao longo do intestino delgado.

A análise proteômica também já foi utilizada para esclarecer alguns aspectos da toxicidade do F, sendo considerado especialmente importante o seu efeito neurotóxico quando ingerido em excesso (Mullenix *et al.*, 1995), comprovado por uma sintomatologia variada, porém que destaca a diminuição da capacidade intelectual em crianças que vivem em áreas com altas concentrações de F na água (Trivedi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Ao ser avaliado o efeito do F e do chumbo no córtex de camundongos, utilizando a análise proteômica, por exemplo, foi observada uma diminuição na expressão de proteínas tubulinas, cuja função biológica está envolvida na formação do citoesqueleto, assim como também na diferenciação, migração e orientação do axônio (Niu *et al.*, 2008). Os pesquisadores acreditam que as alterações na expressão dessas proteínas devem estar relacionadas com a diminuição na capacidade de aprendizado, comumente relatada em crianças em consequência da ingestão de altas concentrações de F. Niu *et al.* (2008) descrevem ainda que com este estudo acredita-se ainda que a redução na expressão destas proteínas possa estar relacionada ao comportamento locomotor anormal observado em ratos e camundongos.

Em outro estudo avaliando o efeito do F sobre a expressão proteica, ao ser administrado NaF na água de beber (0,5 g/L) a animais em período gestacional e animais em período de lactação, foi observado uma redução na concentração de proteínas cerebelares e cerebrais de 27 e 17 % respectivamente (Trabelsi, Guerrazi e Zeghal, 2001).

No cérebro de ratos que receberam alta dose de F e baixa dose de Iodo, também foi realizada a análise proteômica, na qual foram identificadas alterações em proteínas especialmente relacionadas com a sinalização celular, metabolismo protéico e energético (Ge *et al.*, 2011), os quais os autores acreditam estarem envolvidos nos mecanismos da neurotoxicidade do F.

Portanto, é possível que a exposição à altas doses de F também possa causar uma alteração na expressão de proteínas no intestino, especialmente em áreas endêmicas para a fluorose, em que a exposição ocorre por longo período devido a sua ingestão.

Dentre todos estes estudos proteômicos descritos anteriormente ora avaliando os efeitos do F, ora analisando o intestino, o mais interessante e correlacionado com nosso trabalho foi o trabalho realizado com o objetivo de identificar o perfil protéico de preparações contendo o plexo mioentérico e a camada longitudinal da musculatura lisa, no jejuno, íleo e

cólon (Marvin-Guy *et al.*, 2005). Neste trabalho foi analisada a expressão diferencial das proteínas em cada segmento, e foram estabelecidas correlações com o plexo mioentérico e a fisiologia de cada segmento. Marvin-Guy *et al.* (2005) encontraram 5 proteínas diferentemente expressas entre os 3 segmentos analisados, sendo a maior diferença observada quando o intestino delgado foi comparado ao cólon. Houve 1 proteína identificada unicamente no íleo, a *Gastrotropin*.

Ainda no trabalho de Marvin-Guy *et al.* (2005), foram observadas no intestino delgado (jejuno e íleo) duas proteínas que não estavam presentes no cólon, a *leiomodina 1* e a *retinoic acid binding protein*. Outras duas proteínas foram encontradas somente no cólon, a *Translationally controlled tumor protein (TCTP)* e a *F-actin capping alpha subunit 2 protein*. A maioria das proteínas identificadas no estudo estava relacionada à musculatura lisa, dentre as quais foram abundantes nos três segmentos: *Actin*, considerada a proteína dominante; *Tropomyosin alpha* e *Tropomyosin beta*; *Myosin light chain polypeptide 6*; *Myosin regulatory light chain 2*, *Transgelin* e *Calponin H1*. Os autores relatam que embora as proteínas do plexo mioentérico foram mascaradas pela grande quantidade de proteínas da musculatura lisa, ainda foram observadas algumas proteínas neuronais, como as *14-3-3 proteins*, *Peripherin*, *Phosphatidyl-ethanolamine binding protein* e a *Latrophilin*.

Uma das proteínas encontradas somente no cólon por Marvin-Guy *et al.* (2005), a *translationally controlled tumor protein (TCTP)*, é envolvida no desenvolvimento do carcinoma do cólon, sendo a sua expressão associada à proliferação e à diferenciação da linhagem de células Caco-2 do câncer colorretal (Chung *et al.*, 2000). A *Phosphatidyl-ethanolamine binding protein*, também encontrada no estudo em todo o intestino delgado, é envolvida na função pré-sináptica de neurônios colinérgicos, sugerindo que pode apresentar o mesmo papel no SNE, no qual o principal neurotransmissor é a ACh, sendo descrita a imunoreatividade desta proteína no plexo mioentérico (Katada *et al.*, 2000). Os autores descrevem a presença das *Actins* e comentam que são os maiores constituintes do aparato contrátil, sendo que a *Actin beta* e a *Actin gama* estão presentes na maioria dos tipos celulares do citoesqueleto como mediadores da motilidade interna da célula (Mchugh e Lessard, 1988). Também no estudo de Marvin-Guy (2005) foi identificada a *Calponin H1*, uma proteína implicada na regulação e modulação da contração da musculatura lisa, sendo capaz de se ligar à actina, calmodulina, troponina C e tropomiosina (Nishida, Kitami e Hiwada, 1993).

Como um dos objetivos deste doutorado foi avaliar os efeitos do F sobre o SNE, também procuramos, dentro das proteínas identificadas por MS, observar as possíveis relações destas moléculas com mecanismos que envolvessem alterações neuronais, para que pudéssemos apresentar indícios do comportamento do F, especialmente da sua possível toxicidade sobre o SNE. Embora a maioria dos estudos disponíveis descreva dados envolvendo o SNC, apresentamos em nossa discussão, algumas informações que consideramos importantes, as quais acreditamos que possam sugerir ou até mesmo direcionar, os dados obtidos com a análise da inervação entérica que realizamos, e dessa forma, melhor integrar nossos resultados.

No presente estudo, o F alterou significativamente a expressão proteica no duodeno, dado que foi observado um grande número de proteínas com a expressão diferencial após a exposição aguda e crônica. A análise destas alterações na expressão proteica oferecida pela MS foi integrada através de *subnetworks* oferecidas pelo CYTOSCAPE®, das quais descrevemos a seguir, em detalhes, correlações, processos biológicos e importantes mecanismos envolvidos. Abaixo fazemos uma descrição das funções de algumas destas proteínas, o que acreditamos ser de suma importância para facilitar o entendimento dos mecanismos regulatórios desencadeados em resposta à exposição ao F. Também procuramos observar características destas proteínas que pudessem se relacionar com os resultados obtidos com a avaliação da inervação entérica, sendo que possíveis envolvimento destas proteínas com mecanismos neuronais também estão citados abaixo.

Na *subnetwork* obtida para a comparação do grupo de 10 ppm F vs. controle, a maioria das proteínas com alteração de expressão estavam subreguladas (Figura 4) e interagem com a *Pleiotrophin* (P63090). Dentre estas proteínas encontram-se *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (P97577), *Protein disulfide-isomerase* (P04785), *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (P63245), *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]-cytoplasmic* (O35077) e *Glutathione S-transferase P* (P04906).

A *Pleiotrophin*, também conhecida como fator neurotórico ligado à heparina, é expressa no desenvolvimento do SNC (Peng *et al.*, 1995). Tem sua expressão suprarregulada no coto distal do nervo lesado imediatamente após a transecção nervosa, sendo confirmado que esta proteína promove um aumento na regeneração de axônios periféricos do nervo isquiático, assim como também protege neurônios motores faciais da morte celular (Mi, Chen e Höke, 2007). Está envolvida em inúmeros processos dentro do desenvolvimento do sistema nervoso (Rauvala, 1989), como mitogênese e crescimento de neuritos (Li *et al.*, 1990);

diferenciação celular (Yang, S. *et al.*, 2013); proliferação celular (Hienola *et al.*, 2004); motilidade celular (Rauvala *et al.*, 2000); e especialização pós sináptica (Peng *et al.*, 1995). A *Pleiotrophin* promove o crescimento de neuritos a partir de diferentes tipos neuronais em cultura, incluindo neurônios em estágio embrionário e do córtex em período perinatal (Rauvala, 1989).

Por todas estas características consideradas a respeito dos efeitos da *Pleiotrophin*, foi realizado um estudo com o objetivo de caracterizar o fenótipo neurocomportamental e neuroanatômico de animais *knockout* para esta proteína (Krellman *et al.*, 2014). Neste estudo, observou-se que os animais apresentavam um comportamento anormal, caracterizado por uma tendência à repetição relacionada à rigidez cognitiva; elevada ansiedade; neofobia; assim como anormalidades anatômicas no córtex entorrinal incluindo a diminuição da área neuronal na camada IV e hiperdensidade neuronal nas camadas IV e V. Por todas estas alterações, os autores acreditam que a *Pleiotrophin* pode estar relacionada a importantes desordens neurológicas.

Em adição, a *Pleiotrophin* também está envolvida no desenvolvimento do sistema dopaminérgico nigroestriatal, promovendo a sobrevivência, diferenciação e crescimento de neurônios da porção ventral do mesencéfalo em *estudos in vitro* (Hida *et al.*, 2003; Marchionini *et al.*, 2007). Tem-se relatado que a suprarregulação da *Pleiotrophin* pode apresentar um efeito neuroprotetor sobre o sistema nigroestriatal lesionado, promovendo um aumento na densidade de neurônios específicos, garantindo uma restauração funcional; elevando a sua expressão para níveis próximos aos encontrados nos períodos de desenvolvimento (Gombash *et al.*, 2014).

Por ser uma proteína relacionada a processos importantes da homeostase neuronal, a subregulação de várias proteínas que interagem com a *Pleiotrophin*, observada no presente estudo, reveste-se de extrema importância. Dentre estas proteínas encontra-se a *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (P97577), a qual encontrou-se ausente no grupo de 10 ppm F. Esta proteína é classificada como um adaptador do transporte mediado por cinesinas, o que ressalta a sua importância na função neuronal, dado que a distribuição de proteínas dendríticas, axonais ou pré-sinápticas é dependente do transporte mediado pelas cinesinas (Alborghetti *et al.*, 2013). As cinesinas são consideradas proteínas “motoras”, transportando não somente moléculas como também organelas, através de um processo dependente do ATP e dos microtúbulos (Hirokawa e Takemura, 2005).

Como a morfologia neuronal apresenta basicamente a estrutura do corpo celular e de seus processos citoplasmáticos (axônios e dendritos), sendo estes distanciados variavelmente do núcleo; a maioria das proteínas produzidas no corpo celular necessita de um sistema de transporte para sua distribuição (Helfand *et al.*, 2003). Dentro deste contexto, as cinesinas se tornam fundamentais, pois se movem rapidamente pelo axoplasma, facilitando o transporte rápido de algumas moléculas (Prahlaad *et al.*, 1998). Dessa forma, como a *Fasciculation and elongation protein zeta 1* é uma molécula adaptadora das cinesinas, e portanto contribui grandemente com o desempenho destas proteínas, o seu papel também é relevante. Dentro do SNE, por exemplo, a cinesina KIF26A é descrita como uma proteína chave na via de sinalização do crescimento celular (Zhou *et al.*, 2009), pois regula a atividade do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), o qual controla vários aspectos do desenvolvimento do SNE, como a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação de neurônios entéricos (Heanue e Pachnis, 2007). Dessa forma, as cinesinas são importantes dentro do funcionamento do SNE, e, provavelmente, proteínas como a *Fasciculation and elongation protein zeta 1* também podem contribuir com as funções neuronais entéricas.

Outros pesquisadores descrevem que a *Fasciculation and elongation protein zeta 1* recruta elementos regulatórios e efetores não somente para o transporte como também para o processo de formação de vesículas (Alborghetti *et al.*, 2013); e dessa forma participa de mecanismos como o crescimento axonal (Gindhart *et al.*, 2003), e do processo autofágico (Mcknight *et al.*, 2012). Alborghetti *et al.* (2013) também confirmam que o transporte intracelular de proteínas é fundamental para os processos de diferenciação neuronal, expressão gênica e rearranjo do citoesqueleto. Estes pesquisadores comentam que o transporte intracelular de alguns receptores de membrana, por exemplo, a partir do núcleo em direção aos axônios, seria inviável apenas por um mero mecanismo de difusão pelo meio intracelular, já que o transporte destes receptores precisa ser realizado de forma rápida, confirmando a importância de proteínas envolvidas neste processo.

Com o objetivo de melhor compreender o papel da *Fasciculation and elongation protein zeta-1* no SNC, foi avaliada a sua expressão e localização endógena, em neurônios do hipocampo isolados de embriões de ratos, sendo observado que o RNA de interferência direcionado à *Fasciculation and elongation protein zeta-1* inibia a formação do axônio (Ikuta *et al.*, 2007). Dado que o RNA de interferência regula a expressão gênica, atuando sobre o RNAm, promovendo o silenciamento gênico pós-transcricional, com o objetivo de controlar a produção de proteínas (França, 2010), é compreensível a resposta obtida. Além disso, Ikuta *et*

al. (2007) também observaram que tanto o transporte mitocondrial quanto a morfologia neuronal são afetados pela repressão da *Fasciculation and elongation protein zeta-1*.

A presença de mitocôndrias em dendritos e axônios é essencial para a manutenção tanto das funções quanto da sobrevivência neuronal, as quais são transportadas com a ajuda das cinesinas ao longo dos microtúbulos, os quais funcionam como “trilhos” (Hollenbeck, 1996). Dessa forma, os autores (Ikuta *et al.*, 2007) concluíram que a *Fasciculation and elongation protein zeta-1* é essencial também para o estabelecimento da polaridade neuronal, pelo controle do transporte mitocondrial em neurônios do hipocampo. Portanto, acreditamos que como a proteína *fasciculation and elongation protein zeta-1* apresentou-se subregulada mediante a exposição à concentração de 10 ppm F, é possível que este processo possa afetar os neurônios entéricos, dado que os mesmos também apresentam o mecanismo de transporte por cinesinas (Helfand *et al.*, 2003), como no SNC.

Outra proteína observada na *subnetwork* com interação com a *Pleiotrophin*, que também encontrou-se subregulada no presente estudo, a *Protein disulfide-isomerase* (P04785), trata-se de uma proteína multifuncional que catalisa a formação, quebra e rearranjo de pontes dissulfeto. Na superfície celular age como uma redutase, promovendo a clivagem das pontes dissulfeto das proteínas ligadas à célula, e também pode causar modificações estruturais nestas proteínas. No meio intracelular, promove o rearranjo das pontes dissulfeto de novas proteínas. Em altas concentrações funciona como uma chaperona, inibindo a agregação de proteínas anormalmente configuradas, enquanto em baixas concentrações, facilita a agregação (atividade anti-chaperona) (UNIPROT).

Com o objetivo de investigar os mecanismos da sinalização de receptores de membrana de importantes neurotransmissores, como a serotonina, a noradrenalina e glutamato; um estudo foi desenvolvido com oócitos de *Xenopus*. Nestes oócitos, os quais são utilizados como modelo de expressão heteróloga de proteínas de membrana (Nomura, 2001). Neste estudo de Nomura (2001) foi injetado RNAm cerebral, com o objetivo de avaliar os mecanismos neuronais contra os efeitos da isquemia/hipóxia cerebral, e foi observado que a hipóxia resulta em uma alteração na expressão de chaperonas moleculares como a *Protein disulfide isomerase*. No caso, os autores verificaram a supraexpressão da *Protein disulfide isomerase* no hipocampo, a qual seria responsável por inibir significativamente a morte neuronal induzida pela hipóxia.

Em outro trabalho, é descrito também o papel da *Protein disulfide isomerase*, na patogênese da degeneração de fibras nervosas, em processos como a axonopatia, observada

em neurônios motores, em decorrência de doenças como a esclerose lateral amiotrófica (Tshala-Katumbay *et al.*, 2008). Estes autores descrevem que esta patologia pode ser induzida em modelos experimentais utilizando substâncias químicas neurotóxicas, que induzem aos mesmos padrões patológicos da axonopatia, como o acúmulo de neurofilamentos que deveriam ser transportados anterogradamente. Com o objetivo de verificar alterações proteômicas decorrentes da axonopatia, Tshala-Katumbay *et al.* (2008) utilizaram o 1,2 DAB (*gamma-diketone-like 1,2-diacetylbenzene*), uma substância neurotóxica, que causa o acúmulo de neurofilamentos em sítios proximais do axônio, e verificaram que o 1,2 DAB causou uma subregulação da *Protein disulfide isomerase*. Como esta proteína é envolvida no dobramento de proteínas, *ou seja*, é importante para a manutenção da estrutura tridimensional de proteínas, sendo este processo fundamental para inúmeras funções, como as enzimáticas; a sua subregulação certamente pode ter implicações significativas. Tshala-Katumbay *et al.* (2008) descrevem que esta subregulação pode ter comprometido, por exemplo, a expressão da *Gelsolin*, considerada uma importante proteína do citoesqueleto, a qual também apresentou sua expressão alterada no estudo, o que os autores acreditam que possa afetar a integridade do citoesqueleto, participando do acúmulo de neurofilamentos no axônio.

Tshala-Katumbay *et al.* (2008) também descrevem algumas características importantes da *Protein disulfide isomerase*, que podem estar envolvidas na patogênese da axonopatia, como a presença de vários sítios vulneráveis, os quais participam de pontes dissulfeto e da manutenção da sua estrutura tridimensional. Os pesquisadores ainda afirmam que, pelo importante papel da *Protein disulfide isomerase* na estabilidade estrutural de outras proteínas, alterações na sua expressão podem desencadear uma cascata de eventos nestas outras proteínas, possivelmente conduzindo à desorganização do citoesqueleto; ou ainda comprometendo o processo de dobramento de novas proteínas.

É conhecido o papel crítico da *Protein disulfide isomerase* para o dobramento adequado de proteínas, através das suas funções de oxidação e isomerização, que facilitam a formação de pontes dissulfeto e, consequentemente, a estabilidade e o rearranjo estruturais (Wu *et al.*, 2014). A suprarregulação da *Protein disulfide isomerase* apresenta um papel importante no rearranjo de proteínas desnaturadas por processos como o estresse oxidativo e nitrosativo, os quais causam um acúmulo de proteínas desnaturadas e imaturas (Hu *et al.*, 2000). Por esta característica, a *Protein disulfide isomerase* contribui com as respostas adaptativas ao estresse oxidativo, promovendo a resistência à morte neuronal (Wu *et al.*, 2014). Entretanto, quando os níveis de NO produzidos pelo estresse oxidativo são muito altos,

causam uma disfunção da *Protein disulfide isomerase*, através da sua S-nitrosilação, sendo este processo demonstrado no cérebro de pacientes com mal de Parkinson (Sliskovic, Raturi e Mutus, 2005). Esta S-nitrosilação da *Protein disulfide isomerase*, inibe as suas atividades de isomerização e chaperona, causando um acúmulo de proteínas desnaturadas e um atraso nas respostas dependente destas proteínas (Chen *et al.*, 2012). Dessa forma, em muitas desordens neurodegenerativas, a suprarregulação da *Protein disulfide isomerase*, promove um rearranjo das proteínas desnaturadas, que funciona como uma medida de proteção à estrutura neuronal (Tanaka, Uehara e Nomura, 2000; Conn *et al.*, 2004).

Utilizando todas estas informações, foi desenvolvido um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos das metanfetaminas sobre a *Protein disulfide isomerase*, dado que muitos indivíduos que as utilizam de forma abusiva desenvolvem doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson (Wu *et al.*, 2014). Neste estudo, foram avaliados animais *knockout* para a *Protein disulfide isomerase* e foi confirmado que esta proteína pode diminuir a neurodegeneração desencadeada pelas metanfetaminas, assim como a sua suprarregulação representa uma resposta adaptativa protetora a processos que conduzam a um aumento da concentração de proteínas desnaturadas. Os autores também confirmaram que um aumento na expressão tanto do NO quanto da NOS gera uma subregulação da *Protein disulfide isomerase*, conduzindo à neurodegeneração.

O papel desta proteína também foi descrito em outro sítio, diferente do sistema nervoso. Em outro estudo com o objetivo de investigar a patogênese da síndrome do intestino irritável, a expressão diferencial de proteínas foi avaliada e verificou-se que a *Protein disulfide isomerase* A3 (PDIA3) apresentava-se suprarregulada (Ding *et al.*, 2010) no cólon de ratos em que a patologia havia sido induzida, sendo esta expressão diferencial confirmada por *western blotting*.

Dado que em nosso estudo foi observada uma subexpressão da *Protein disulfide isomerase* no perfil proteico do duodeno, é possível que o F na concentração de 10 ppm F não apresente um potencial neurotóxico para o SNE, dado que não estimula um aumento da expressão desta proteína. Da mesma maneira, esta concentração pode não comprometer o SNE.

Outra proteína com a expressão subregulada em nossa análise e que interage com a *Pleiotrophin* é a *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (P63245), sendo também descrita com o nome de *Receptor of activated protein kinase C1*, o qual lhe confere a denominação de RACK1. Esta proteína realiza um grande número de interações com outras

moléculas, e por esta razão também apresenta inúmeras outras funções, assim como participa de várias redes de interação (Stirnimann *et al.*, 2010). Seu papel envolve funções como acoplamento, estruturação, estabilização, inibição e especialmente ligação de proteínas (Adams, Ron e Kiely, 2011). Devido a importância e a grande capacidade de interação desta proteína com outras moléculas, sua subregulação mediante exposição de 10 ppm F torna-se bastante importante.

O site do Uniprot oferece um grande leque de informações a respeito desta proteína, sendo descrito que a RACK1 além das características descritas anteriormente, ainda é um componente da subunidade ribossomal 40S, e apresenta-se também como uma estabilizadora da proteína kinase C (PKC) no estado ativado, aumentando a fosforilação mediada pela PKC (P63245). Neste processo pode recrutar a PKC ativada para o ribossomo, levando à fosforilação do fator de iniciação eucariótico 6 (EIF6), o qual controla o início da translação e da via da transdução, participando da biogênese dos ribossomos, sendo o EIF6 suprarregulado em tumores e confirmado que a sua subregulação diminui a taxa de crescimento tumoral (Pinzaglia *et al.*, 2015).

Embora a RACK1 tenha sido identificada inicialmente como uma proteína que permita a ligação da PKC, na verdade a RACK1 também se liga às integrinas e à tirosina quinase Src (um proto-oncogene); sendo a sua expressão alterada em vários tipos de câncer, como no adenocarcinoma (Nagashio *et al.*, 2010) e no câncer de mama (Seidl *et al.*, 2002); influenciando a migração e proliferação de tumores (Lu *et al.*, 2012). Ao verificar a influência da RACK1 no desenvolvimento de tumores malignos, pesquisadores avaliaram a sua expressão no hepatocarcinoma em animais *knockout*, e verificaram os efeitos da deleção da RACK1 em células da linhagem Hca-F, as quais foram utilizadas para a indução do tumor (Du *et al.*, 2014). Foram avaliados os processos de proliferação celular, migração e invasão destas células. Os pesquisadores verificaram que a proliferação foi significativamente reduzida, assim como a migração e a invasão. Também foi observado que a ausência da RACK1 inibiu significativamente o potencial metastático das células do hepatocarcinoma.

Além de todas estas funções, ainda é descrito que a RACK1 é um alvo intracelular de vírus (Gallina, Rossi e Milanesi, 2001) e bactérias (Thorslund *et al.*, 2011), na tentativa de controlar as células, e desenvolver os seus processos patológicos.

Outra proteína que interage com a *Pleiotrophin* e que se encontra ausente mediante exposição ao F é a *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]*, cytoplasmic (O35077), uma enzima envolvida no metabolismo de carboidratos; resposta celular ao AMPc

e ao fator de necrose tumoral; gliconeogênese; metabolismo do glicerol-3-P; oxidação do NADH; e regulação positiva do processo glicolítico (UNIPROT). A sua ausência mediante a exposição de 10 ppm F pode indicar um comprometimento da via glicolítica, uma vez que o F é também um clássico inibidor da enolase (Wang e Himoe, 1974).

As glutathionas S-transferases (GSTs) constituem uma família de isoenzimas citosólicas multifuncionais, envolvidas na desintoxicação metabólica de compostos xenobióticos, assim como no transporte de compostos lipofílicos, incluindo a bilirrubina e hormônios, como os glicocorticóides e tireoidianos (Ketterer, 1987). Ao ser analisada a presença das GSTs em diferentes regiões do cérebro de ratos, estas proteínas foram encontradas em células de Purkinje no córtex cerebelar, assim como em neurônios do tronco cerebral e do hipocampo; sendo que estas glutathionas eram observadas com expressão variável em diferentes regiões cerebrais (Johnson *et al.*, 1993). Os autores consideraram este achado muito importante, pois, o alto padrão de expressão de um determinado tipo de glutathiona em diferentes regiões do cerebelo, coincidiu com a menor susceptibilidade desta região à degeneração após danos causados por substâncias tóxicas ou metabólicas. Por estes dados, os autores confirmam que as glutathionas conferem proteção contra metabólitos neurotóxicos tanto exógenos quanto endógenos.

Por serem moléculas relacionadas com o controle do processo de degeneração, a relação das GSTs e o mal de Parkinson foi investigada (Shi *et al.*, 2009). Neste caso, foi avaliada uma glutathiona específica, a GST1, a qual foi identificada pelos pesquisadores através de análise proteômica, sendo a mesma encontrada com a expressão aumentada nas amostras obtidas a partir de tecido humano de pacientes com Parkinson. Shi *et al.* (2009) buscaram também analisar os níveis de GST1 na resposta da defesa celular à neurotoxicidade causada pelo progresso do mal de Parkinson, e se o aumento ou diminuição poderiam contribuir ou se correlacionavam à progressão do mal de Parkinson. Os autores observaram que os níveis aumentados da GST1 preservam os neuritos de neurônios expostos à rotenona, sendo esta a substância utilizada para a produção do modelo de mal de Parkinson, por induzir a degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos.

Neste estudo também foi avaliado o efeito da GST1 no estresse produzido pelo modelo de mal de Parkinson no retículo endoplasmático, sendo este um mecanismo de resposta ao acúmulo de proteínas desnaturadas no seu interior, pela ativação de vias de sinalização intracelular. Esta resposta do retículo endoplasmático está relacionada à diminuição de neuritos e à morte neuronal em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e o

próprio Parkinson (Lindholm, Wootz e Korhonen, 2006). Shi *et al.* (2009) observaram também que uma suprarregulação da GST1 reduzia o estresse oxidativo no retículo endoplasmático, por um mecanismo em que a GST1 funcionava como uma enzima catalítica que controlava a ativação de moléculas como a PERK (*phosphor-protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) e a CHOP (*mouse anti-C/EBP-homologous protein*), as quais participam da progressão do mal de Parkinson.

No presente estudo, a *Glutathione S-transferase P* (P04906) estava subregulada mediante a exposição à concentração de 10 ppm F. Chama a atenção o fato desta enzima encontrar-se no centro da rede de interação, interagindo com as demais proteínas subreguladas pelo F através da *Pleiotrophin*, da *RNA-binding protein PNO1* (Q6VBQ8) e da *Mitogen-activated protein kinase 14* (MAPK 14; P70618). A subregulação da *Glutathione S-transferase P* no presente estudo pode indicar uma dificuldade das células intestinais em reduzir o estresse oxidativo no retículo endoplasmático.

Ainda dentro da *subnetwork* produzida pelo CYTOSCAPE®, foi observada que a *Glutathione S-transferase P* se ligava a uma outra proteína de interação, identificada como *PNO1 RNA-binding protein* (Q6VBQ8), a qual funciona como um fator de neogênese ribossomal, presente em quase todos os organismos, de fungos à mamíferos; apresentando um domínio homólogo K, o qual permite a sua ligação ao RNA, sendo esta uma de suas importantes funções (Wang, X. *et al.*, 2012). A PNO1 está envolvida na biogênese de ribossomos e proteossomos, sendo confirmado o seu papel crítico na montagem e maturação ribossomal (Campbell e Karbstein, 2011), sendo que a ausência da proteína PNO1 resulta em um acúmulo de partículas de RNAr. A PNO1 também interage com a *Nin one binding protein* (NOB1), uma exonuclease (Zemp e Kutay, 2007), também envolvida no processo de maturação ribossomal.

Esta importante interação entre as proteínas PNO1 e NOB1 é especialmente importante no que diz respeito ao intestino, pois a PNO1 aumenta a afinidade do RNA da NOB1, assim como regula sua atividade durante processos específicos de clivagem, sendo a NOB1 diretamente relacionada ao aumento do tamanho do tumor no câncer gástrico, a qual tem sua expressão aumentada com o crescimento do tumor, apresentando um importante papel na incidência e desenvolvimento deste tipo de câncer (Zhou *et al.*, 2015). Da mesma forma é observado que uma subexpressão da NOB1 conduz a um melhor prognóstico no caso do câncer colorretal (Wu *et al.*, 2015), assim como a NOB1 pode agir com um importante

regulador no crescimento tumoral do câncer de pulmão de células não-pequenas (Huang *et al.*, 2015).

Dado que a função da PNO1 havia sido amplamente descrita para leveduras e pouco descrita em mamíferos, foi realizado um grande estudo com o objetivo de avaliar a sua expressão em diversos órgãos de camundongos (Wang, X. *et al.*, 2012). Neste estudo os autores caracterizaram a PNO1 como uma proteína que apresenta um importante papel regulatório, no qual uma pequena alteração na sua expressão pode alavancar ou amplificar reações biológicas em nível molecular. No primeiro dia pós-natal, a PNO1 apresentou-se claramente presente no SNP e TGI, tanto no estômago quanto no intestino. Ao ser avaliada a sua expressão no décimo dia pós-natal, observou-se que esta proteína é altamente expressa em várias regiões do cérebro como no hipocampo e no lobo e neuroepitélio olfatórios.

Wang *et al.* (2012) descrevem que o padrão geral da PNO1 ofereceu um forte indício de que esta proteína é altamente expressa em tecidos que apresentam células de rápida proliferação como o intestino, sendo este resultado bastante compatível com o encontrado em leveduras, em que é descrito que a sua principal função é a neogênese ribossomal e proteossomal, relacionadas com altas taxas de síntese proteica (Wang, X. *et al.*, 2012). Entretanto, a PNO1 também apresentou uma alta expressão em tecidos com baixo potencial proliferativo como nos gânglios da raiz dorsal, gânglios simpáticos, lobo olfatório, neuroepitélio olfatório. Por esta característica, Wang *et al.* (2012) acreditam que sua função vá além da síntese proteica. Neste estudo de Wang *et al.* (2012) foram também testadas alterações na expressão da PNO1, e verificou-se que ao diminuir a sua expressão em 15% utilizando um RNA de interferência a função proliferativa com a atividade proteossômica não apresentava nenhuma alteração. Entretanto, a ausência total desta proteína foi considerada desastrosa, pois comprometeu o desenvolvimento embrionário, sendo por esta razão considerada fundamental para o desenvolvimento embrionário; ou pelo fato de que as células embrionárias dependam de concentrações até mesmo baixas da PNO1 para que ocorra a divisão celular. Quanto à supraexpressões, não foram observadas alterações significativas.

No presente estudo, a PNO1 apresentou interação com uma das proteínas descritas como ausente no grupo exposto à concentração de 10 ppm F, a *Coronin-1A* (Q91ZN1). Este dado é consistente com um acúmulo de isoformas de actinas citoplasmáticas (*Actin, cytoplasmic 1* e *Actin cytoplasmic 2*) (Anexo 34), o que pode comprometer a organização e o transporte intracelular, uma vez que várias isoformas de proteínas RAB, além da

Fasciculation and elongation protein zeta 1, também relacionadas com estes eventos, estão subreguladas ou ausentes (Figura 4).

A *Coronin-1A* foi inicialmente identificada na espécie amebóide denominada *Dictyostelium discoideum*, como a sua principal proteína associada à membrana, envolvida na regulação de múltiplas funções celulares mediadas pela actina, incluindo a migração celular, citocinese e crescimento celular (De Hostos, 1999). A *Coronin-1A* é um componente crucial do citoesqueleto de células com alta motilidade, funcionando tanto na invaginação de partes da membrana plasmática, quanto formando protrusões na membrana plasmática para facilitar a locomoção celular (UNIPROT).

As proteínas *Coronin* (coroninas) são encontradas nas espécies eucariontes e pertencem à família das proteínas WD (Stirnimann *et al.*, 2010), constituindo um grupo de 700 diferentes coroninas (Eckert, Hammesfahr e Kollmar, 2011), das quais 7 são expressas em mamíferos. A *Coronin-1A*, dentre todas as coroninas, é a mais característica em mamíferos, sendo predominantemente expressa em células hematopoiéticas, onde é co-expressa com as coroninas 2, 3 e 7 (Rybakin *et al.*, 2004).

A *Coronin-1A* é colocalizada com a formas filamentosas da actina (F-actina), próxima à vesículas fagocíticas em neutrófilos e macrófagos, assim como em membranas ricas em actina F em células T (Ferrari *et al.*, 1999). Em camundongos *knockout* para a *Coronin-1A* é verificada uma diminuição no número de células T periféricas devido à morte celular ou apoptose, o que acredita-se ser devido a um acúmulo excessivo de actina F (Föger *et al.*, 2006). Em macrófagos e linfócitos, a *Coronin-1A* se acumula em sítios promotores do rearranjo do citoesqueleto de actina (Rybakin e Clemen, 2005). Acredita-se ainda, que a *Coronin-1A* também está envolvida em processos como a fagocitose (Ferrari *et al.*, 1999), ativação de células T (Nal *et al.*, 2004), integração de sinais extracelulares ao citoesqueleto de actina em leucócitos (Gatfield *et al.*, 2005), rearranjo do citoesqueleto de actina durante atividades imuno-específicas (Oku *et al.*, 2005).

A *Cononin-1A* também foi identificada na membrana plasmática e no citoplasma da micróglia (Ahmed *et al.*, 2007), sendo este achado similar ao descrito em macrófagos e linfócitos (Gatfield *et al.*, 2005), oferecendo uma importante evidência de que a *Coronin-1A* se liga tanto à membrana celular quanto à membrana do citoesqueleto de actina, por dois diferentes domínios. Com este trabalho, Ahmed *et al.* (2007) afirmaram que o fato da *Coronin-1A* participar do rearranjo da membrana do citoesqueleto oferece um indício de que a mesma deva apresentar um papel crítico na manutenção estrutural da micróglia; e os autores

ainda classificaram a *Coronin-1A* como um novo e efetivo marcador imunohistoquímico para a micróglia, tanto em ensaio *in vitro* quanto em material fixado com formaldeído.

Este papel estrutural das coroninas é conhecido, especialmente porque as mesmas são proteínas reguladoras da actina, ligando-se especialmente às formas filamentosas da actina (actinas F), assim como também pela sua associação ao complexo proteico Arp2/3 (Humphries *et al.*, 2002), formado por duas proteínas ARPs (Arp2 e Arp3), as quais promovem a nucleação dos filamentos de actina pela paralisação deste complexo nas suas conformações inativas (Shiow *et al.*, 2008). A interação entre a *Coronin-1A* e o complexo Arp2/3 é regulada pela fosforilação da *Coronin-1A*, sendo que este processo pode ocorrer a qualquer momento durante a diferenciação neuronal, tornando a sua fosforilação de grande importância, pois alterações neste mecanismo podem comprometer a diferenciação (Terzi, Kocafe e Ayter, 2014)

Quanto às outras relações da *Coronin-1A* com o sistema nervoso, é descrito também que a expressão da *Coronin-1A* é suprarregulada em ratos após uma lesão na medula espinal (De Biase *et al.*, 2005), assim como uma diminuição na expressão dessa proteína pode causar déficits cognitivos e neurocomportamentais em camundongos (Jayachandran *et al.*, 2014).

Os efeitos da *Coronin-1A* também foram investigados no processo de crescimento de neuritos, utilizando células PC12, um modelo conhecido de célula neuronal (Terzi, Kocafe e Ayter, 2014). Neste trabalho, confirmou-se a presença da *Coronin-1A* no citoesqueleto, com uma grande intensidade na sua marcação em neuritos em crescimento. Verificou-se ainda que a localização da *Coronin-1A* era diferente da localização dos microtúbulos nos neuritos, evidenciando que a *Coronin-1A* apresenta um padrão de distribuição similar ao citoesqueleto de actina, porém diferente dos microtúbulos. Também foi observada a marcação da *Coronin-1A* em todas as células PC12, confirmando a presença desta proteína em toda a população neuronal.

No módulo avaliado, a *Glutathione S-transferase P* também se apresentou ligada a outra proteína de interação, a *Mitogen-activated protein kinase 14* (P70618), pertencente à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), as quais apresentam como função a modulação da ligação entre os sinais extracelulares e a maquinaria que controla processos fundamentais celulares, como o crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Dhillon *et al.*, 2007).

A MAPK14 é uma das quatro p38 MAPKs, que apresenta um papel importante nas cascatas das respostas celulares desencadeadas por estímulos extracelulares como as citocinas pró-inflamatórias, ou estresse físico, conduzindo à ativação direta de fatores de transcrição. A habilidade das P38 MAPK para induzir apoptose em resposta à detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem um importante papel na iniciação do tumor (UNIPROT). Esta atividade provavelmente é relevante para o câncer humano, uma vez que a tumorigenicidade das linhagens de câncer celular se correlaciona com níveis aumentados de proteínas *Glutathione S-transferase*, as quais especificamente dessensibilizam a ativação do P38 a partir da acumulação de EROs, sendo sugerido que a restauração da ativação da p38 MPK, por exemplo, por meio das proteínas, pode ter um papel terapêutico contra o câncer (Dolado *et al.*, 2007). A *Glutathione S-transferase* foi identificada com alta atividade na porção proximal do intestino delgado, a qual é envolvida no metabolismo/detoxificação de xenobióticos (Kaminsky e Zhang, 2003). Entretanto, no presente estudo sua expressão se encontrou subregulada no grupo exposto à concentração de 10 ppm F em relação ao controle.

A MAPK14 também interage com a proteína *Kinase casein II*, conduzindo a sua ativação através da autofosforilação, assim como também à fosforilação do gene TP53/p53, que codifica uma proteína supressora de tumor, a qual responde ao estresse celular regulando a expressão de genes que induzem a apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo; sendo que mutações neste gene são associadas com uma variedade de tumores (Pubmed-Tp53, 2015).

A tumorigênese necessita da desregulação de pelos menos 6 processos, nos quais as células cancerígenas devem apresentar independência na proliferação de sinais como evasão do processo de apoptose, desensibilidade a sinais anti-crescimento, potencial replicativo ilimitado, habilidade de invadir, metastizar, ligar e sustentar a angiogênese para sua manutenção (Hanahan e Weinberg, 2000). Anormalidades na via de sinalização pelas MAPKs conduzem à maioria desses processos, evidenciando o papel crítico destas proteínas na progressão do câncer (Dhillon *et al.*, 2007). A MAPK14 também fosforila a ligase SIAH2, regulando a atividade desta proteína, a qual regula a degradação dependente da ubiquitinação de múltiplos substratos, assim como apresenta um papel chave no controle do crescimento, sobrevivência e capacidade tumorigênica de células cancerígenas como as que promovem o câncer de próstata (Qi *et al.*, 2013).

A via da degradação lisossomal da autofagia é inibida pela MAPK14, pois esta proteína interfere com o tráfego intracelular da proteína transmembrana ATG9 (P70618). A

autofagia é um processo catabólico essencial para a homeostase celular, na qual ocorre a formação de organelas de dupla membrana chamadas autofagossomos. A ATG é a única proteína transmembrana utilizada para a autofagia, sendo responsável por entregar a membrana às estruturas do pré-autofagossomo e dos autofagossomos (Orsi *et al.*, 2012). A endocitose de receptores de membrana também é regulada pela MAPK14, por diferentes mecanismos envolvendo a GTPase RAB5A. A Rab5 é um dos reguladores do tráfego endocítico e como as outras GTPases oscila entre ciclos ora ligada ao GTP, e ora ao GDP, assim como à membrana e ao citosol. O ciclo ligado ao GDP é controlado por um inibidor da dissociação da guanina (GDI), que funciona como um veículo para a Rab5 no citosol; sendo que este complexo Rab5-GDI é levado até o alvo da membrana, onde a Rab5 é recarregada. A formação do complexo Rab5-GDI é estimulada pela MAPK14 (Felberbaum-Corti, Cavalli e Gruenberg, 2005). No presente estudo, duas isoformas de RAB5, *Rab5b* (A1L1J8) e a *Rab5c* (B0BNK1), estavam ausentes no grupo exposto à concentração de 10 ppm F, indicando perturbação nestas vias (Figura 4).

O processo de internalização dos receptores do fator de crescimento epidermal é controlado pela MAPK14, sendo esta considerada uma importante função, dado que receptores sinalizam vários mecanismos, e desta forma controlam várias funções celulares (Sigismund *et al.*, 2008). A endocitose é o principal mecanismo utilizado por estes receptores para a atenuação de sinais, e ainda permite a remoção destes receptores da superfície celular. Portanto, a inibição desta internalização altera a sinalização de inúmeros mecanismos. O fator de crescimento epidermal é um dos mais importantes destes receptores das tirosinas quinase, sendo que sua remoção da superfície celular ocorre por endocitose, através de uma via mediada pela proteína clatrina, a qual decide se o receptor é reciclado ou degradado (Sigismund *et al.*, 2008). Em resposta a estímulos inflamatórios, a MAPK14 fosforila a metaloprotease ADAM17, e esta fosforilação resulta na ativação da sinalização e proliferação de receptores do fator de crescimento epidermal.

A MAPK14 também é responsável por translocar o receptor do fator de crescimento de fibroblastos do espaço extracelular para o citosol e núcleo, o qual regula a síntese de RNAr e o crescimento celular. No núcleo, muitos fatores de transcrição são fosforilados e ativados pela MAPK14 em resposta a diferentes estímulos, regulando modificadores e remodeladores da cromatina, sendo por esta razão considerada como um importante modulador da expressão gênica. Neste processo, os ativadores de vários genes envolvidos na resposta inflamatória, como a interleucina 6, 8 e 12, promovem a fosforilação

da histona H3 por uma via dependente das MAPK14, sendo este um processo que aumenta a acessibilidade do NF-KB sítios de ligação, o qual é considerado importante, pois a ativação de NF-KB participa da transdução intracelular de sinais e da produção de citocinas e quimiocinas (Sakai *et al.*, 2002).

Além destas características, a MAPK14 também está envolvida nos efeitos do diabetes. A modificação em proteínas causada pela O-GlcNAcilação é uma das características patogênicas do diabetes. Este processo é regulado por duas enzimas que catalisam esta reação: a β -N- acetilglucosaminidase, que catalisa a redução produzida pela O-GlcNAcilação; e a O-GlcNAc transferase (OGT), a qual induz à O-GlcAcilação (Makino *et al.*, 2015). A catalisação pela OGT é regulada pela MAPK14, e embora a OGT não pareça ser fosforilada pela MAPK14, a interação das proteínas aumenta a ativação da MAPK14 na ausência de glicose, assim como também regula a atividade da OGT, recrutando sítios específicos, estimulando a O-GlcNAcilação (UNIPROT).

Outra proteína que interagiu com a MAPK14 e que se encontrava ausente no grupo exposto à concentração de 10 ppm F foi a *Lymphocyte cytosolic protein 1* (LCP1; Q5XI38). A LCP1 é altamente expressa em linfócitos T CD8+ e em macrófagos CD68+, e está especialmente envolvida na migração celular (Delanote, Vandekerckhove e Gettemans, 2005); assim como sua expressão apresenta-se aumentada em patologias como a leucemia linfocítica crônica (Perrot *et al.*, 2011), uma patologia incurável. A LCP1 apresenta um papel crítico na biologia das células B, pela ligação cruzada a filamentos de actina F, organizando e estruturando o citoesqueleto, fornecendo um arcabouço para várias vias de sinalização (Dubovsky *et al.*, 2013).

A sinalização oncogênica a partir de interações multicelulares dentro de um ambiente especializado direciona a proliferação de clones leucêmicos quiescentes, os quais são células anômalas da medula óssea com potencial proliferativo, que podem se expandir e infiltrar, dando origem ao tumor (Burger, 2011). Estas importantes interações multicelulares ocorrem a partir de receptores, ligantes e outras proteínas associadas à membrana, os quais iniciam uma sinalização intracelular, que permite a formação de um microambiente propício para a proliferação e sobrevivência das células tumorais (Dubovsky *et al.*, 2013).

Estas interações são importantes, pois a ligação de quimiocinas ao receptor resulta na fosforilação da LCP1, induzindo ao movimento do citoesqueleto de actina em direção ao pólo anterior das células T, conduzindo à ativação da polarização celular e à migração dos linfócitos T estimulados pelas citocinas (Delanote, Vandekerckhove e Gettemans, 2005;

Freeley *et al.*, 2012). A expressão da LCP1 está normalmente limitada às células linfóides, entretanto apresenta-se ectopicamente expressa em tumores malignos, sugerindo que a sua expressão é aumentada acompanhando a tumorigênese (Lin *et al.*, 1993).

No trabalho de Dubovsky *et al.* (2013), os autores identificaram que a LCP1 apresentava imunorreatividade para a imunoglobulina G, sendo exportada dentro de exossomos a partir das células tumorais da leucemia linfocítica crônica. O *knockout* da LCP1 compromete a migração das células tumorais da leucemia linfocítica crônica em direção ao microambiente da quimiocina CXCL12. A CXCL12 pertence à subfamília das quimiocinas que apresentam um *motif* específico Cisteína-X-cisteína; e trabalha em conjunto com o receptor acoplado à proteína G, o CXCR4, regulando o tráfego, migração transendotelial, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas (Wang, Y. *et al.*, 2012).

Tanto a CXCL12 quanto o CXCR4 são expressos constitutivamente tanto no SNC em desenvolvimento quanto maduro, no qual o RNAm do CXCR4 é expresso em neurônios do córtex e hipocampo, assim como em células endoteliais; enquanto a CXCL12 também é expressa no SNC adulto, porém apresenta uma baixa expressão normalmente; sendo descrito que a expressão do CXCR4 é regulada pela CXCL12 (Wang, Y. *et al.*, 2012).

Dubovsky *et al.* (2013) descrevem que a LCP1 é fundamental para a migração de linfócitos e de alguns tumores, e também se encontra envolvida na migração responsiva à CXCL12 de células tumorais. O *knockout* da LCP1 compromete a migração das células tumorais da leucemia linfocítica crônica em direção ao microambiente da quimiocina CXCL12; sendo que de uma maneira geral, o *knockout* desta proteína causa um prejuízo ao desenvolvimento das células B e das respostas imunes (Chen, H. *et al.*, 2003), sendo a sua função imunológica, considerada a mais descrita (Harrison *et al.*, 2015). Os autores também demonstraram que terapias direcionadas aos receptores de linfócitos B podem desativar a LCP1, bloqueando o seu comportamento migratório.

A LCP1 apresenta ainda algumas outras classificações alternativas, sendo também descrita como *L-plastin*, *Plastin 2* e *Lymphocyte cytosol polypeptide*. As plastinas são um grupo de integrinas, sendo conhecido que anormalidades na expressão destas proteínas geram uma desorganização da morfologia do citoesqueleto de actina, assim como inibem a endocitose (Adams *et al.*, 1995). As plastinas apresentam dois domínios para a ligação da actina, apresentando-se em 3 isoformas: A *Plastin 1* é expressa nos epitélios renal e do intestino; a *Plastin 2*, a qual foi identificada em nosso estudo, é expressa apenas em leucócitos; enquanto a *Plastin 3* está amplamente distribuída (Lin *et al.*, 1994).

As integrinas leucocitárias são proteínas que apresentam um papel fundamental na migração destas células para sítios de infecção ou inflamação, sendo que ao promover o *knockout* das plastinas, a função das integrinas é comprometida, ocorrendo um bloqueio entre a adesão e a transdução de sinal intracelular (Chen, H. *et al.*, 2003).

Rearranjos do citoesqueleto de actina em consequência da ligação de integrinas são necessários para a adesão e “spreading” celular; assim como para a propagação da transdução de sinais das integrinas (Yamada e Miyamoto, 1995). É descrito que o citoesqueleto cortical funciona como uma estrutura para a montagem de vias de sinalização nas proximidades das integrinas (Goldmann, 2002). O rearranjo do citoesqueleto também é um mecanismo necessário para tornar os leucócitos aptos à adesão mediada pelas integrinas (Shimizu, Rose e Ginsberg, 1999), sendo difícil de distinguir quando o citoesqueleto está se rearranjando para ativar os leucócitos, e quando está agindo em função de uma cascata de sinalização. No presente estudo, a LCP1 estava ausente no grupo exposto à concentração de 10 ppm F em relação ao controle, sugerindo uma possível perturbação nestes eventos celulares. De um modo geral, observamos várias proteínas relacionadas ao rearranjo do citoesqueleto foram subreguladas mediante exposição a esta concentração de F.

Outra interessante rede de interação encontrada no presente estudo para a comparação entre o grupo controle e o exposto à concentração de 10 ppm F foi aquela relacionada às proteínas que interagem com a *Rab GDP dissociation alpha* (Rab GDI alpha; P50398). Estas proteínas pertencem a superfamília das Ras GTPases, sendo que duas delas se encontravam subreguladas mediante exposição à concentração de 10 ppm F [*Ras-related protein Rab-1A* (RAB1A; Q6NYB7), *Ras-related protein Rab-8B* (RAB8B; P70550)], enquanto que as outras duas estavam ausentes no grupo exposto à concentração de 10 ppm F [*Protein Rab5b* (A1L1J8) e *Protein Rab5c* (B0BNK1)].

A proteína presente no centro desta interação (*Rab GDI alpha*) regula a reação de troca GDP/GTP da maioria das proteínas RAB por inibir a dissociação do GDP a partir delas e a subsequente ligação do GTP a elas. Ainda promove a dissociação das proteínas Rab ligadas ao GDP da membrana e inibe a sua ativação, sendo que dentre estas RABs que dissocia estão a RAB1A, RAB3A, RAB5A e RAB10 (UNIPROT).

No presente estudo, a exposição a 10 ppm F reduziu a expressão de dois membros da família da *Ras-related protein Rab*, a RAB1A e a RAB8B. Em adição, outros 2 membros (RAB5B e RAB5C) também não foram detectadas no grupo exposto a 10 ppm F, tendo sido exclusivas do grupo controle.

As RABs são pequenas proteínas de ligação ao GTP da superfamília das Ras GTPases, que regulam o tráfico intracelular de vesículas entre compartimentos fechados por membranas em células eucarióticas (Stenmark, 2009). Muitas das mais de 60 proteínas RAB diferentemente codificadas pelo genoma humano têm sido ligadas às vias de sinalização incluindo Hedgehog, EGF e Notch (Evans *et al.*, 2003; Miaczynska *et al.*, 2004; Emery *et al.*, 2005). As RABs se alternam entre uma forma inativa ligada ao GDP e uma forma ativa ligada ao GTP, que é capaz de recrutar para as membranas vários tipos de efetores *dowstream* diretamente responsáveis pela formação de vesículas, movimento e fusão (Stenmark, 2009).

A RAB1A regula o transporte de vesículas contendo proteínas do retículo endoplasmático para o Golgi e na superfície celular. Esta proteína participa da secreção de IL-8 e do hormônio do crescimento; adesão e migração celular, através da sua ação no tráfico de proteínas; montagem de autofagossomos; reações de defesa celular contra bactéria; e no transporte de proteínas dependente de microtúbulos por lisossomos iniciais. A RAB8B pode estar envolvida no tráfico de vesículas polarizadas e na liberação de neurotransmissores, assim como a RAB5B (UNIPROT).

A RAB5 é localizada nos endossomos, caveossomos e membrana plasmática; e medeia a endocitose e a fusão de endossomos de vesículas cobertas pela proteína clatrina (CCVs), a macropinocitose (junto com a RAB 34) e a maturação dos fagossomos iniciais (junto com a RAB14 e RAB22). Em adição, ela funciona como um ponto de encontro para a ligação entre as vias de sinalização e tráfico. A RAB5 está ainda indiretamente envolvida em eventos de sinalização que estimulam a migração celular (através da translocação da RACK1 para os endossomos dependente da RAB5), sobrevivência (através do efector APPL1, que medeia a atividade da AKT1) e transcrição (através da translocação nuclear do APPL1 ou APPL2 e interação com o complexo NuRD de histona desacetilase, resultando em liberação de um grupo acetil a partir de uma histona para modular a estrutura da cromatina) (Stenmark, 2009).

O grande número de proteínas com expressão reduzida (ou mesmo ausente) no grupo exposto à concentração de 10 ppm F quando comparado ao grupo controle pode ser devido à ausência das proteínas RAB5 (B e C) neste grupo, o que pode ter negativamente regulado a transcrição gênica. Tem sido sugerido que a RAB8B é um componente evolucionário conservado, o qual é essencial para a via de sinalização envolvendo Wnt/ β -catenin, através da regulação da atividade e endocitose de LRP6 (Demir, K. *et al.*, 2013). Em adição, a RAB8B medeia o tráfego biossintético constitutivo da rede *trans*-Golgi para a

membrana plasmática e também participa na translocação das vesículas de GLUT4 (junto com RAB10 e RAB14) e na ciliogênese (junto com RAB17 e RAB23) (Stenmark, 2009).

Foi relatado recentemente que a exposição de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina a água contendo 10 ppm F é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina (Lobo *et al.*, 2015), o que poderia estar relacionado com esta ação do F sobre a RAB8, e deveria ser melhor investigado. Em adição, pode-se supor que a subregulação destas proteínas RAB mediante exposição à concentração de 10 ppm F poderia dificultar a liberação de neurotransmissores, dada a sua função no tráfego proteico, o que pode se relacionar de alguma forma com as alterações morfológicas observadas nos neurônios entéricos.

Ainda dentro da análise proteômica do duodeno, ao avaliarmos as proteínas com expressão diferencial no grupo de 50 ppm F em comparação ao grupo controle, observamos que muitas dessas proteínas interagem com outras envolvidas em vias de sinalização gerais e específicas. Dentre elas, a proteína *Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1* (DVL-1; Q9WVB9), a qual apresentou a sua expressão subregulada pelo F, participa na sinalização das proteínas Wnt, ao se ligar à porção C-terminal do citoplasma de alguns membros desta família proteínas, promovendo a sua transdução de sinal e a sua subsequente cascata efetora. A partir desta ligação participa da via de sinalização canônica e da não canônica das proteínas Wnt, e também em vias de sinalização mediadas por múltiplos genes Wnt (UNIPROT).

Outra proteína, a *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (GBLP; P63245) também apresentou sua expressão subregulada pelo F. Esta proteína é um componente da subunidade 40S ribossômica e está envolvida no recrutamento, montagem e/ou regulação de uma variedade de moléculas sinalizadoras; interage com um grande número de proteínas e apresenta um papel importante em um grande número de diferentes processos celulares. Ao se ligar à proteína quinase C, a estabiliza e medeia a sua fosforilação (UNIPROT).

A *Eukaryotic translation initiation factor 5A-1* (EIF5A; Q3T1J1), um fator de iniciação de translação, também apresentou a sua expressão subregulada, assim como algumas histonas, a *Histone H2A.Z* (P0C0S7), *Histone H2A type 1-C* (P0C169) e a *Histone H2A type 1-E* (P0C170). As histonas fazem parte dos nucleossomas, as quais empacotam e compactam o DNA dentro da cromatina, limitando o acesso ao DNA das maquinárias celulares que utilizam o DNA como modelo. Dessa forma, as histonas apresentam um papel central na regulação da transcrição; no reparo e replicação do DNA; e na estabilidade

cromossômica. A acessibilidade do DNA é regulada através de um complexo conjunto de modificações pós-translacionais das histonas, também chamado código das histonas. Dessa forma, estas proteínas apresentam funções importantes, e alterações na sua expressão podem comprometer inúmeros processos celulares fundamentais (UNIPROT).

Algumas chaperonas envolvidas na maturação, manutenção estrutural, transporte e regulação de proteínas também apresentaram a sua expressão subregulada, como a *Heat shock protein HSP 90-alpha* (HSP-90 α ; P82995) e a *Endoplasmic reticulum chaperone* (Q66HD0). Dessa forma, pela subregulação de inúmeras proteínas, acreditamos que a síntese proteica foi bastante afetada em decorrência da toxicidade da exposição crônica à concentração de 50 ppm F.

No presente estudo, o processo biológico apontado pelo CYTOSCAPE® como mais afetado no grupo de 50 ppm F foi *protein polymerization* (Figura 3), e realmente confirmamos dentre as proteínas com expressão diferencial, a subregulação de importantes proteínas como *Actin-alpha skeletal muscle* (P68136), *Actin-alpha cardiac muscle 1* (P68035), *Actin-cytoplasmic 2* (P63269), *Tubulin alpha-1A chain* (P68370), *Tubulin alpha-1B chain* (Q6P9V9), *Tubulin alpha-1C chain* (Q6AYZ1), *Tubulin alpha-3 chain* (Q68FR8), *Tubulin alpha-4A chain* (Q5XIF6), *Tubulin alpha-8 chain* (Q6AY56), *Tubulin beta-2A chain* (P85108). Outras proteínas como as proteínas ligantes dos filamentos de actina também apresentaram a sua expressão subregulada, incluindo *Annexin A2* (Q07936), *Tropomyosin alpha-1 chain* (P04692) e *Adenylyl cyclase-associated protein 1* (CAP-1; Q08163). Esta última diretamente está envolvida em um grande número de complexos processos morfológicos e de desenvolvimento, incluindo a localização do RNAm e o estabelecimento da polaridade celular quando necessário. Na *subnetwork* (Figura 5) é possível observar que a CAP-1 interage com a *Debrin-like protein* (Q9JHL4) a qual apresenta um papel importante na reorganização do citoesqueleto de actina e formação das projeções celulares como dos neuritos durante a morfogênese neuronal e a formação das sinapses (UNIPROT).

A *Tropomyosin alpha-1 chain*, outra proteína identificada, está implicada na estabilização dos filamentos de actina do citoesqueleto. A *Annexin A2* é uma proteína ligante de membrana regulada pelo cálcio que se liga aos filamentos de actina (UNIPROT). Outras duas proteínas ligantes de cálcio também foram identificadas com a expressão subregulada, a *Calmodulin* (P62161) e a *Calreticulin* (P18418). A *Calmodulin* medeia o controle de um grande número de enzimas, canais iônicos, aquaporinas e outras proteínas ligantes de cálcio. Entre as enzimas estimuladas pelo complexo cálcio-calmodulina estão um número de proteínas quinases e fosfatases, as quais desempenham muitas funções essenciais

(UNIPROT). A *Calreticulin* é uma chaperona ligante de cálcio, que promove o dobramento, montagem oligomérica e controle de qualidade do retículo endoplasmático através do ciclo *Calreticulin/Calnexin*. Esta proteína interage transitoriamente com quase todas as glicoproteínas monoglucosiladas que são sintetizadas no retículo endoplasmático (UNIPROT). A *Coronin-1A* (Q91ZN1), descrita anteriormente, é um importante componente do citoesqueleto de células de alta motilidade, e funciona tanto na invaginação de grandes partes da membrana plasmática quanto na protrusão da membrana plasmática, e foi encontrada subregulada. Outra proteína com expressão subregulada, a *GTP-binding nuclear protein Ran* (RAN; P62828) está envolvida no transporte nucleocitoplasmático necessário para a importação de proteínas e também para a exportação de RNA; participando da condensação da cromatina e do controle do ciclo celular (UNIPROT). Dado o papel desempenhando por estas proteínas, a sua subregulação após a exposição à concentração de 50 ppm F pode significar um comprometimento de importantes processos celulares como vias de sinalização, síntese proteica, motilidade celular e tráfego vesicular.

A *Caspase-3* (P55213), a qual também apresentou a sua expressão subregulada, está envolvida na ativação de cascatas responsáveis pela execução da apoptose. Neste início da reação a *Caspase-3* cliva a *poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)* na sua ligação 216-Asp-Gly-217; assim como também cliva e ativa as caspases 6 e 7, desencadeando a adesão celular em neurônios da cadeia simpática (UNIPROT).

Transferrinas são as proteínas transportadoras ligantes de ferro, as quais se ligam a dois íons ferro em associação com a ligação de um anion, normalmente bicarbonato, e são responsáveis pelo transporte de ferro de sítios de absorção e de degradação do grupo heme para aqueles sítios de armazenamento e utilização. Transferrinas séricas também apresentam um importante papel na proliferação celular. O *Transferrin receptor 1 (TRF1)* localizado na superfície celular, internaliza o ferro carregado através de endocitose (Hentze, Muckenthaler e Andrews, 2004). O TRF1 também está presente em tecidos não hematopoiéticos, e foi descrito recentemente que em animais *knockout* para o seu gene, no epitélio intestinal, ocorre uma diminuição da capacidade proliferativa do epitélio, da sua homeostase e da indução de genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima. Estes animais também apresentavam diarreia e perda de peso; secções do duodeno com alterações nos vilos, redução nas células epiteliais da cripta em proliferação e inclusões de lipídeos (Chen *et al.*, 2015).

No presente estudo, a *Serotransferrin* (P12346) também apresentou a sua expressão subregulada em decorrência da toxicidade da concentração de 50 ppm F, o que

poderia conduzir a uma diminuição na captação de ferro. Entretanto, os efeitos da redução da expressão do TFR1 descritos acima não parecem estar relacionados à captação de ferro, uma vez que a sobrecarga de ferro não é capaz de alterar o seu fenótipo (Chen *et al.*, 2015). Mesmo assim, é possível que a ligação do ferro-transferrina ao TFR-1 seja necessária para a via da transdução de sinal que conduzirá aos efeitos dessa ligação/ativação, os quais necessitam de maiores esclarecimentos. É especulado que a inativação do TFR-1 causa uma mutação que interfere na sinalização envolvendo o gene Wnt, a qual diminuiria a capacidade proliferativa do tecido (Chen *et al.*, 2015). No presente estudo, a proteína DVL-1 (Q9WVB9), a qual é responsável pela transdução de sinal do Wnt para cascatas efetoras também apresentou-se subregulada na concentração de 50 ppm F, a qual pode comprometer a função do receptor TRF-1.

A *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (FEZ-1; P97577), a qual foi identificada como ausente no grupo exposto à concentração de 10 ppm F, apresentou-se subregulada no grupo de 50 ppm F quando comparada ao controle, sendo sua descrição feita anteriormente. Outra proteína necessária para a organização celular dos microtúbulos que foi encontrada subregulada em nosso estudo foi a *Nuclear distribution protein nudE-like 1* (NDEL1, Q78PB6), uma proteína que aumenta o deslizamento dos microtúbulos mediado pelas dineínas por direcionar as dineínas às terminações dos microtúbulos. Esta proteína é solicitada por vários processos dependentes das dineínas e dos microtúbulos como a manutenção da integridade do complexo de Golgi; movimento centrípeto de vesículas secretórias; e acoplamento do núcleo e do centróssomo. Esta proteína também facilita a polimerização de neurofilamentos das subunidades individuais NEFH (Neurofilament heavy polypeptide) e NEFL (neurofilament light polypeptide) (UNIPROT) que compõem os neurofilamentos, as quais são componentes estruturais do citoesqueleto dos neurônios maduros (Calmon *et al.*, 2015).

Outra proteína associada ao processo de polimerização proteica que apresentou-se subregulada dentro da exposição crônica à concentração de 50 ppm F foi a *Alpha-actinin-4* (Q9QQ0), uma actina filamentosa (actina F) que ancora a actina à várias estruturas intracelulares e está associada com a organização dos filamentos de actina. Esta proteína está provavelmente envolvida em vias do tráfego vesicular. Adicionalmente, participa da montagem das *tight-junctions* nas células epiteliais provavelmente por ligar a MICALL2 ao citoesqueleto de actina e recrutá-lo para as *tight-junctions*. O MICALL2 é uma proteína efetora das Rab GTPases, a qual está envolvida na montagem dos complexos juncionais

através da regulação do transporte de moléculas de adesão celular à membrana plasmática e também na reorganização do citoesqueleto. Também regula a reciclagem endocítica de ocludinas, claudinas e da E-caderina na membrana plasmática. Paralelamente, pode regular a reorganização do citoesqueleto de actina diretamente através da interação com as actinas-F ou indiretamente através de outras actinas e filaminas (UNIPROT).

No presente estudo, muitas proteínas pertencentes à superfamília das pequenas Rab GTPases apresentaram sua expressão subregulada após à exposição à concentração de 50 ppm F. Estas proteínas são reguladores chave do tráfego intracelular de membranas, desde a formação das vesículas até sua fusão com as membranas. As Rabs alteram entre uma forma inativa GDP-ligada e uma forma ativa GTP-ligada, sendo que esta última pode recrutar para as membranas diferentes conjuntos de efetores responsáveis pela formação vesicular, movimento, ligação e fusão (Stenmark, 2009). O direcionamento e a eficácia da entrega das vesículas são uma parte importante mediada pelos filamentos de actina e pelos microtúbulos que facilitam o transporte vesicular local e também a longas distâncias, respectivamente. As Rab GTPases também podem mediar o transporte vesicular ao longo dos filamentos de actina ou microtúbulos pelo recrutamento de “adaptadores motores” ou pela ligação direta aos “motores” (Stenmark, 2009).

Entre as proteínas Rabs com a expressão subreguladas no presente estudo estão: *Ras-related protein Rab-1A* (Q6NYB7), *Ras-related protein Rab-1B* (P10536), *Ras-related protein Rab-3A* (P63012), *Protein Rab5b* (A1L1J8), *Protein Rab5c* (B0BNK1), *Ras-related protein Rab-8B* (P70550), (Rab-1A e as últimas 3 também apresentaram-se subreguladas após a exposição à concentração de 10 ppm F), *Ras-related protein Rab-10* (P35281), *Ras-related protein Rab-14* (P61107) e *Ras-related protein Rab-26* (P51156). RAB1A e RAB1B regulam o transporte vesicular de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e na superfície celular. A Rab-1A também está envolvida na adesão celular e na migração de proteínas dependente de microtúbulos pelos primeiros endossomos (Stenmark, 2009). A proteína Rab-3A relacionada à proteína Ras está envolvida na excitose pela regulação de um dos passos finais na fusão das vesículas sinápticas. Tanto a Rab-3A quanto a Rab-8B parecem estar envolvidas na liberação de neurotransmissores. No presente estudo ao avaliar o efeito da exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm F observamos alterações morfológicas em todos os tipos neuronais analisados, ou seja, nos neurônios IR-HuC/D e nNOS assim como nas varicosidades IR-VIP, IR-ChAT, IR-CGRP e IR-SP. A alteração na expressão de proteínas como estas podem estar envolvidas com mecanismos

intracelulares neuronais que comprometem a liberação de neurotransmissores, gerando principalmente o seu acúmulo no interior destas células, conduzindo especialmente a um aumento no valor médio de suas áreas. Embora estas conclusões sejam o primeiro passo para a compreensão de como o F pode afetar o SNE e uma excelente explicação pra algumas das alterações observadas na análise da inervação entérica, a expressão de outras moléculas envolvidas na liberação dos neurotransmissores também precisam ser investigadas para que se conheçam exatamente os mecanismos pelos quais as diferentes subpopulações neuronais entéricas são afetadas pela toxicidade do F.

Ainda no que diz respeito às proteínas Rab, a Rab-8 e a Rab-10, as mesmas também participam do transporte biosintético de proteínas do complexo de Golgi para a membrana plasmática. Juntamente com a Rab-14, estas proteínas participam na translocação do GLUT4 (transportador da glucose insulina-sensível) para a membrana plasmática (Stenmark, 2009). Portanto, a subregulação destas proteínas Rab pelo F podem reduzir, no intestino, a absorção de glucose, aumentando assim a insulenemia, sendo que recentemente, foi descrito que a exposição ao F reduz a insulenemia em ratos diabéticos (Lobo *et al.*, 2015). Adicionalmente, a Rab-10 interage com o *Melatonin receptor type 1A* (P49218), o qual provavelmente medeia as ações circadianas da melatonina. Outra proteína envolvida no ritmo circadiano (Wager *et al.*, 2014) que foi observada interagindo com as proteínas identificadas no presente estudo, a *Casein kinase 1 epsilon* (Q9JJ76), é uma proteína quinase serina/treonina que atua com um fator regulador do relógio central do núcleo supraquiasmático (Lowrey *et al.*, 2000) (UNIPROT). Interessantemente, alterações no ritmo circadiano causadas pelo F têm sido descritas em seres humanos, com altas concentrações plasmáticas de F encontradas ao meio-dia e baixas ao final da tarde (Cardoso, Aoyama e Buzalaf, 2008).

Além das proteínas anteriormente descritas, a *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* (P50398) e a *Rab GDP dissociation inhibitor beta* (P50399) também apresentaram a sua expressão subregulada no presente estudo. Estas proteínas regulam a reação de troca entre GDP/GTP da maioria das proteínas Rab pela inibição da dissociação da GDP a estas proteínas e a subsequente ligação do GTP a elas. Este processo conduz à dissociação das proteínas Rab ligantes de GDP (RAB1A, RAB3A, RAB5A and RAB10) da membrana e à inibição da sua ativação. A *Rab GDP dissociation inhibitor beta* interage com a proteína quinase A (PKA), uma proteína serina/treonina envolvida em diferentes vias de sinalização, incluindo a regulação do citoesqueleto, motilidade celular, progressão do ciclo celular,

apoptose e proliferação (UNIPROT). A subregulação da *Rab GDP dissociation inhibitor beta* pode reduzir a taxa de todos estes processos celulares, tornando-se importante este achado dentro de nossos resultados.

A *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1* (PEBP1; P31044) também aparece subregulada pela concentração de 50 ppm F. Esta proteína é uma molécula de sinalização sináptica que aparece subregulada em inúmeras patologias neurológicas como a doença de Alzheimer (Maki *et al.*, 2002), assim como em outras desordens da memória (Feldmann *et al.*, 2008). A localização da PEBP1 na sinapse, como uma molécula de sinalização, sugere que esta proteína possa ser um regulador crítico da sobrevivência neuronal (Charntikov *et al.*, 2015). A subregulação da PEBP1 pode ser associada a um prejuízo da cognição, o qual tem sido sugerido em decorrência da exposição à altas doses de F (Choi *et al.*, 2012; Grandjean e Landrigan, 2014), porém esta questão ainda permanece em debate (Broadbent *et al.*, 2015).

A maioria das proteínas identificadas após a exposição à concentração de 50 ppm F apresentaram a sua expressão subregulada. Interessantemente, duas proteínas que também apresentaram seus genes associados ao processo de polimerização proteica foram identificadas com a sua expressão suprarregulada: a *40S ribosomal protein S14* (RPS14; P13471) e a *40S ribosomal protein S3* (RPS3; P62909). Adicionalmente, outras proteínas com identificação similar apresentaram a sua expressão subregulada: *40S ribosomal protein S25* (RPS25; P62853), *40S ribosomal protein S15a* (RPS15; P62246) and *40S ribosomal protein SA* (RPSSA; P38983). Ribossomos eucariontes consistem de 4 moléculas de RNA (RNAr) e de aproximadamente 80 proteínas diferentes; e podem se dissociar em subunidades pequenas e grandes. As proteínas ribossomais não atuam somente na translação proteica, mas também em várias outras atividades, que incluem o reparo do DNA, morte celular, inflamação, tumorigênese, montagem ribossomal e regulação da transcrição.

As proteínas ribossomais são consideradas sentinelas da saúde celular, sendo que perturbações na síntese ribossômica liberam proteínas que interagem com o sistema p53, conduzindo à paralisação do ciclo celular ou podem levar à apoptose (Warner e McIntosh, 2009). A RPS3 é uma proteína envolvida no reparo do DNA e na regulação da apoptose, sendo que a sua supraexpressão ou o seu *knockout* conduzem à apoptose, sugerindo que a presença da RPS3 é importante para o funcionamento celular apropriado. Adicionalmente, RPS3 pode ser fosforilada, reduzindo a apoptose (Gao e Hardwidge, 2011). RPS3 pode também alterar a resposta à estimulação de TNF, onde se torna parte do complexo NFkB,

estabilizando a interação deste fator de transcrição com sítios específicos no genoma (Warner e McIntosh, 2009). RPS14 é essencial para a maturação da subunidade ribossômica 40S (Wu *et al.*, 2010), enquanto a RPSSA é necessária para a montagem e/ou estabilidade da subunidade 40S ribossômica e para o amadurecimento do RNAr-precursor 20S a RNAr 18S no último estágio de maturação das subunidades ribossômicas 40S. A RPSSA também funciona como um receptor de superfície para a laminina e apresenta um papel importante na adesão celular à membrana basal e na subsequente ativação de vias de transdução de sinais. Participa ainda da determinação da morte celular e da morfogênese tecidual (UNIPROT). Devido a seu importante papel na montagem, estabilidade e maturação da subunidade 40S, a subregulação desta proteína pode comprometer a síntese proteica, contribuindo com a redução nos níveis de muitas outras proteínas em consequência da toxicidade da concentração de 50 ppm F.

Dentre os processos biológicos mais afetados pela concentração de 50 ppm F está a regulação positiva da organização das organelas (Figura 3). Este termo está relacionado a qualquer processo que aumente a frequência, taxa ou extensão de um mecanismo envolvido na formação, arranjo ou desmontagem das partes constituintes das organelas. Também verificamos que a maioria dos genes envolvidos na regulação positiva da organização das organelas também está implicada na polimerização proteica.

Outras proteínas identificadas com a expressão alterada no grupo de 50 ppm F interagem com proteínas envolvidas em importantes vias de sinalização, incluindo as proteínas: *Beta-arrestin-1* (P29066), *Casein kinase 1 epsilon* (Q9JJ76), *Debrin-like protein* (Q9JHL4), *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) (P62994), *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* (Q00960), *Mitogen-activated protein kinase 3* (MAPK3; P21708), *Serine/threonine-protein kinase PAK 2* (Q64303), *Protein kinase C epsilon type (PKC)* (P09216), *Mothers against decapentaplegic homolog 2* (SMAD 2; O70436), *Tumor necrosis factor* (P16599), *E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63* (Q91Z63) e *14-3-3 protein epsilon* (P62260). A maioria das vias de sinalização nas quais estas proteínas de interação estavam envolvidas está relacionada a processos como a organização do citoesqueleto, enquanto algumas proteínas estão relacionadas com a organização dos lisossomos, nucleossomos, complexo de Golgi e com o retículo endoplasmático em uma menor extensão.

Outra proteína envolvida na organização das organelas apresentou a sua expressão suprarregulada, a 78 kDa *glucose-regulated protein* (P06761), a qual está envolvida na organização do retículo endoplasmático. Como descrito anteriormente, a maioria das

proteínas se encontrava subregulada, incluindo: *Calmodulin* (P62161), *Caspase-3* (P55213), *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1* (Q9WVB9), *Eukaryotic translation initiation factor 5A-1* (Q3T1J1), *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (P97577), *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1* (P63245), *Glutathione S-transferase P* (P04906), *Heat shock protein HSP 90-alpha* (P82995), *Nuclear distribution protein nudE-like 1Ndel1* (Q78PB6), *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1* (P31044), *Peroxiredoxin-5, mitochondrial* (Q9R063), *Ras-related protein Rab-26* (P51156), *40S ribosomal protein S15a* (P62246), *ADP/ATP translocase 1* (Q05962), *Serotransferrin* (P12346), *Tropomyosin alpha-1 chain 9* (P04692), *Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial* (Q68FY0), *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* (P46462) e *Vimentin* (P31000). Estas proteínas subreguladas estão envolvidas na sua grande maioria na organização do citoesqueleto, enquanto algumas delas estão relacionadas com a organização dos ribossomos, centrossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, o que sugere que o F causa um comprometimento na organização destas organelas, especialmente relacionadas ao citoesqueleto, gerando uma desorganização na arquitetura celular.

Dentro dos resultados da análise proteômica, quanto à exposição à dose aguda de F, apesar de a eutanásia ter sido conduzida apenas 2 horas após a exposição, houve alteração na expressão de 356 proteínas em relação ao grupo controle, um número ainda maior que aquele observado nos casos de exposição crônica ao F. No grupo que recebeu a dose aguda de 25 mg F/kg foi observado um padrão similar ao observado para o grupo exposto cronicamente com a maior concentração de F na água (50 ppm F), no qual a maioria das proteínas com alteração de expressão encontrava-se subregulada em relação ao controle, enquanto que no grupo exposto cronicamente com a menor concentração de F (10 ppm F), a maioria das proteínas com alteração de expressão encontrava-se suprarregulada em relação ao controle. Estes dados indicam que, em baixas exposições ao F existe um estímulo à síntese proteica, enquanto que nas altas exposições, há um prejuízo na síntese proteica. No caso da exposição crônica à concentração mais alta de F, o processo biológico mais afetado foi *protein polymerization*, com 33% dos genes associados afetados, enquanto que no caso da exposição aguda ao F, os processos biológicos mais afetados envolviam a produção de energia, sendo que os termos em destaque foram *generation of precursor metabolites and energy* e *NADH metabolic process*, com 27 e 21% dos genes associados afetados, respectivamente. Também houve bastante alteração nos processos relacionados ao tecido muscular, como *muscle structure development* (18%), *muscle system process* (17%) e *myofibril assembly* (14%),

síntese proteica [*purine ribonucleoside triphosphate process* (15%)] e sistema antioxidante [*glutathione metabolic process* (15%)].

Na *subnetwork* gerada para a comparação da expressão diferencial de proteínas do grupo de 25 mgF/kg com as proteínas do grupo controle (Figura 7), foram fornecidas as seguintes proteínas de interação: *Coronin-1A* (Q91ZN1), *Mitogen-activated protein kinase 3-MAPK3* (P21708), *Synaptojanin-1* (Q62910), *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (P13569), *14-3-3 Protein zeta/delta* (P63102), *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* (B0BNL2), *Plastin-3* (Q63598) e *Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit* (Q5BJ92).

A *Coronin-1A* (Q91ZN), a qual apresenta inúmeras funções, foi descrita anteriormente dentre as proteínas com expressão diferencial no grupo de 10 ppm F, sendo observado que teve sua expressão diminuída nos grupos exposto à concentração de 10 ppm F e 50 ppm F em relação ao controle. Dentre as proteínas identificadas que interagem com a *Coronin 1-A* encontra-se a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), que foi a única proteína com expressão aumentada no grupo exposto à dose aguda de F em relação ao controle. Essa proteína é uma chaperona, que auxilia no dobramento de proteínas como a actina e a miosina, mediante hidrólise de ATP (UNIPROT). No presente estudo, devido ao fato de vários genes envolvidos na geração de energia terem sido afetados, o aumento da expressão da *T-complex protein 1 subunit alpha* pode ter sido uma tentativa do organismo de manter o dobramento da actina e da miosina, as quais estão envolvidas na hidrólise de ATP para a conversão da energia química em mecânica (Lodish *et al.*, 2000).

Outras proteínas que interagem com a *Coronin-1A* identificadas no grupo exposto à dose aguda de F e que apresentaram a expressão reduzida em relação ao controle foram a *Histone H2A.Z* (P0C0S7), cuja expressão também foi reduzida mediante exposição crônica a 50 ppm F e a *Histone H3.3* (P84245). A *Histone H2A.Z* é uma variação da *Histone H2A*, que a substitui numa subpopulação de nucleossomos, os quais envolvem e compactam o DNA na cromatina, limitando sua acessibilidade às maquinárias celulares que requerem o DNA como molde. Desta maneira, as histonas desempenham um papel central na regulação da transcrição, reparo de DNA, replicação do DNA e estabilidade do cromossomo. A acessibilidade ao DNA é regulada por um complexo conjunto de modificações pós-traducionais das histonas, ao que se chama “código das histonas”, assim como pela remodelação dos nucleossomos (UNIPROT), ressaltando a importância destas proteínas. A *Histone H3.3* constitui a forma predominante de histona H3 em células que não estão em

divisão. Ela é depositada em sítios de deslocamento nucleossomal ao longo de genes transcritos, sugerindo que representa uma impressão epigenética de cromatina transcricionalmente ativa (UNIPROT). Assim, a subregulação destas isoformas de histona, assim como das proteínas *Histone H2A type 1-C 1* (P0C169) e *Histone H2A type 1-E* (P0C170) corrobora na redução da síntese proteica induzida pela exposição ao F.

A *Mitogen-activated protein kinase 3* (MAPK3; P21708) também aparece como mais uma proteína de interação presente na *subnetwork* do grupo da dose aguda, a qual pertence à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que se destacam devido ao seu papel fundamental na regulação de importantes respostas aos mitógenos (Chiou *et al.*, 2007). As MAPKs constituem uma família de proteínas quinases cujas funções e regulação têm sido conservadas durante a evolução, sendo encontradas desde em organismos unicelulares até organismos complexos como o dos seres humanos (Johnson e Lapadat, 2002). Estas MAPKs estão envolvidas na transdução de sinal celular em resposta a estímulos externos, através da fosforilação proteica reversível, constituindo um dos principais mecanismos da comunicação celular (Dhillon *et al.*, 2007). Esta resposta se inicia com a fosforilação da tirosina seguida da fosforilação da serina/treonina mediada por uma das quinases Ras, Raf, proteínas ativadas por mitógenos (MAP) ou a S6 quinase (Silva, B. V. *et al.*, 2009).

As MAPKs fosforilam as serinas e treoninas específicas em várias proteínas, e dessa forma regulam a atividade celular, atuando em processos que vão desde a expressão gênica, movimento de moléculas, metabolismo, até à apoptose (Robinson e Cobb, 1997). Segundo Chiou *et al.* (2007), as MAPKs participam de processos como a regulação da meiose e mitose, assim como também apresentam funções pós-mitóticas em células diferenciadas através da fosforilação de vários fatores de transcrição. A maioria dos substratos das MAPKs se encontra no núcleo, onde estas quinases promovem, especialmente, a regulação da transcrição após estimulação. No citosol, interagem com outras organelas responsáveis por processos como a tradução, assim como participam da dinâmica endossomal, incluindo o processamento e a reciclagem de endossomos (UNIPROT).

Dentre as várias MAPKs, é conhecido que a MAPK3 promove a regulação da transcrição e controla a proliferação e apoptose em linhagens celulares que promovem o desenvolvimento de câncer no fígado, funcionando, desta forma, em um promotor desta patologia (Chiou *et al.*, 2007).

Já no caso da alergia inflamatória, a MAPK3 promove a ativação de vias de sinalização geralmente ao nível da expressão gênica, pela ativação de fatores de transcrição, os quais se ligam às regiões promotoras dos genes das citocinas inflamatórias, conduzindo à esta expressão gênica específica. Os autores confirmaram neste caso que a MAPK3 é um importante mediador, pois até mesmo os mastócitos dependem da ativação desta proteína (Macneil, Yang e Lin, 2011). Neste mesmo estudo, observou-se em animais *knockout* para a MAPK3 que não havia defeito na maturação e degranulação, porém havia um comprometimento tanto da produção de citocinas inflamatórias, como de IL-4, como também na resposta dependente da IgE.

Em peixes-zebra (*zebrafish*), a determinação dos níveis de RNAm da MAPK3 revelou que esta quinase é expressa em vários tecidos pelos altos níveis de RNAm detectados nos músculos, fígado, rins, e coração (Chiou *et al.*, 2007). Como estes tecidos são importantes para a sobrevivência, migração e regulação hormonal desse modelo animal, os autores acreditam que a MAPK3 é sintetizada localmente em diversos tecidos do organismo, como também está envolvida na transdução de sinal de inúmeros tipos celulares. Neste mesmo estudo, em peixes-zebra *knockout* para o gene da MAPK3, verificou-se um comprometimento do desenvolvimento da notocorda, assim como de todo o organismo do animal, evidenciando que esta quinase está envolvida no desenvolvimento embrionário, sendo fundamental para este processo.

No que diz respeito ao comprometimento nervoso, em camundongos com deficiência de MAPK3 foi observada uma destruição de mielina na medula espinal no caso da encefalomielite, caracterizando o importante papel da MAPK3, em que a sua ausência aumenta a susceptibilidade e o agravamento desta patologia (Agrawal *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, a MAPK3 foi oferecida como uma proteína de interação, conectando inúmeras outras proteínas identificadas com a expressão subregulada, as quais descrevemos a seguir de acordo com informações do UNIPROT, e incluem: *Adenine phosphoribosyltransferase* (P36972), envolvida na biossíntese de AMP através de uma via de recuperação; *ATP synthase subunit delta, mitochondrial* (P35434) e *ATP synthase subunit beta, mitochondrial* (P10719), que são ATP sintases da membrana mitocondrial, envolvidas na síntese de ATP a partir do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana, gerado pelos complexos transportadores de elétrons da cadeia respiratória; *Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial* (P32551), que é essencial para a montagem do complexo ubiquinol-citocromo c reductase (complexo III ou complexo

citocromo b-c1, parte da cadeia respiratória; *Histone H3.3* (P84245), um marcador epigenético de cromatina transcrita; *Kinesin heavy chain isoform 5C* (P56536), proteína de produção de energia associada ao microtúbulos que desempenha um papel no transporte de organelas e tráfico de RNA-m; *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3* (P06687), que é o componente catalítico da ATPase Na⁺/K⁺ ativa, a qual catalisa a hidrólise de ATP acoplada a troca de íons Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática, criando um gradiente eletroquímico de Na⁺ e K⁺ e fornecendo energia para o transporte de vários nutrientes; *Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial* (Q60587), envolvida na via de β-oxidação de ácidos graxos; e a *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* (P46462), implicada na formação do retículo endoplasmático de transição, o qual está envolvido na transferência de membranas do retículo endoplasmático para o Golgi através de vesículas de transição com gasto de energia. Estas vesículas se ligam a proteínas ubiquitinadas e são necessárias para a exportação de proteínas com dobramento alterado do retículo endoplasmático para o citoplasma, onde as mesmas são degradadas nos proteassomas. É ainda necessária para a translocação citoplasmática de proteínas da membrana mitocondrial externa danificadas e sua subsequente degradação proteassomal.

Em adição, ainda podemos citar outras proteínas presentes na *subnetwork* como a *Heat shock protein beta-1* (P42930), envolvida na resistência ao estresse e organização da actina, regulando negativamente a apoptose; *Phosphoglycerate kinase 1* (P16617), enzima da via glicolítica, envolvida no passo 2 da subvia que sintetiza piruvato a partir do D-gliceraldeído 3-fosfato; *L-lactate dehydrogenase A chain* (LDH; P04642), envolvida na fermentação do piruvato a lactato; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH; P04797), que tem tanto atividades de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sendo essencial para a via glicolítica quanto de nicrosilase, que permite um papel em funções nucleares como transcrição, transporte de RNA, duplicação do DNA e apoptose. Esta proteína ainda modula a organização e montagem do citoesqueleto; assim como também é um componente do GAIT (gamma interferon-activated inhibitor of translation), o qual media a inibição da tradução de transcritos seletivos induzida pelo interferon-gamma em processos inflamatórios) (UNIPROT).

Outras proteínas também participaram da *subnetwork*, como a *Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial* (HSP75; Q5XHZ0), uma chaperona com atividade ATPase, envolvida na manutenção da função e polarização mitocondrial, que age como um regulador negativo da respiração mitocondrial, capaz de modular o balanço entre a fosforilação oxidativa e a

glicólise aeróbica; *Elongation factor 1-gamma* (Q68FR6), envolvido na ancoragem de componetes celulares; *Citrate synthase, mitochondrial* (Q8VHF5), enzima chave no ciclo do ácido cítrico, no qual está envolvida no passo 1 da subvia que sintetiza o isocitrato a partir do oxaloacetato (UNIPROT). A subregulação destas proteínas que interagem com a MAPK3 é um indício de comprometimento da síntese proteica em vários níveis, desde a transcrição até a tradução; além de distúrbios na motilidade intracelular, metabolismo; ou processos como apoptose (Robinson e Cobb, 1997) e inflamação (Macneil, Yang e Lin, 2011), que são atividades nas quais as MAPKs atuam.

Dentre as proteínas de interação oferecidas pelo software CYTOSCAPE®, encontram-se ainda a *14-3-3 protein zeta/delta* (P63102) e a *Synaptojanin-1* (Q62910). As proteínas 14-3-3 formam uma família de proteínas cuja estrutura primária foi altamente conservada no processo evolutivo, e mesmo que atualmente estas proteínas sejam encontradas em diferentes organismos como plantas, insetos, anfíbios e mamíferos, essa permanência de algumas características reflete sua fundamental importância nas células eucarióticas (Alam *et al.*, 1994). As proteínas da família 14-3-3 ligam-se a um grande número de outras proteínas, e regulam atividades através de mecanismos como ativação/inativação enzimática, promoção/inibição da interação de proteínas, e sequestro de proteínas para o citoplasma para sua inativação (Hermeking, 2003). Dentro destes processos, estas proteínas interagem com um grande número de proteínas quinases, fosfatases e outras proteínas sinalizadoras, sendo envolvidas na transdução de sinais, tráfego intracelular e secreção e até interagindo com o DNA, iniciando o processo de replicação (Aitken, 2011).

Alguns autores apresentam algumas funções para estas proteínas como regulação da proteína quinase C (Aitken *et al.*, 1990; Toker *et al.*, 1992); ativação de enzimas da síntese de neurotransmissores, como a tirosina e a triptofano hidroxilase (Ichimura *et al.*, 1987; Ichimura *et al.*, 1988); ativação da ADP-ribosiltransferase (Fu, Coburn e Collier, 1993); estimulação da exocitose dependente de Ca^{2+} em células cromafins adrenais (Morgan e Burgoyne, 1992); e importação proteica mitocondrial a partir do citoplasma, em células do fígado (Alam *et al.*, 1994).

Quanto às suas isoformas, também é descrita a ampla distribuição e a alta expressão da proteína *14-3-3 protein zeta/delta* em diferentes regiões do cérebro de ratos, como o neocórtex, hipocampo, núcleo caudado, putamen, tálamo, córtex cerebelar e em vários núcleos, sugerindo que esta proteína apresente um papel fundamental para a função cerebral (Watanabe *et al.*, 1994). Outros autores também identificaram várias isoformas da 14-3-3

protein zeta/delta no hipocampo de ratos, sendo a presença dessas variações derivadas de mutações, um indicativo da diversidade de funções desta proteína no hipocampo (Murakami, Situ e Eshete, 1996). Dado este grande número de funções importantes, tanto intracelulares, quanto especificamente no SNC, é compreensível que esta proteína de interação se apresente conectada a inúmeras outras que observamos com a expressão alterada na análise proteômica aqui apresentada. No presente estudo a *14-3-3 protein zeta/delta*, que também está presente na *subnetwork* gerada para a comparação entre o grupo exposto à concentração de 50 ppm F e o controle, como uma proteína de interação, onde interagiu tanto com outra proteína de interação, a MAPK3 quanto com inúmeras outras proteínas com expressão diferencial, assim como ocorreu no grupo exposto à dose aguda de F em relação ao controle.

Dentre estas proteínas com a expressão diferencial com as quais interagiu, apenas a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), encontrava-se suprarregulada mediante exposição ao F, enquanto todas as outras encontravam-se subrreguladas. Entre as subrreguladas, chamam a atenção aquelas que também interagem com a MAPK3, como a *L-lactate dehydrogenase A chain* (LDH; P04642), *Heat shock protein beta-1* (P42930), *Phosphoglycerate kinase 1* (P16617), *ATP synthase subunit beta mitochondrial* (P10719), *GAPDH* (P04797), *HSP 75* (Q5XHZ0), com a grande maioria delas envolvida em processos de produção de energia (UNIPROT). Dentre outras proteínas que interagem com a *14-3-3 protein zeta* encontram-se a *Keratin, type I cytoskeletal 18* (Q5BJY9), a qual, quando fosforilada, desempenha papel na reorganização de filamentos; as *Histone H2A type 1-E* (P0C170) e *Histone H3.1* (Q6LED0), componentes chave do nucleossoma, que regulam a acessibilidade ao DNA; a *Major vault protein* (Q62667), proteína envolvida na formação dos “cofres”, que são estruturas com várias subunidades as quais atuam como suporte para proteínas envolvidas na transdução de sinal; *Keratin, type I cytoskeletal 19* (Q63279), que atua na organização de fibras musculares; *Nuclease-sensitive element-binding protein 1* (P62961), que também estava subrregulada no grupo exposto à concentração de 50 ppm F em relação ao controle e desempenha várias funções importantes, como: mediação da regulação do *splicing* alternativo do pre-RNAm, estabilização do RNAm citoplasmático, regulação da transcrição de vários genes e atuação no reparo do DNA; *Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial* (P07756), envolvida no ciclo da ureia, remove o excesso de amônia da célula; *60S acidic ribosomal protein P2* (P02401), proteína ribossomal muito importante no passo de alongação da síntese proteica; *Creatine kinase U-type, mitochondrial* (P25809), que desempenha um importante papel na transdução de energia em tecidos com

demanda grande e flutuante de energia; *Aspartate aminotransferase, cytoplasmic* (P13221), que age na biossíntese de L-glutamato, a partir do L-aspartato ou L-cisteína, sendo um importante regulador dos níveis de glutamato, o qual é o maior neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central dos vertebrados (UNIPROT).

Quanto à *Synaptojanin-1* (Q61910), outra proteína de interação oferecida pelo CYTOSCAPE®, o seu mecanismo de ação está envolvido no processo de neurotransmissão, onde esta proteína atua especificamente sobre as vesículas sinápticas, as quais são organelas altamente especializadas, utilizadas pelos neurônios para secretar os seus neurotransmissores nas sinapses (Ramjaun e Mcpherson, 1996). Após a exocitose das vesículas sinápticas, as membranas vesiculares são internalizadas e reutilizadas através de um processo denominado endocitose, no qual proteínas como a *Synaptojanin-1* atuam conjuntamente com outras proteínas, como a dinamina (Ramjaun e Mcpherson, 1996) e a endofilina (Schwartzentruber *et al.*, 2012), sendo estas colocalizadas em terminais nervosos (Mcpherson *et al.*, 1994). Dentro deste processo, a função da *Synaptojanin-1* é controlar ou modular o transporte das vesículas sinápticas (Woscholski e Parker, 1997), facilitando a reciclagem das vesículas sinápticas nos terminais pré-sinápticos, sendo que a sua deleção gera graves distúrbios nas sinapses, incluindo deleção das vesículas sinápticas e acúmulo de moléculas intermediárias da endocitose, causando falha na neurotransmissão (Harris *et al.*, 2000; Dickman *et al.*, 2005). Da mesma forma, é descrito que a supraexpressão da *Synaptojanin-1* pode causar disfunção cerebral e alterações cognitivas em modelos animais em que são avaliados os efeitos da síndrome de Down, por exemplo (Dong *et al.*, 2015).

A *Synaptojanin-1* faz parte da família das fosfatases de inositol 5-polifosfato (fosfatases-5), as quais são enzimas que removem fosfatos da posição 5-hidroxil de fosfoinositídeos e de inositol fosfatases, sendo que tanto os substratos quanto os produtos dessa reação implicam no processo da transdução de sinais, sugerindo que as fosfatases-5 possam apresentar um papel importante no controle destes eventos (Woscholski e Parker, 1997).

No presente estudo a *Synaptojanin-1* interagiu com a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), com expressão aumentada mediante exposição aguda ao F e com a *Polyubiquitin-C* (Q63429), com expressão reduzida. As cadeias de poliubiquitina, quando ligadas a uma proteína alvo, têm diferentes funções dependendo do resíduo de lisina ao qual a ubiquitina está ligada: quando ligada à lisina-6 pode estar envolvida no reparo de DNA; à lisina-11 está envolvida da degradação associada ao retículo endoplasmático e na regulação

do ciclo celular; à lisina-29 na degradação lisossomal; à lisina-33 na modificação de quinases; à lisina-48 na degradação de proteínas nos proteassomas; à lisina 63 na endocitose, respostas de dano ao DNA, bem como a processos de sinalização que levam à ativação do fator de transcrição NF-kappa- β . Quando a poliubiquitina está livre também tem papéis distintos, como na ativação de proteínas quinase e sinalização (UNIPROT).

Entre as proteínas de interação de menor importância na *subnetwork*, por se ligarem a um menor número de proteínas com expressão alterada, estavam a *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (P13569), *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* (B0BNL2), *Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit* (Q5BJ92) e a *Plastin-3* (Q63598).

A *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* encontra-se envolvida no transporte de íons cloreto, secreção de bicarbonato e recuperação de células epiteliais pela regulação do transportador SLC4A7. Dessa forma, apresenta um papel importante na homeostase do cloreto e bicarbonato (UNIPROT). As próprias características da fibrose cística, como as alterações nos potenciais elétricos através do epitélio do trato respiratório e paredes das glândulas sudoríparas confirmam este comprometimento no transporte do íon cloreto em células epiteliais (Riordan *et al.*, 1989). No presente estudo, a *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* interagiu com a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), com expressão aumentada e com duas proteínas subreguladas mediante exposição aguda ao F, a saber: *Polyubiquitin-C* (Q63429) e *Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1* (Q5BJY9). Esta última é uma proteína de suporte, que conecta as proteínas da membrana plasmática com membros da família ezrin/moesin/radixin, ajudando a ligá-las ao citoesqueleto de actina e a regular a expressão das mesmas na superfície da membrana (UNIPROT).

Pertencente à grande família das peptidil-prolil cis/trans isomerases, a *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* faz parte de um grupo de enzimas que catalisam a conversão entre as conformações cis e trans das ligações peptídicas da prolina (UNIPROT). Estas enzimas apresentam um papel crítico em mecanismos regulatórios de funções celulares como na progressão do ciclo celular, sinalização e proliferação celular e também estão envolvidas na patofisiologia de várias doenças, como as vasculares, onde atualmente seus inibidores têm sido estudados como possíveis formas terapêuticas (Rostam *et al.*, 2015). Outros autores descrevem o envolvimento desta grande família de isomerases em importantes processos como na expressão gênica, transdução de sinal, desenvolvimento e regeneração

tecidual (Ünala e Steinert, 2014). No presente estudo, a *Peptidylprolyl cis/trans isomerase* interagiu com a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), com expressão aumentada mediante exposição aguda ao F e com a *Aspartate aminotransferase, cytoplasmic*, com expressão diminuída.

Outra das proteínas de interação, a *Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit*, pertencente à família das proteínas fosfatases, encontra-se relacionada a um grande número de processos importantes como a organização dos microtúbulos nos centrossomos, maturação do spliceossomo, reparo de DNA, sinalização do TNF- α , ativação da MAPK8, regulação da acetilação de histonas, ativação do NF-Kappa- β e migração celular (UNIPROT). Além destes mecanismos, ainda participa da ativação de reguladores de apoptose e de dineínas, assim como também está envolvida no desenvolvimento embrionário, comprovado em peixes-zebra (Jia *et al.*, 2012). Neste estudo interagiu com a *T-complex protein 1 subunit alpha* (P28480), com expressão aumentada mediante exposição aguda ao F e com a *Histone H2A 1-C*, com expressão diminuída.

A *Plastin-3*, outras das proteínas de interação, é amplamente distribuída no organismo (Lin *et al.*, 1994). No que diz respeito às suas relações com o sistema nervoso, é observado um declínio na expressão do seu gene durante a diferenciação de células tronco pluripotentes em neurônios motores (Boza-Morán *et al.*, 2015), assim como se acredita que a sua supraexpressão, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, pode recuperar os defeitos axonais causados por baixos níveis na expressão do gene da sobrevivência do neurônio motor (*Snm*) (Oprea *et al.*, 2008), sendo confirmado que o aumento da sua expressão também aumenta o número de vesículas disponíveis prontamente na sinapse no caso da patologia desencadeada por este gene *Snm* (Lyon *et al.*, 2014). Dado que esta proteína também é uma ligante da actina (Glenney *et al.*, 1981), a qual é essencial para o crescimento axonal (Dent, Gupton e Gertler, 2011) e para a formação de sinapses (Cingolani e Goda, 2008), acredita-se que a *Plastin-3* esteja intimamente relacionada ao funcionamento neuronal de uma maneira geral.

Na *subnetwork*, a *Plastin-3* apresenta-se conectada à *Malate dehydrogenase, mitochondrial* (P04636), a qual apresentou a sua expressão diminuída mediante a exposição aguda ao F e que atua na oxidação do malato a oxaloacetato. Encontra-se ainda conectada à única proteína do módulo com a expressão suprarregulada, a *T-complex protein 1 subunit alpha*. Esta importante proteína, presente em todas as formas de vida (Bhaskar, Kumari e Goyal, 2012), pertence ao grupo do complexo T proteico, o qual é formado por um conjunto de chaperonas essenciais, que utiliza a reciclagem do ATP para a formação de

aproximadamente 10% do proteoma eucariótico (Leitner *et al.*, 2012). As chaperonas se ligam a polipeptídeos não estruturados, promovendo o dobramento adequado de proteínas (Rothman, 1989), auxiliando na montagem (Cheng, Hartl e Horwich, 1990), desmontagem (Goloubinoff *et al.*, 1989) e translocação de proteínas através de membranas (Kang *et al.*, 1990). Da mesma forma, foi verificado que uma chaperona citoplasmática do complexo T catalisa o dobramento da β -actina (Gao *et al.*, 1992).

O complexo T proteico é formado por 8 subunidades distintas, entre elas a subunidade alfa, que serve como substrato para a ligação de proteínas citosólicas recém-formadas (Yam *et al.*, 2008) e participam do dobramento não somente de tubulinas e actinas, como também de outras proteínas reguladoras da divisão celular e da formação do citoesqueleto (Yaffe *et al.*, 1992).

Dentre as proteínas do complexo T proteico, a *T-complex protein-1* (TCP1), é a chaperona responsável pela biogênese da tubulina, a principal proteína citosólica cuja montagem dentro dos microtúbulos é crítica para inúmeros processos biológicos (Yaffe *et al.*, 1992). Acredita-se, que além de ser necessária em grande quantidade para a formação do acrossomos, a TCP1 seja essencial para o transporte de proteínas pela via exocítica em todos os tipos celulares, sendo comprovada a sua presença em vesículas exocíticas (Willison *et al.*, 1989).

Ao avaliar o envolvimento da TCP1 em doenças neurodegenerativas como a doença de Huntington, foi observada a relação da TCP1 com a poliglutamina, a qual é encontrada com alteração no seu dobramento e agregação nesta patologia (Zoghbi e Orr, 2000). Algumas chaperonas, como a TCP1, interagem com a variante expandida da poliglutamina da doença de Huntington e inibem a sua agregação, sendo conhecido que a deleção destas chaperonas aumenta a agregação da poliglutamina. Por outro lado, a supraexpressão da TCP1 é suficiente para remodelar os agregados da poliglutamina e reduzir a sua toxicidade em neurônios do SNC. Como a TCP1 age na formação *de novo* da poliglutamina (Frydman *et al.*, 1994), acredita-se que seja responsável por prevenir a estabilização desta proteína em uma forma patogênica, controlando o avanço da doença de Huntington. Dessa forma, esta ligação específica da TCP1 à poliglutamina é considerada importante, sendo o sítio de ligação da poliglutamina na TCP1 classificado como um possível alvo para terapias de doenças neurodegenerativas (Tam *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, como observamos a supraexpressão da proteína TCP1, acreditamos que existe a possibilidade deste aumento na expressão ter ocorrido em tipos

celulares específicos, como nos neurônios entéricos, o que pode estar relacionado à toxicidade do F, na alta dose aguda de 25 mg F/kg. Da mesma forma como no estudo da doença de Huntington, esse aumento na expressão da TCP1 pode ser considerado como uma tentativa de controlar a toxicidade do F nos diferentes tipos neuronais, dado que um aumento na quantidade destas chaperonas no citosol, ligando-se a outras proteínas também com expressão alterada por conta do F, pode promover o dobramento/desdobramento/translocação e até mesmo a degradação destas proteínas em excesso, sendo estes alguns dos papéis das proteínas do complexo T.

Quanto às proteínas identificadas com expressão alterada no grupo que recebeu a dose aguda, consideramos comentar algumas que apresentam importantes funções ou participam de processos-chave dentro da fisiologia do TGI e que podem nos ajudar a explicar os mecanismos envolvidos na toxicidade do F.

Conectada à TCP1, a proteína com expressão subregulada *Ccdc94* (A2VD11), é um componente funcional do complexo Prp19, conhecido por regular a expressão gênica e reparar o DNA danificado (Sorrells *et al.*, 2012). Neste estudo de Sorrells *et al.* (2012), é descrito que o complexo Prp19 reprime a morte celular pela inibição do RNAm do gene p53, o qual é um mediador crítico da morte celular induzida por danos ao DNA. Com a inativação da proteína *Ccdc94* os autores observaram que as células se tornavam mais sensíveis à morte celular induzida pela radiação, pois como esta proteína faz parte do complexo Prp19, o qual reprime a morte celular, na alteração da sua expressão a morte celular foi então induzida, especialmente em neurônios. Dessa forma, como em nosso estudo a proteína *Ccdc94* encontra-se subregulada no grupo de 25 mg F em relação ao controle, é possível que esta subregulação também aumente a sensibilidade neuronal à morte celular que pode ser induzida pela toxicidade da alta dose de F. A indução de apoptose pela exposição ao F é descrita na literatura (Yan *et al.*, 2015). Da mesma forma, a subexpressão desta e de outras proteínas que são encontradas em neurônios também ajudam a explicar, a diminuição, mesmo que não significativa, na densidade neuronal observada na população total de neurônios mioentéricos imunorreativos à HuC/D no duodeno em consequência da exposição à dose aguda.

Outra proteína relacionada ao funcionamento neuronal, a *Kinesin heavy chain isoform 5C* (P56536) apresentou-se com a expressão subregulada, sendo classificada como uma proteína motora, promovendo o movimento de vesículas e organelas ao longo dos microtúbulos, ao se ligarem a estas organelas e hidrolisarem o ATP, levando a uma alteração

conformacional que converte energia química em mecânica (Sack *et al.*, 1997). Este mecanismo de transporte nos microtúbulos pelas cinesinas tem sido recentemente descrito, especialmente a partir da observação da presença de proteínas ATP-dependentes que atuam no transporte dentro do axônio (Kozielski *et al.*, 1997). As proteínas motoras mais conhecidas são as pertencentes à família das miosinas, as quais se movem ao longo dos filamentos de actina, e à família das cinesinas, à qual pertence a *Kinesin heavy chain isoform 5C*, que se move ao longo dos microtúbulos (Kozielski *et al.*, 1997). As cinesinas estão envolvidas em processos como: transporte intracelular, meiose e mitose, bioquímica cinética, micromecânica e composição de subunidades (Mandelkow e Hoenger, 1999). Como as células transportam proteínas e lipídeos após a sua síntese a vários destinos, este transporte intracelular é fundamental para a morfogênese e o funcionamento celulares, especialmente em células polarizadas como neurônios e células epiteliais (Hirokawa, 1998).

Dentro da composição neuronal, são descritas três estruturas: corpo celular, dendritos e axônio. O axônio não apresenta uma maquinária para síntese proteica, portanto, as proteínas necessárias no axônio e nos terminais sinápticos devem ser transportadas a partir do corpo celular em direção a estas estruturas. A maioria das proteínas são transportadas através de organelas membranosas e complexos de proteínas, sendo fundamentais para a morfogênese e função neuronal. Da mesma forma, as células epiteliais também apresentam regiões polarizadas, a apical e a basolateral, para as quais certas proteínas também precisam ser transportadas (Hirokawa, 1998).

Algumas cinesinas específicas, como a KIF1A, são expressas somente em neurônios e apresentam a sua expressão aumentada nestas estruturas, sendo esta proteína a responsável pelo transporte de precursores para a formação das vesículas sinápticas (Hirokawa, 1998). No estudo de Hirokawa (1998), camundongos *knockout* para o gene da KIF1A apresentaram distúrbios motores e sensoriais e uma importante redução na densidade dos terminais sinápticos e das vesículas sinápticas nos terminais nervosos, assim como também acumularam vesículas nos corpos celulares. Adicionalmente, foram observados focos de morte celular e degeneração secundária de axônios no SNC, confirmando o importante papel desta cinesina na função e sobrevivência neuronal (Hirokawa, 1998). Da mesma forma, outros autores também descrevem que quando existe uma disfunção no transporte axonal de proteínas, especialmente em neurônios motores, pode ocorrer a neurodegeneração, como no caso da alteração da expressão de uma outra cinesina, a *kinesin-5C*, onde é comprovada a

degeneração neuronal no cerebelo quando a expressão desta proteína é alterada (Kuźma-Kozakiewicz *et al.*, 2013).

Embora não saibamos se esta proteína é encontrada especificamente em neurônios entéricos, pelo fato de existirem várias cinesinas específicas para estes tipos neuronais, acreditamos que existe a possibilidade da *Kinesin heavy chain isoform 5C* ser encontrada nestas células. Como no duodeno observamos, na análise morfométrica, um aumento no valor médio das áreas dos corpos celulares dos neurônios IR-HuC/D, é possível que este processo tenha alguma relação com a subregulação de proteínas como a *kinesin heavy chain isoform 5C*, pois como esta proteína é responsável pelo transporte de proteínas sintetizadas no núcleo para o axônio, a sua subexpressão pode representar um acúmulo de proteínas nos corpos celulares, o que poderia ser uma das explicações para o aumento no valor das suas áreas nos neurônios IR-HuC/D, ou seja, o acúmulo de proteínas próximas ao núcleo.

A dose de 25 mg F/kg também pode comprometer processos intracelulares importantes como a fosforilação oxidativa, através da diminuição na expressão de proteínas como a *Cytochrome b-c1 Complex Subunit 2* (P32551). Esta proteína faz parte do complexo citocromo b-c1, um complexo membranoso proteico, localizado na membrana mitocondrial que funciona como um sítio para a transdução de energia para a síntese de ATP (Valkova-Valchanova *et al.*, 1998). Madigan *et al.* (2010) descrevem que a principal função do complexo citocromo b-c1 é transferir elétrons das quinonas ao citocromo c, o qual atua como um transportador, transferindo elétrons a outros citocromos, o que gera uma força próton motiva que é convertida em ATP pela ATPase, sendo este processo denominado fosforilação oxidativa. Dessa forma, a síntese de ATP por fosforilação oxidativa está associada a um estado energizado de membrana, sendo este estado estabelecido pelas reações de transporte de elétrons envolvendo carreadores de elétrons (Madigan *et al.*, 2010), como a proteína *Cytochrome b-c1 Complex Subunit 2*. Alterações na expressão dessas subunidades do complexo do citocromo b-c1 podem afetar desde o acoplamento de prótons até a transferência de elétrons no complexo b-c1, comprometendo o movimento eletrogênico de prótons (Tolkatchev, Yu e Yu, 1996). Portanto, a dose aguda de F pode comprometer vias intracelulares importantes.

Também observamos em nossa análise, várias proteínas histonas com alteração na sua expressão no grupo que recebeu a dose aguda. Alterações bioquímicas e estruturais na cromatina estão associadas com modificações pós-traducionais das histonas (Santoro e Dulac, 2015). As histonas em suas formas canônicas, ou seja, nas formas rudimentares que

permaneceram ativas durante o processo evolutivo, não são totalmente suficientes para manutenção da vida dos metazoários, e muitas foram substituídas ou deram origem a algumas histonas variantes, as quais são necessárias para a expressão de genes especiais (Banaszynski, Allis e Lewis, 2010). Estas variantes apresentam uma sequência peptídica altamente divergente, que permite mudanças na estrutura da cromatina e que também contribui com a função da cromatina. Entre estas variantes está a H3.3 (P84245), observada em nosso estudo, a qual confere à cromatina uma diferença sutil, porém importante, que causa alterações cruciais na capacidade de passar por modificações pós-traducionais, assim como também permite a interação com chaperonas e com moléculas “leitoras” da cromatina (Santoro e Dulac, 2015).

A incorporação de histonas variantes é particularmente importante em processos como a diferenciação e proliferação, meiose e programação nuclear (Maze *et al.*, 2014), sendo a H3.3 expressa durante todo o ciclo celular, apresentando uma deposição na cromatina independente da replicação, sendo que a sua entrega à cromatina depende de chaperonas (Lund, Collas e Delbarre, 2015). Está, portanto, envolvida parcialmente nos processos de transcrição ativa, como durante a oogênese, por exemplo, onde a H3.3 é incorporada na eucromatina, sendo mantida durante a meiose. Pouco é conhecido a respeito do papel principal desta histona, mas é descrito que a H3.3 é fundamental para o restabelecimento da conformação normal da cromatina após a fertilização, o que acredita-se ser um possível mecanismo que restabeleça o estado original da cromatina durante o processo de transição de gameta para zigoto (Maze *et al.*, 2014).

O principal papel descrito para as histonas é o “empacotamento” de DNA, porém, também é bastante descrito que estas proteínas conferem variações na estrutura da cromatina para assegurar processos dinâmicos da regulação transcricional em eucariontes (Maze *et al.*, 2014).

Modificações atividade-dependente na cromatina de neurônios contribuem dramaticamente para mudanças nos circuitos neuronais (Riccio, 2010), sendo possível que a atividade das histonas esteja envolvida em distúrbios que comprometem a função neuronal, assim como em patologias importantes, dado que existem trabalhos que descrevem que algumas mutações podem afetar diretamente enzimas modificadoras de cromatina, sugerindo que a regulação anormal de modificações na cromatina pode levar ao desenvolvimento até mesmo de câncer (Maze *et al.*, 2014). A histona H3.3 e suas chaperonas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer no SNC, onde foi registrada tanto a supraexpressão da H3.3

(Graber *et al.*, 1996), como também algumas mutações decodificadas pela H3.3 em glioblastomas pediátricos (Schwartzentruber *et al.*, 2012). Estes dados foram considerados importantes, pois agora considera-se também que alterações genéticas nas histonas direta ou indiretamente podem conduzir ao desenvolvimento de câncer tanto em animais quanto em seres humanos (Maze *et al.*, 2014).

É interessante também descrever que a H3.3 está presente tanto na eucromatina quanto na heterocromatina (Goldberg *et al.*, 2010), sendo que uma de suas chaperonas, a HIRA, medeia a deposição da H3.3 em promotores de gene (Elsaesser, Goldberg e Allis, 2010), sendo estes processos relacionados diretamente com mecanismos de sinalização celular e também parcialmente regulados pela atividade da proteína serina/treonina quinase 2 (PAK2) (Kang *et al.*, 2011). Portanto, existe um envolvimento desta histona H3.3 em vários processos importantes, em diferentes tipos celulares, sendo que a sua subregulação pode comprometer vias importantes.

Outras duas histonas também foram identificadas em nosso estudo, a *Histone H2A type 1-C* (P0C169) e a *Histone H2A.Z* (P0C0S7). Identificada como uma variante da histona H2A, a H2A.Z é encontrada em vários organismos, nos quais ocupa diferentes regiões no genoma, sendo encontrada em áreas promotoras ou em regiões reguladoras de genes ativos, assim como na heterocromatina constitutiva ou facultativa (Hardy e Robert, 2010). A H2A.Z é considerada a mais importante forma variante da histona H2A, estando significativamente conservada entre as espécies (Rangasamy *et al.*, 2003), apresentando tanto um papel positivo quanto negativo na transcrição gênica, sendo que em leveduras, está associada a quase 2/3 dos promotores de genes, sugerindo, nestes organismos, que apresenta um papel global na expressão gênica ao estabilizar a cromatina para a sua ativação (Guillemette e Gaudreau, 2006). Esta histona também apresenta um papel importante em estabelecer o ambiente necessário para a nova cromatina, permitindo alterações na expressão gênica e, portanto, na diferenciação de células tronco embrionárias (Kafer, Carlton e Lehnert, 2015). A incorporação das variantes das histonas dentro dos nucleossomos agrega uma característica especial à cromatina, contribuindo com a função celular e com a regulação gênica (Svotelis *et al.*, 2011). A alteração da expressão da H2A.Z pode comprometer o desenvolvimento de processos como a segregação cromossômica e a mitose (Rangasamy *et al.*, 2003).

Outros mecanismos que também envolvem a H2A.Z, como a sua acetilação, também são fundamentais para a manutenção da integridade do genoma e dos limites da heterocromatina, participando da ativação gênica (Svotelis *et al.*, 2011). A incorporação da

variante da histona H2A.Z dentro dos cromossomos promove a ativação da cromatina, sendo confirmada a sua presença em áreas ativas dos cromossomos da drosófila (Leach *et al.*, 2000). A H2A.Z altera a estabilidade do nucleossomo, é parcialmente redundante com o remodelamento de nucleossomos e está envolvida no controle da transcrição (Redon *et al.*, 2002), sendo especialmente importante para a estabilidade dos promotores da ativação de vários genes (Santisteban, Kalashnikova e Smith, 2000), assim como também para a ativação da transcrição de outros genes reguladores do ciclo celular (Dhillon *et al.*, 2006).

Outra variante da histona H2A, a *H2A 1C* (P0C169) também foi identificada com a expressão subregulada em nosso estudo. A *H2A 1C* apresenta algumas modificações pós-traducionais em relação à H2A, contendo uma treonina na posição 16 e uma alanina na posição 40, produzindo uma compactação um pouco reduzida no centro do nucleossomo como diferença principal (Jagannathan *et al.*, 2010).

No presente estudo verificamos a alteração na expressão de várias histonas, sendo que a importância destes achados no fato de que a ativação gênica pode ser comprometida. Dessa forma, embora a dose de 25 mgF/kg tenha sido aplicada uma única vez e permanecido no organismo por apenas duas horas, é possível que tenha comprometido a homeostase intracelular, especialmente, os processos de transcrição.

Dentro das inúmeras vias importantes da manutenção intracelular, os complexos da ATP sintase da mitocôndria catalisam a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato, utilizando o gradiente eletroquímico prótônico gerado pela cadeia respiratória (Giraud e Velours, 1997). A ATP sintase mitocondrial é considerada um motor molecular que transforma o fluxo de prótons em um gradiente químico para a fosforilação do ADP (Mueller, 2000), sendo formada por uma porção denominada como F_1 , hidrofílica e extramembranosa, a qual é necessária para a catálise da enzima, enquanto apresenta também uma outra parte hidrofóbica e intramembranosa, F_0 , envolvida na translocação de prótons associada com a síntese de ATP e com a atividade da ATPase (Noji *et al.*, 1997).

Inicialmente foi descrito que F_1 é composta por 5 subunidades distintas (Amzel e Pedersen, 1983). Porém descobriu-se em leveduras, uma sexta unidade (Giraud e Velours, 1994), a qual despertou bastante interesse devido ao seu papel na translocação de prótons e a síntese de ATP (Mendel-Hartvig e Capaldi, 1991). No caso das leveduras, o comprometimento do gene responsável por codificar a subunidade delta conduz à ausência da atividade da ATPase, desestruturação da porção F_1 e diminuição do citoplasma das células, conduzindo, no caso as leveduras, a levarem o dobro do tempo médio necessário normalmente

para completar o processo de fermentação, demonstrando a importância desta subunidade (Giraud e Velours, 1997).

Em nossa análise, observamos uma subregulação da *ATP synthase subunit delta, mitochondrial* (P35434), assim como também da *ATP synthase subunit beta mitochondrial* (P10719). Da mesma maneira, a subunidade β reside no domínio F1, o motor molecular que dirige a síntese de ATP (Noji et al., 1997), o qual apresenta sítios catalíticos sendo que 3 desses sítios residem na subunidade β (Abrahams et al., 1994), que interagem entre si durante a renovação enzimática, sendo este processo mediado por alterações conformacionais nas subunidades F1 (Liang e Ackerman, 1996).

Um estudo genético em leveduras, com o objetivo de avaliar os efeitos de mutações na subunidade β , identificou processos em que alterações estruturais na subunidade β geravam uma deficiência na atividade da ATPase, bloqueio da catálise de F1, e até mesmo perda da atividade hidrolítica do ATP (Liang e Ackerman, 1996).

Ao ser inativada a expressão do gene que codifica a subunidade β na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, verificou-se que não ocorre a montagem da ATP sintase, existe uma diminuição pela metade na taxa respiratória e a síntese de ATP relacionada à atividade respiratória é comprometida; como consequência da falta de ATP sintase, a morfologia mitocondrial é afetada (Lapaille et al., 2010).

Dessa forma, a subregulação de ambas proteínas, *ATP synthase subunit delta e beta*, como verificada em nosso estudo, pode comprometer processos intracelulares importantes, dado que estas duas proteínas controlam a própria atividade da ATPase, fundamental para a manutenção do metabolismo energético celular.

A *Adenine phosphoribosyltransferase* (P36972) também foi outra proteína envolvida com o metabolismo encontrada com a expressão alterada. *Adenine phosphoribosyltransferase* é a enzima que catalisa a conversão da adenina em adenosina monofosfato (UNIPROT). É bastante descrito na literatura que a deficiência desta enzima resulta na conversão da adenina à 2,8 diidroxiadenina ao invés da reação de recuperação purínica (Brilland et al., 2015). A 2,8 diidroxiadenina é um composto altamente insolúvel, que precipita e forma cristais nos túbulos renais, conduzindo à nefropatia cristalina e falência renal progressiva (Sharma et al., 2015).

Além do processo de falência renal, a *Adenine phosphoribosyltransferase* tem sua expressão reduzida na substância negra de amostras obtidas de pacientes com Doença de Parkinson, na qual o metabolismo purínico é comprometido (Garcia-Esparcia et al., 2015).

Nucleotídeos participam de uma variedade de vias metabólicas cruciais incluindo o metabolismo energético e a sinalização celular, portanto, dado que a *Adenine phosphoribosyltransferase* catalisa a formação do AMPc, o qual é um nucleotídeo purínico, torna-se evidente a possibilidade do envolvimento desta proteína no desenvolvimento da doença de Parkinson, como comprovado no trabalho de Garcia-Esparcia *et al.* (2015), através da diminuição da sua expressão, dentre outras proteínas envolvidas no metabolismo purínico.

Portanto, é possível que a subexpressão desta proteína possa ter algum envolvimento em mecanismos neuronais e contribua com outras proteínas que aqui foram descritas, para explicar as alterações em neurônios entéricos, especialmente neste caso, em vias envolvendo o metabolismo energético.

Também observamos uma alteração na expressão da enzima *Citrate synthase mitochondrial* (Q8VHF5), a qual catalisa a condensação do oxaloacetato e da acetil-coenzima A, produzindo citrato, sendo este o primeiro passo do ciclo do ácido tricarboxílico (UNIPROT). Alterações nas enzimas do ciclo do ácido tricloroacético têm sido exploradas no campo da oncologia, dado que esta enzima se encontra suprarregulada em vários tipos de câncer (Schlichtholz *et al.*, 2005; Kusao, Troelstrup e Shiramizu, 2008), como no carcinoma ovariano, sendo que neste estudo os autores ainda descrevem que a modulação da sua expressão pode influenciar a proliferação celular, invasão, migração e quimiosensibilidade na linhagem de células de câncer ovariano (Chen *et al.*, 2014).

A atividade da *Citrate synthase* é frequentemente utilizada como um índice do conteúdo mitocondrial nos tecidos, pois se mantém altamente constante na mitocôndria, sendo considerada um marcador confiável do conteúdo intracelular desta organela (Amadoro *et al.*, 2014). Da mesma forma, a sua atividade também pode ser utilizada como um marcador do metabolismo cerebral e do conteúdo mitocondrial, existindo inúmeras evidências que associam a disfunção mitocondrial ao comprometimento da plasticidade sináptica na patogênese da doença de Alzheimer (Batlevi e La Spada, 2011).

Com o objetivo de avaliar o conteúdo mitocondrial em neurônios, ao ser avaliada a atividade da *Citrate synthase* em culturas de células do hipocampo infectadas com a NH₂tau, sendo esta um fragmento da proteína tau, a qual é descrita como principal causadora da degeneração neuronal observada na doença de Alzheimer, verificou-se uma redução de 50% na atividade da *Citrate synthase*, sendo esta diminuição em concordância com o grande declínio na quantidade de proteínas mitocondriais confirmado por *western blotting* (Amadoro *et al.*, 2014). Estes resultados foram considerados bastante importantes, pois foi possível

concluir que a biologia mitocondrial é comprometida no caso da doença de Alzheimer pela presença da proteína NH₂htau, sendo estes achados correlacionados especialmente aos déficits sinápticos.

Portanto, a alteração na expressão dessa proteína na análise proteômica do duodeno nos oferece um indício da possibilidade de que o F também possa ser tóxico aos neurônios entéricos, o que também poderia comprometer a sua função.

Envolvida na via glicolítica, a enzima *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (B1WBQ8) também foi identificada com a expressão subrrregulada, sendo esta uma proteína que apresenta um papel fundamental na glicólise, catalisando a conversão reversível da gliceraldeído-3-fosfato a 1,3 bifosfoglicerato em uma reação que é acompanhada pela redução de NAD⁺ a NADH (Nakajima *et al.*, 2007). Além desta importante função na glicólise, alguns estudos têm mostrado que esta enzima também participa de outros processos não relacionados à glicólise, como a fusão de membranas (Morero *et al.*, 1985), arquitetura dos microtúbulos (Huitorel e Pantaloni, 1985), atividade de fosfotransferase/reações com a proteína quinase (Reiss *et al.*, 1996), exportação de RNA nuclear (Ognibene *et al.*, 2014) e replicação/reparo do DNA (Vollberg, Cool e Sirover, 1987).

Também são relatados outros estudos que reportam a *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* como um componente importante da expressão de genes observados nos processos de apoptose e como parte do fenótipo celular de distúrbios neuronais relacionadas ao processo de envelhecimento, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Sirover, 1999). No caso da doença de Alzheimer, a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* constitui um alvo terapêutico, pois como esta proteína se associa à proteína β-amilóide, considerada a maior causadora desta patologia, ao interferir na sua atividade, consequentemente a β-amilóide também é afetada.

É descrito ainda que a *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* está relacionada à apoptose induzida pelo envelhecimento em neurônios cerebelares, nos quais esta proteína apresenta uma supraexpressão, confirmando mais uma vez a sua associação a processos neurodegenerativos (Sunaga *et al.*, 1995). Portanto, embora em processos neurodegenerativos essa proteína seja encontrada suprarregulada, e em nosso estudo tenhamos observado sua expressão subrrregulada, não acreditamos que esta mesma via possa acometer os neurônios entéricos. Porém, como esta enzima também se relaciona a inúmeros outros importantes processos intracelulares, como à composição da arquitetura dos microtúbulos, comprometendo o citoesqueleto, acreditamos que possa existir uma correlação entre esta

subexpressão e um comprometimento dos neurônios entéricos, o que poderia, por exemplo, alterar a sua morfologia como foi observado.

A biossíntese de proteínas envolve os processos de iniciação, alongamento e terminação. O alongamento é catalisado pelo *elongation factor 1 (eEF1) macromolar complex*, o qual consiste das subunidades α , β , γ e δ (eEF1 α , eEF1 β , eEF1 γ e eEF1 δ), as quais são altamente expressas em células eucariontes. Neste processo de alongamento, o eEF1 catalisa a transferência do aminoacil-RNA transportador aos ribossomos, mediado pela hidrólise de guanosina trifosfato (GTP), o que ocorre da seguinte forma: o complexo formado por GDP- eEF1 α é convertido em GTP-eEF1 α através da hidrólise do GTP mediada pelo complexo eEF1 $\beta\gamma\delta$ (Le Sourd *et al.*, 2006). Especificamente, o *Elongation factor 1-gamma* (Q68FR6), observado com a expressão subregulada em nosso estudo, é necessário para a troca de nucleotídeos entre as subunidades α e β , porém a sua ausência não afeta o processo de tradução da síntese proteica (Sheu e Traugh, 1997). Porém, outros autores verificaram que o eEF1 γ forma parte do complexo de alongamento com as subunidades β e δ no retículo endoplasmático de fibroblastos, assim como também ocorre a sua supraexpressão em células tumorais no esôfago (Mimori *et al.*, 1996), intestino (Chi, Jones e Frazier, 1992) e pâncreas (Lew *et al.*, 1992), sugerindo que altere o equilíbrio redox nestas células, aumentando a agressividade do tumor (Mimori *et al.*, 1996).

Alguns estudos também descrevem a interação do eEF1 γ com o citoesqueleto (Le Sourd *et al.*, 2006), receptores de membrana da dopamina (Cho *et al.*, 2003) e a RNA-polimerase (Corbi *et al.*, 2010). Portanto, dado que sua expressão estava subregulada em nosso estudo, é possível que a síntese proteica possa ser comprometida, especialmente pelo fato de que durante a síntese proteica o eEF1 γ permite a ancoragem do complexo eEF1 β à membrana do retículo endoplasmático rugoso (Sanders *et al.*, 1996) ou ao citoesqueleto, especificamente em tubulinas (Janssen e Möller, 1988). Especialmente esta atuação sobre o citoesqueleto pode conferir alterações morfológicas importantes, como as observadas nos nossos dados obtidos com a análise da inervação entérica.

A *Polyubiquitin-C* (Q63429), também foi encontrada com a expressão subregulada em nosso estudo. Esta proteína apresenta-se tanto na forma covalentemente ligada à outra proteína quanto na forma livre, sendo que quando covalentemente ligada, está conjugada a proteínas alvo como um monômero ou um polímero, ligada através de resíduos Lis ou via um iniciador Metil. Cadeias de poliubiquitinas quando ligadas à outras proteínas apresentam diferentes funções dependendo do resíduo Lis envolvido: o Lis-6, se relaciona ao

reparo no DNA; Lis-11, está envolvido da degradação do retículo endoplasmático rugoso e na regulação do ciclo celular; Lis-29 está envolvido na degradação lisosomal; Lis-33 está envolvido na modificação de proteínas quinase; Lis-48, degradação de proteínas via proteossomo; Lis-63, endocitose, respostas a danos ao DNA e sinalização que conduz à ativação do fator de transcrição NF-Kappa- β (UNIPROT).

É descrito que no plexo mioentérico, a proteína poliubiquitina está envolvida no controle da proliferação celular, diferenciação e regulação da expressão gênica em neurônios (Hagl *et al.*, 2005). Em nosso estudo, a subexpressão da poliubiquitina em comparação ao grupo controle também nos oferece um indício de que os neurônios entéricos possam ter sido afetados pela alta dose de F.

Em estudo realizado com amostras de biópsias coletadas de pacientes com câncer colón-retal foi verificada uma supraexpressão desta proteína em todas as amostras analisadas, sendo descrito que durante a tumorigênese, esta proteína é regulada pela fosforilação e pode se ligar e regular outras moléculas com propriedades oncogênicas (Alvarez-Chaver *et al.*, 2011), sendo ainda associada com a perda da adesão celular e uma diminuição nos níveis de apoptose (Niemantsverdriet *et al.*, 2008).

Todas estas informações aqui descritas a respeito da alteração da expressão das proteínas em decorrência da exposição à dose aguda de 25 mg F/kg oferecem indícios importantes de que o TGI, especialmente o duodeno, pode ser grandemente afetado pelo F. Da mesma forma, acreditamos que o fato de inúmeras proteínas que apresentam papéis importantes relacionados ao funcionamento neuronal, terem apresentado a sua expressão alterada também oferece um forte indício da neurotoxicidade do F sobre o SNE.

Em síntese, a exposição ao F, tanto de forma aguda como de forma crônica, alterou significativamente o perfil de expressão proteica no duodeno de ratos. Esta alteração foi mais acentuada que a observada em estudos proteômicos conduzidos em outros órgãos, como rins (Xu *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2013), cérebro (Ge *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2014) e fígado (Pereira, Leite Ade, *et al.*, 2013; Pereira, Leite, *et al.*, 2013), mesmo com doses e concentrações em exposição similares. Acreditamos que este significativo efeito do F na expressão de proteínas do duodeno, quando comparado aos demais órgãos, seja devido ao fato de que 75% da absorção do F ocorre no intestino, especialmente nas porções proximais (Nopakun, Messer e Voller, 1989), e que quando uma dose de F é ingerida, as células na parede intestinal são expostas a uma concentração maior de

F que as células dos demais órgãos, as quais entrarão em contato apenas com o F que for absorvido (Buzalaf e Whitford, 2011).

Quando os animais foram expostos cronicamente à menor concentração de F (10 ppm), a maioria das proteínas com alteração de expressão encontrava-se suprarregulada em relação ao controle, enquanto que na exposição à maior concentração e dose de F (50 ppm na água ou dose aguda de 25 mgF/kg), a maioria das proteínas com alteração de expressão encontrava-se subregulada no grupo exposto em relação ao controle. Estes dados apontam para um estímulo à síntese proteica mediante exposição às doses baixas de F e para um prejuízo na síntese proteica nas altas exposições ao F (50 ppm F e 25 mgF/kg). Os processos biológicos mais afetados pelo F mediante exposição crônica a 10 ppm F e 50 ppm F através da água de beber foram o processo metabólico de nucleotídeos de piridina e a polimerização de proteínas (especialmente aquelas relacionadas ao citoesqueleto). Já para a exposição aguda ao F, os processos biológicos mais afetados envolviam a produção de energia, o que também nos apontam importantes mecanismos que podem ser comprometidos pela toxicidade do F no TGI.

Conclusões

7. Conclusões

Em virtude dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que tanto a exposição crônica quanto aguda ao F causam os seguintes efeitos sobre a **inervação do plexo mioentérico**:

- Diminui significativamente a densidade da população geral de neurônios no jejuno e no íleo após a exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm F;
- Diminui significativamente a densidade da população geral de neurônios no jejuno após a exposição aguda à dose de (25 mg F/kg);
- Diminui significativamente a densidade de neurônios nitrérgicos no duodeno e jejuno após a exposição crônica à concentração de 50 ppm F;
- Diminui significativamente, nos três segmentos analisados (duodeno, jejuno e íleo) a densidade da população neuronal nitrérgica após a exposição aguda à dose de 25 mg F/kg;
- Diminui significativamente, no duodeno, o valor médio das áreas dos corpos celulares da população geral de neurônios após a exposição crônica na concentração de 50 ppm F;
- Aumenta significativamente, no duodeno e no íleo o valor médio das áreas dos corpos celulares da população geral de neurônios após a exposição à dose aguda de 25 mg F/kg;
- Diminui significativamente, no duodeno, o valor médio das áreas dos corpos celulares da população neuronal nitrérgica após a exposição crônica na concentração de 50 ppm F;
- Diminui significativamente, no duodeno e íleo, o valor médio das áreas dos corpos celulares da população neuronal nitrérgica após a exposição aguda à dose de 25 mg F/kg; enquanto aumenta no jejuno;
- Aumenta significativamente, no duodeno, o valor médio das áreas das varicosidades IR-CGRP após a exposição crônica à concentração de 10 ppm F e diminui após a exposição à concentração de 50 ppm F; enquanto no íleo aumento esse valor para as concentrações de 10 e 50 ppm F; e no jejuno permanece inalterado;
- Diminui significativamente, no íleo, o valor médio das áreas das varicosidades IR-CGRP após a exposição aguda à dose de 25 mg F/kg, enquanto nos outros segmentos esse valor médio permaneceu inalterado;

- Aumenta significativamente, no duodeno, o valor médio das áreas das varicosidades IR-VIP após a exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm F; enquanto no jejuno e no íleo, aumenta estes valores apenas após a exposição à concentração de 50 ppm F;
- Aumenta significativamente, no jejuno, o valor médio das áreas das varicosidades IR-VIP após a exposição à dose aguda de 25 mg F/kg; enquanto no íleo diminui este valor;
- Aumenta significativamente, no duodeno, o valor médio das áreas das varicosidades IR-ChAT após a exposição crônica à concentração de 50 ppm F e diminui para a concentração de 10 ppm F. No jejuno, aumenta significativamente este valor após a exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm de F; enquanto no íleo, diminui para a concentração de 10 ppm F e aumenta significativamente o valor para a concentração de 50 ppm F.
- Diminui significativamente, no duodeno e no íleo, o valor médio das áreas das varicosidades IR-ChAT após a exposição à dose aguda de 25 mg F/kg, enquanto no jejuno este valor permanece inalterado;
- Aumenta significativamente, o valor médio das áreas das varicosidades IR-SP nos 3 segmentos do intestino delgado após a exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm F;
- Aumenta significativamente, nos três segmentos analisados (duodeno, jejuno e íleo) o valor médio das áreas das varicosidades IR-SP após a exposição à dose aguda de 25 mg F/kg.

Quanto à **morfologia da parede intestinal**, o F:

- Não altera a espessura total da parede intestinal do duodeno após a exposição crônica;
- Diminui significativamente a espessura total da parede intestinal no jejuno após a exposição crônica à concentração de 50 ppm F;
- Aumenta significativamente a espessura total da parede intestinal no íleo após a exposição crônica à concentração de 10 e 50 ppm F;
- Aumenta significativamente a espessura da túnica muscular do duodeno e do jejuno após a exposição crônica à concentração de 50 ppm F;

-
- Aumenta significativamente a espessura da túnica muscular do íleo após a exposição crônica às concentrações de 10 e 50 ppm F;
 - Aumenta significativamente a espessura total da parede intestinal do duodeno após a exposição à dose aguda à dose de 25 mg F/kg;
 - Diminui significativamente a espessura da túnica muscular do duodeno após a exposição à dose aguda à dose de 25 mg F/kg;
 - Diminui significativamente tanto a espessura total da parede intestinal quanto a espessura da túnica muscular do jejuno e do íleo após a exposição à dose aguda à dose de 25 mg F/kg.

Após a realização da **análise proteômica** do duodeno de ratos foi observado que o F:

- Altera a expressão de 229 proteínas após a exposição crônica à concentração de 10 ppm F, sendo que destas proteínas a sua maioria apresentou a sua expressão suprarregulada no grupo que recebeu a concentração de 10 ppm F em relação ao grupo controle, sendo o processo biológico mais afetado o metabolismo da piridina;
- Altera a expressão de 284 proteínas após a exposição crônica à concentração de 50 ppm F, sendo que destas proteínas a sua maioria apresentou a sua expressão subrregulada no grupo que recebeu a concentração de 50 ppm F em relação ao grupo controle, sendo o processo biológico mais afetado a polimerização proteica;
- Altera a expressão de 356 proteínas após a exposição aguda à dose de 25 mg F/kg, sendo que destas proteínas a sua maioria apresentou a sua expressão subrregulada no grupo que recebeu a dose de 25 mg F/Kg em relação ao grupo controle, sendo o processo metabólico mais afetado a geração de precursores e energia.

Considerando todos os itens acima podemos concluir de uma forma geral que existem indícios importantes de que o F possa induzir à alterações na atividade neuronal entérica, com um padrão similiar ao observado em várias neuropatias entéricas; assim como as alterações morfológicas nas varicosidades IR-VIP/IR-SP/IR-CGRP podem significar que o F induz a processos inflamatórios no intestino delgado. Da mesma forma acreditamos que a exposição às baixas concentrações de F (10 ppm F) induzem a um estímulo à síntese proteica, enquanto as altas exposições ao F (50 ppm F e 25 mgF/kg) geram um prejuízo na síntese proteica.

Referências

8. Referências

- ABRAHAMSON, J. P. et al. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. **Nature**, v. 370, n. 6491, p. 621-8, Aug 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8065448> >.
- ADAMS, A. E. et al. Isoform-specific complementation of the yeast *sac6* null mutation by human fimbrin. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 69-75, Jan 1995. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7799970> >.
- ADAMS, D. R.; RON, D.; KIELY, P. A. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 22, 2011. ISSN 1478-811X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978545> >.
- ADEGHATE, E. et al. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 6, p. 1172-9, Jun 2003. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861383> >.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634793> >.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, A. **Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine**. SERVICES, U. S. D. O. H. A. H. 2003.
- AGRAWAL, A. et al. ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 5788-96, May 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670284> >.
- AHMED, Z. et al. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 55, n. 7, p. 687-700, Jul 2007. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341475> >.
- AIMI, Y. et al. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 53, n. 2, p. 553-60, Mar 1993. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684113> >.
- AITKEN, A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 673-80, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864699> >.
- AITKEN, A. et al. Kinase and neurotransmitters. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 594, Apr 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1970123> >.
- AKAMATSU, W. et al. The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 12, p. 4625-30, Mar 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764704> >.
- _____. Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 17, p. 9885-90, Aug 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449789> >.
- AKINIWA, K. Re-examination of acute toxicity of fluoride. **Fluoride**, v. 30, n. 2, p. 89-104, 1997.

- ALAM, R. et al. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol. **J Biochem**, v. 116, n. 2, p. 416-25, Aug 1994. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822263> >.
- ALBORGHETTI, M. R. et al. Structural analysis of intermolecular interactions in the kinesin adaptor complex fasciculation and elongation protein zeta 1/ short coiled-coil protein (FEZ1/SCOCO). **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76602, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116125> >.
- ALEX, P.; GUCEK, M.; LI, X. Applications of proteomics in the study of inflammatory bowel diseases: Current status and future directions with available technologies. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 4, p. 616-29, Apr 2009. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18844215> >.
- ALLAIN, P.; GAUCHARD, F.; KRARI, N. Enhancement of aluminum digestive absorption by fluoride in rats. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v. 91, n. 2, p. 225-31, Feb 1996. ISSN 1078-0297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832914> >.
- ALLESCHER, H. D. et al. Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. **Am J Physiol**, v. 271, n. 4 Pt 1, p. G568-74, Oct 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897874> >.
- _____. Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. **Am J Physiol**, v. 262, n. 4 Pt 1, p. G695-702, Apr 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1348907> >.
- ALMEIDA, P. S.; PENNA, F. J. Chronic intestinal pseudo-obstruction in children - report of seven cases. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 6, p. 453-457, 2000.
- ALVAREZ-CHAUVER, P. et al. Selection of putative colorectal cancer markers by applying PCA on the soluble proteome of tumors: NDK A as a promising candidate. **J Proteomics**, v. 74, n. 6, p. 874-86, May 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385632> >.
- ALVES, E. P. et al. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. **Nutr Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 43-51, Feb 2010. ISSN 1476-8305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132654> >.
- AMADORO, G. et al. AD-linked, toxic NH2 human tau affects the quality control of mitochondria in neurons. **Neurobiol Dis**, v. 62, p. 489-507, Feb 2014. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411077> >.
- AMARA, S. G. et al. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, v. 298, n. 5871, p. 240-4, Jul 1982. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283379> >.
- AMIRA, S.; SOUFANE, S.; GHARZOULI, K. Effect of sodium fluoride on gastric emptying and intestinal transit in mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 57, n. 1, p. 59-64, Aug 2005. ISSN 0940-2993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16089320> >.
- AMZEL, L. M.; PEDERSEN, P. L. Proton atpases: structure and mechanism. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 801-24, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225377> >.

Referências

-
- ANDERSON, K. D. et al. Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells in vitro. **Exp Neurol**, v. 168, n. 2, p. 250-8, Apr 2001. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259113> >.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 2317-6326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569979> >.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v. 43, n. 3, p. 521-31, Aug 1999. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690324> >.
- ANKLE, M.; GROPPPEL, B.; MASAOKA, T. Recent progress in exploring the essentiality of the non-metallic ultratrace elements fluorine and bromine to the nutrition of animals and man. **Biomed Res Trace Elements**, v. 16, n. 3, p. 177-182, 2005.
- ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 3, p. 367-73, Aug 2001. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461774> >.
- ARCISZEWSKI, M. B.; BARABASZ, S.; CAŁKA, J. Immunohistochemical localization of galanin receptors (GAL-R1, GAL-R2, and GAL-R3) on myenteric neurons from the sheep and dog stomach. **Ann Anat**, v. 190, n. 4, p. 360-7, 2008. ISSN 0940-9602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18595677> >.
- ARCISZEWSKI, M. B. et al. Expression of vasoactive intestinal polypeptide, substance P and neuropeptide Y in jejunal enteric nerves is altered in rabbits suffering from long term *Trichinella spiralis* infection: an immunohistochemical study. **Veterinari Medicine**, v. 54, n. 12, 2009.
- ASSIS et al. Mecanismos biológicos e influência de fatores ambientais na fluorose dentária e a participação do flúor na prevenção da cárie. Revisão de Literatura. **Rev. FOB**, v. 7, n. 3/4, p. 63-70, 1999.
- AUBE, A. C. et al. Altered myoelectrical activity in noninflamed ileum of rats with colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid. **Neurogastroenterol Motil**, v. 11, n. 1, p. 55-62, Feb 1999. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087535> >.
- AUBÉ, A. C. et al. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**, v. 55, n. 5, p. 630-7, May 2006. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236773> >.
- AUGENSTEIN, W. L. et al. Fluoride ingestion in children: a review of 87 cases. **Pediatrics**, v. 88, n. 5, p. 907-12, Nov 1991. ISSN 0031-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1945630> >.
- AYDIN, G. et al. Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations. **J Appl Toxicol**, v. 23, n. 6, p. 437-46, 2003 Nov-Dec 2003. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635268> >.
- AZEVEDO, J. F. et al. Análise morfológica da parede intestinal do íleo de ratos submetidos à intensa carência de proteínas. **Arq. Cienc. Vet. Zool. Unipar**, v. 10, n. 2, 2007.
-

- BAGYÁNSZKI, M. et al. Individual distribution and colocalization of nitric oxide synthase with vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y in the developing human fetal small intestine. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 1-2, p. 17-23, 2002.
- _____. Chronic alcohol consumption induces an overproduction of NO by nNOS- and iNOS-expressing myenteric neurons in the murine small intestine. **Neurogastroenterol Motil**, v. 23, n. 6, p. e237-48, Jun 2011. ISSN 1365-2982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470341> >.
- BALDWIN, H. B. The acute toxicity of sodium fluoride. **Journal of American Chemical Society**, v. 21, p. 517-521, 1899.
- BALTHAZAR, E. J.; GORDON, R.; HULNICK, D. Ileocecal tuberculosis: CT and radiologic evaluation. **AJR Am J Roentgenol**, v. 154, n. 3, p. 499-503, Mar 1990. ISSN 0361-803X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2106212> >.
- BANASZYNSKI, L. A.; ALLIS, C. D.; LEWIS, P. W. Histone variants in metazoan development. **Dev Cell**, v. 19, n. 5, p. 662-74, Nov 2010. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074717> >.
- BARAMI, K. et al. Hu protein as an early marker of neuronal phenotypic differentiation by subependymal zone cells of the adult songbird forebrain. **J Neurobiol**, v. 28, n. 1, p. 82-101, Sep 1995. ISSN 0022-3034. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586967> >.
- BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 319-33, Nov 2010. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650267> >.
- BARTHO, L.; HOLZER, P. The inhibitory modulation of guinea-pig intestinal peristalsis caused by capsaicin involves calcitonin gene-related peptide and nitric oxide. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 353, n. 1, p. 102-9, Dec 1995. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8750923> >.
- BARTHÓ, L.; HOLZER, P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. **Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 1-32, Sep 1985. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423912> >.
- BARTHÓ, L.; LEMBECK, F.; HOLZER, P. Calcitonin gene-related peptide is a potent relaxant of intestinal muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 135, n. 3, p. 449-51, Mar 1987. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3495448> >.
- BARTHÓ, L.; SZOLCSÁNYI, J. The site of action of capsaicin on the guinea-pig isolated ileum. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 305, n. 1, p. 75-81, Oct 1978. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31571> >.
- BASELT, R. C. **Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man**. 7th edition. Foster City, CA: Biomedical Publications, 2004.
- BATLEVI, Y.; LA SPADA, A. R. Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. **Neurobiol Dis**, v. 43, n. 1, p. 46-51, Jul 2011. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887789> >.
- BAUDRY, C. et al. Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. **J Physiol**, v. 590, n. Pt 3,

Referências

-
- p. 533-44, Feb 2012. ISSN 1469-7793. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124147> >.
- BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. **J Physiol**, v. 24, n. 2, p. 99-143, May 1899. ISSN 0022-3751. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16992487> >.
- BECK, M. et al. ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue Res**, v. 338, n. 1, p. 37-51, Oct 2009. ISSN 1432-0878. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19711100> >.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944624> >.
- BEEK, W. P. et al. Substance P receptor expression in patients with inflammatory bowel disease. Determination by three different techniques, i.e., storage phosphor autoradiography, RT-PCR and immunohistochemistry. **Neuropeptides**, v. 41, n. 5, p. 301-6, Oct 2007. ISSN 0143-4179. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602742> >.
- BELAI, A. et al. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. **Gut**, v. 40, n. 6, p. 767-74, Jun 1997. ISSN 0017-5749. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245931> >.
- BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Selective damage of intrinsic calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive enteric nerve fibers in streptozotocin-induced diabetic rats. **Gastroenterology**, v. 92, n. 3, p. 730-4, Mar 1987. ISSN 0016-5085. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493187> >.
- _____. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. **Dig Dis Sci**, v. 44, n. 8, p. 1579-87, Aug 1999. ISSN 0163-2116. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492135> >.
- _____. Pattern of distribution and co-localization of NOS and ATP in the myenteric plexus of human fetal stomach and intestine. **Neuroreport**, v. 11, n. 1, p. 5-8, Jan 2000. ISSN 0959-4965. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683820> >.
- BENARROCH, E. E. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. **Neurology**, v. 69, n. 20, p. 1953-7, Nov 2007. ISSN 1526-632X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998487> >.
- BENNETT, A. A pharmacological investigation of human isolated ileum. **Nature**, v. 208, n. 5017, p. 1289-91, Dec 1965. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4380575> >.
- BERTHOUD, H. R.; JEDRZEJEWSKA, A.; POWLEY, T. L. Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. **J Comp Neurol**, v. 301, n. 1, p. 65-79, Nov 1990. ISSN 0021-9967. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706359> >.
- BHASKAR; KUMARI, N.; GOYAL, N. Cloning, characterization and sub-cellular localization of gamma subunit of T-complex protein-1 (chaperonin) from Leishmania donovani. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 429, n. 1-2, p. 70-4, Dec 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137535> >.
-

BHATNAGAR, C.; BHATNAGAR, M.; REGAR, B. Fluoride-induced histopathological changes in gill, kidney, and intestine of teleost, *Labeo rohita*. **Fluoride**, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2007.

BHATNAGAR, M. et al. Biochemical changes in brain and other tissues of young adult female mice from fluoride in their drinking water. **Fluoride**, v. 39, n. 4, p. 280-284, 2006.

_____. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. **Indian J Exp Biol**, v. 40, n. 5, p. 546-54, May 2002. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622200> >.

BIELEFELDT, K.; CONKLIN, J. L. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. **Dig Dis Sci**, v. 42, n. 5, p. 878-84, May 1997. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9149037> >.

BINDEA, G.; GALON, J.; MLECNIK, B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 5, p. 661-3, Mar 2013. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325622> >.

BINDEA, G. et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, v. 25, n. 8, p. 1091-3, Apr 2009. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19237447> >.

BISHOP, A. E. et al. Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 79, n. 5 Pt 1, p. 853-60, Nov 1980. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7419008> >.

BOECKXSTAENS, G. E. et al. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 256, n. 2, p. 441-7, Feb 1991. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671594> >.

_____. Evidence for a differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide by nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 318, p. 107-15, 1992 Jul-Aug 1992. ISSN 0003-9780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463368> >.

BOLOGNANI, F. et al. Dendritic localization of the RNA-binding protein HuD in hippocampal neurons: association with polysomes and upregulation during contextual learning. **Neurosci Lett**, v. 371, n. 2-3, p. 152-7, Nov 2004. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519747> >.

BOST, R. O.; SPRINGFIELD, A. Fatal hydrochloric acid ingestion: a suicide case report. **J Anal Toxicol**, v. 19, p. 535-536, 1995.

BOUAZIZ, H. et al. Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. **Exp Toxicol Pathol**, v. 58, n. 5, p. 339-49, Apr 2007. ISSN 0940-2993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270411> >.

BOZA-MORÁN, M. G. et al. Decay in survival motor neuron and plastin 3 levels during differentiation of iPSC-derived human motor neurons. **Sci Rep**, v. 5, p. 11696, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26114395> >.

Referências

BOZELLI, C. E. et al. [Clinical and epidemiological profile of patients with Chagas disease at the University Hospital in Maringá, Paraná, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 22, n. 5, p. 1027-34, May 2006. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680355> >.

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

BRAIN, L.; WILKINSON, M. Subacute cerebellar degeneration associated with neoplasms. **Brain**, v. 88, n. 3, p. 465-78, Sep 1965. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5890520> >.

BRAIN, S. D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. **Immunopharmacology**, v. 37, n. 2-3, p. 133-52, Oct 1997. ISSN 0162-3109. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403332> >.

BRASIL. **Lei nº 6.050, de 24 de maio de 1974. Dispõe sobre a obrigatoriedade da fluoretação das águas em sistema de abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília-Brasil 1974.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-70, Oct 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700301> >.

BREHMER, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. **Histochem Cell Biol**, v. 125, n. 5, p. 557-65, May 2006. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16328433> >.

BREHMER, A. et al. Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. **J Chem Neuroanat**, v. 27, n. 1, p. 33-41, Mar 2004. ISSN 0891-0618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036361> >.

BRIERLEY, S. M.; LINDEN, D. R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 10, p. 611-27, Oct 2014. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001973> >.

BRILLAND, B. et al. A rare case of primary non-function of renal allograft due to adenine phosphoribosyltransferase deficiency. **Int Urol Nephrol**, v. 47, n. 9, p. 1589-91, Sep 2015. ISSN 1573-2584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253830> >.

BROADBENT, J. M. et al. Community Water Fluoridation and Intelligence: Prospective Study in New Zealand. **Am J Public Health**, v. 105, n. 1, p. 72-76, Jan 2015. ISSN 1541-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832151> >.

BROOKES, S. J. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **Anat Rec**, v. 262, n. 1, p. 58-70, Jan 2001. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146429> >.

- BROOKES, S. J. et al. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p. 961-73, Sep 1992. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379956> >.
- BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 863-78, 1991. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720229> >.
- BROWN, D. R.; TIMMERMANS, J. P. Lessons from the porcine enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 50-4, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066005> >.
- BROWNE, D.; WHELTON, H.; O'MULLANE, D. Fluoride metabolism and fluorosis. **J Dent**, v. 33, n. 3, p. 177-86, Mar 2005. ISSN 0300-5712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725518> >.
- BUENO, L. et al. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. **Gastroenterology**, v. 112, n. 5, p. 1714-43, May 1997. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9136853> >.
- BUFFA, R. et al. Types of endocrine cells in the human colon and rectum. **Cell Tissue Res**, v. 192, n. 2, p. 227-40, Sep 1978. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/699014> >.
- BULT, H. et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 346-7, May 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1971425> >.
- BURANT, C. F.; SAXENA, M. Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. **Am J Physiol**, v. 267, n. 1 Pt 1, p. G71-9, Jul 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8048533> >.
- BURGER, J. A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 96-103, 2011. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160019> >.
- BURLEIGH, D. E. Evidence for a functional cholinergic deficit in human colonic tissue resected for constipation. **J Pharm Pharmacol**, v. 40, n. 1, p. 55-7, Jan 1988. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2896776> >.
- BUZALAF, M. A.; CARDOSO, C. E. A.; MAGALHÃES, A. C. Low-fluoride toothpastes may not lead to dental fluorosis but may not control caries development. Standard fluoride toothpastes can control caries development but may lead to dental fluorosis. **J Evid Based Dent Pract**, v. 13, n. 4, p. 148-50, Dec 2013. ISSN 1532-3390. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237735> >.
- BUZALAF, M. A. et al. Fluctuations in public water fluoride level in Bauru, Brazil. **J Public Health Dent**, v. 62, n. 3, p. 173-6, 2002. ISSN 0022-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180046> >.
- _____. Nail and bone surface as indicators of acute exposure to fluoride in rats. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 4, p. 285-9, Dec 2004. ISSN 1678-7757. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976398> >.

-
- _____. Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. **Caries Res**, v. 46, n. 4, p. 394-400, 2012. ISSN 1421-976X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699417> >.
- _____. Seven years of external control of fluoride levels in the public water supply in Bauru, São Paulo, Brazil. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 1, p. 92-8, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1678-7765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559119> >.
- BUZALAF, M. A.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism. **Monogr Oral Sci**, v. 22, p. 20-36, 2011. ISSN 0077-0892 (Print) 0077-0892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701189> >.
- BUZALAF, M. A. R. et al. Impact of fluoride in the prevention of caries and erosion. In: BUZALAF, M. A. R. (Ed.). **Fluoride and the oral environment**. Basel: Karger, v.22, 2011. p.97-114.
- CALMON, M. F. et al. Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer. **Epigenetics**, v. 10, n. 7, p. 622-32, 2015. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985363> >.
- CAMPBELL, M. G.; KARBSTEIN, K. Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16194, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283762> >.
- CANTU, M. D. C., E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. **SEQÜENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS: UM GUIA PRÁTICO**. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CARDOSO, L. et al. Polarização da cárie em município sem água fluoretada. **Cad. Saúde Pública**, v. 1, n. 19, p. 237-243, 2003.
- CARDOSO, V. E. S. W., G. M.; AOYAMA, Y.; BUZALAF, M. A. R. Daily variations in human plasma fluoride concentrations. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. <b style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;">normal>129, p. 1193-1198, 2008.
- CARVALHO, J. G. et al. Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53261, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308176> >.
- CHAMBERS, J. D.; THOMAS, E. A.; BORNSTEIN, J. C. Mathematical modelling of enteric neural motor patterns. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 41, n. 3, p. 155-64, Mar 2014. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24471867> >.
- CHAN, G. H.; FISCUS, R. R. Severe impairment of CGRP-induced hypotension in vivo and vasorelaxation in vitro in elderly rats. **Eur J Pharmacol**, v. 434, n. 3, p. 133-9, Jan 2002. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779576> >.
- CHANDRASEKHARAN, B.; NEZAMI, B. G.; SRINIVASAN, S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 304, n. 11, p. G949-57, Jun 2013. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538492> >.
-

-
- CHANG, J. et al. Proteomic changes during intestinal cell maturation in vivo. **J Proteomics**, v. 71, n. 5, p. 530-46, Dec 2008. ISSN 1874-3919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824147> >.
- CHANG, M. M.; LEEMAN, S. E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. **J Biol Chem**, v. 245, n. 18, p. 4784-90, Sep 1970. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5456150> >.
- CHARNTIKOV, S. et al. Ibudilast reverses the decrease in the synaptic signaling protein phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1) produced by chronic methamphetamine intake in rats. **Drug Alcohol Depend**, v. 152, p. 15-23, Jul 2015. ISSN 1879-0046. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25962787> >.
- CHAUHAN, S. S.; MAHMOOD, A.; OJHA, S. Ethanol and age enhances fluoride toxicity through oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat intestine. **Mol Cell Biochem**, v. 384, n. 1-2, p. 251-62, Dec 2013. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022343> >.
- CHAUHAN, S. S.; OJHA, S.; MAHMOOD, A. Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. **Alcohol**, v. 45, n. 7, p. 663-72, Nov 2011. ISSN 1873-6823. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145694> >.
- CHEN, A. C. et al. Noncanonical role of transferrin receptor 1 is essential for intestinal homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 37, p. 11714-9, Sep 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324903> >.
- CHEN, H. et al. Role for plasmin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 95-104, Jul 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871642> >.
- CHEN, J. et al. Selective decreases of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells exposed to fluoride. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 235-42, Feb 2003. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504354> >.
- CHEN, L. et al. Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115708, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545012> >.
- CHEN, P. S. et al. Renal Clearance of fluoride. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, p. 879-883, 1956.
- CHEN, X. et al. SOD1 aggregation in astrocytes following ischemia/reperfusion injury: a role of NO-mediated S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI). **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 237, 2012. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23061969> >.
- CHENG, M. Y.; HARTL, F. U.; HORWICH, A. L. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 455-8, Nov 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978929> >.
- CHI, K.; JONES, D. V.; FRAZIER, M. L. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 98-102, Jul 1992. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612363> >.
-

Referências

-
- CHINO, Y. et al. Colocalization of NO and VIP in neurons of the submucous plexus in the rat intestine. **Peptides**, v. 23, n. 12, p. 2245-50, Dec 2002. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535705> >.
- CHIOCCHETTI, R. et al. Intrinsic innervation of the ileocaecal junction in the horse: preliminary study. **Equine Vet J**, v. 41, n. 8, p. 759-64, Nov 2009. ISSN 0425-1644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20095223> >.
- _____. Characterisation of neurons expressing calbindin immunoreactivity in the ileum of the unweaned and mature sheep. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 2, p. 289-303, Nov 2004. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338268> >.
- _____. Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. **Cell Tissue Res**, v. 323, n. 2, p. 183-96, Feb 2006. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16228232> >.
- _____. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. **Cell Tissue Res**, v. 311, n. 1, p. 11-22, Jan 2003. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12483280> >.
- CHIOU, M. J. et al. Functional analysis of mitogen-activated protein kinase-3 (MAPK3) and its regulation of the promoter region in zebrafish. **DNA Cell Biol**, v. 26, n. 11, p. 781-90, Nov 2007. ISSN 1044-5498. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17999625> >.
- CHIRUMARI, K.; REDDY, P. K. Dose-dependent effects of fluoride on neurochemical milieu in the hippocampus and neocortex of rat brain. **Fluoride**, v. 40, p. 101-110, 2007.
- CHLUBECK, D. et al. Neurotoxicity of fluoride in rats—neuropathological studies. **Fluoride**, v. 31, p. S24., 1998.
- CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J Physiol Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253-6, 2001 Jan-Dec 2001. ISSN 0928-4257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595446> >.
- CHO, D. I. et al. Direct and biochemical interaction between dopamine D3 receptor and elongation factor-1Bbetagamma. **Life Sci**, v. 73, n. 23, p. 2991-3004, Oct 2003. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519448> >.
- CHOI, A. L. et al. Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 10, p. 1362-8, Oct 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820538> >.
- CHOUHAN, S.; FLORA, S. J. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 61-7, Dec 2008. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845224> >.
- _____. Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. **Indian J Exp Biol**, v. 48, n. 7, p. 666-78, Jul 2010. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929051> >.
- CHU, J. et al. Biphasic regulation of myosin light chain phosphorylation by p21-activated kinase modulates intestinal smooth muscle contractility. **J Biol Chem**, v. 288, n. 2, p. 1200-13, Jan 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161543> >.
-

- CHUNG, S. et al. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. **Cancer Lett**, v. 156, n. 2, p. 185-90, Aug 2000. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880768> >.
- CINGOLANI, L. A.; GODA, Y. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 344-56, May 2008. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425089> >.
- CLAGUE, J. R.; STERNINI, C.; BRECHA, N. C. Localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in neurons of the rat gastrointestinal tract. **Neurosci Lett**, v. 56, n. 1, p. 63-8, May 1985. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3892373> >.
- COCCHIARA, R. et al. Mast cell production of TNF-alpha induced by substance P evidence for a modulatory role of substance P-antagonists. **J Neuroimmunol**, v. 101, n. 2, p. 128-36, Nov 1999. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580796> >.
- COLE, A. R.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: a comparison with colonic polyps. **Electrophoresis**, v. 21, n. 9, p. 1772-81, May 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10870964> >.
- COLUCCI, M. et al. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Auton Neurosci**, v. 169, n. 2, p. 77-86, Aug 2012. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608184> >.
- CONN, K. J. et al. Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. **Brain Res**, v. 1022, n. 1-2, p. 164-72, Oct 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353226> >.
- COOKE, H. J. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. **Ann N Y Acad Sci**, v. 915, p. 77-80, 2000. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193603> >.
- CORBI, N. et al. The eEF1γ subunit contacts RNA polymerase II and binds vimentin promoter region. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14481, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217813> >.
- COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Suppl 4, p. iv15-9; discussion iv26, Dec 2000. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076898> >.
- COSTA, M. et al. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 75, n. 3, p. 949-67, Dec 1996. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951887> >.
- _____. Advances in the innervation of the gastrointestinal tract. In: (Ed.). **Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function**. New York: Elsevier, 1992. p.115-121.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B. The peristaltic reflex: an analysis of the nerve pathways and their pharmacology. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 294, n. 1, p. 47-60, Jul 1976. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1004629> >.

Referências

-
- COSTA, M. et al. Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine. **Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 587-96, 1980. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6990294> >.
- _____. CNS Pharmacology Neuropeptides. In: H, Y.; Y, H., *et al* (Ed.). **Advances in pharmacology and therapeutics. 8th International Congress of Pharmacology**. Tokyo, Japan, v.1, 1981. (CNS-Pharmacology).
- COSTA, M.; FURNESS, J. B.; GIBBINS, I. L. Chemical coding of enteric neurons. In: HOKFELT, T.; FUXE, K., *et al* (Ed.). **Progress in Brain Research**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.217-239.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B.; LLEWELLYN-SMITH, I. J. Histochemistry of the enteric nervous system. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1987. p.1-40.
- COSTA, M. et al. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. **Neurosci Lett**, v. 148, n. 1-2, p. 121-5, Dec 1992. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1284439> >.
- COSTA, M. F., J. B. Origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea pig small intestine. **Neuroscience**, v. 8, p. 665-676, 1983.
- CRAIG, S. W.; POWELL, L. D. Regulation of actin polymerization by villin, a 95,000 dalton cytoskeletal component of intestinal brush borders. **Cell**, v. 22, n. 3, p. 739-46, Dec 1980. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6893953> >.
- CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, Dec 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075578> >.
- CREMER, H. D.; BUTTNER, W. Absorption of fluorides. In: (Ed.). **Fluoride and human health**. Geneva: World Health Organization, 1970. p.75-89.
- CRIPPS, A. W.; WILLIAMS, V. J. The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat. **Br J Nutr**, v. 33, n. 1, p. 17-32, Jan 1975. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1115751> >.
- CULLEN, J. J. et al. Effects of endotoxin on regulation of intestinal smooth muscle nitric oxide synthase and intestinal transit. **Surgery**, v. 125, n. 3, p. 339-44, Mar 1999. ISSN 0039-6060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10076620> >.
- CURY, J. A. et al. Low-fluoride dentifrice and gastrointestinal fluoride absorption after meals. **J Dent Res**, v. 84, n. 12, p. 1133-7, Dec 2005. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304442> >.
- CÔTÉ, M. et al. The critical role of the MyD88-dependent pathway in non-CNS MPTP-mediated toxicity. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 6, p. 1143-52, Aug 2011. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376805> >.
- D'AMATO, M.; CURRÒ, D.; MONTUSCHI, P. Evidence for dual components in the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. **J Auton Nerv Syst**, v. 37, n. 3, p. 175-86, Mar 1992. ISSN 0165-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587995> >.
-

- DALMAU, J. et al. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. **Am J Pathol**, v. 141, n. 4, p. 881-6, Oct 1992. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415481> >.
- _____. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. **Ann Neurol**, v. 27, n. 5, p. 544-52, May 1990. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2163235> >.
- DANIEL, E. E. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. III. Interaction of interstitial cells of Cajal with neuromediators: an interim assessment. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, n. 6, p. G1329-32, Dec 2001. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705736> >.
- DANIEL, E. E. et al. Role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal polypeptide. **Am J Physiol**, v. 266, n. 1 Pt 1, p. G31-9, Jan 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304456> >.
- DAS, T. K. et al. Toxic effects of chronic fluoride ingestion on the upper gastrointestinal tract. **J Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 3, p. 194-9, Apr 1994. ISSN 0192-0790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8034913> >.
- DASARATHY, S. et al. Gastroduodenal manifestations in patients with skeletal fluorosis. **J Gastroenterol**, v. 31, n. 3, p. 333-7, Jun 1996. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8726823> >.
- DAWSON, T. M. et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7797-801, Sep 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715581> >.
- DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog Brain Res**, v. 118, p. 215-29, 1998. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9932444> >.
- DE ALMEIDA BALDINI CARDOSO, C. et al. The effect of pH and fluoride concentration of liquid dentifrices on caries progression. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 3, p. 761-7, Apr 2014. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873319> >.
- DE BIASE, A. et al. Gene expression profiling of experimental traumatic spinal cord injury as a function of distance from impact site and injury severity. **Physiol Genomics**, v. 22, n. 3, p. 368-81, Aug 2005. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15942019> >.
- DE CARVALHO, J. G. et al. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 30, n. 4, p. 287-94, May 2008. ISSN 0379-0355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773123> >.
- DE GIORGIO, R. et al. New insights into human enteric neuropathies. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 143-7, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066021> >.
- DE HOSTOS, E. L. The coronin family of actin-associated proteins. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 345-50, Sep 1999. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461187> >.

Referências

-
- DE LÓPEZ, O. H.; SMITH, F. A.; HODGE, H. C. Plasma fluoride concentrations in rats acutely poisoned with sodium fluoride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 37, n. 1, p. 75-83, Jul 1976. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/968908> >.
- DE MORAES, S. M. et al. Creatine supplementation in trained rats causes changes in myenteric neurons and intestinal wall morphometry. **Biocell**, v. 37, n. 2, p. 37-43, Aug 2013. ISSN 0327-9545. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392580> >.
- DEAN, H.; ELVOVE, E. Further studies on the minimum threshold of chronic endemic dental fluorosis. **Public Health Reports**, v. 52, p. 1249-1264, 1937.
- DEAN, H. T. Domestic water and dental caries: V. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14 years, of 13 cities in 4 states. **Public Health Reports**, v. 57, p. 1155-1179, 1942.
- DEFANI, M. A. et al. Effect of acetyl-L-carnitine on VIP-ergic neurons in the jejunum submucous plexus of diabetic rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 4, p. 962-7, Dec 2003. ISSN 0004-282X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762599> >.
- DELANOTE, V.; VANDEKERCKHOVE, J.; GETTEMANS, J. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26, n. 7, p. 769-79, Jul 2005. ISSN 1671-4083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960882> >.
- DELONG, G. R. Autism, amnesia, hippocampus, and learning. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 1, p. 63-70, 1992. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1553107> >.
- DEMIR, I. E. et al. Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity. **Acta Neuropathol**, v. 125, n. 4, p. 491-509, Apr 2013. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23417735> >.
- DEMIR, K. et al. RAB8B is required for activity and caveolar endocytosis of LRP6. **Cell Rep**, v. 4, n. 6, p. 1224-34, Sep 2013. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035388> >.
- DENT, E. W.; GUPTON, S. L.; GERTLER, F. B. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 3, Mar 2011. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106647> >.
- DESAI, K. M. et al. Nitric oxide, and not vasoactive intestinal peptide, as the main neurotransmitter of vagally induced relaxation of the guinea pig stomach. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 4, p. 1197-202, Dec 1994. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534182> >.
- DESAI, V. K. et al. Symptomatology of Workers in the Fluoride Industry and Fluorspar Processing Plants. **Studies in Environmental Science**, v. 27, p. 193-99, 1986.
- DESCHÊNES-FURRY, J.; PERRONE-BIZZOZERO, N.; JASMIN, B. J. The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 822-33, Aug 2006. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16927307> >.
- DEVOTO, E.; YOKEL, R. A. The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. **Environ Health Perspect**, v. 102, p. 940-51, 1994.
-

- DEY, S. et al. In vivo efficacy of tamarind (*Tamarindus indica*) fruit extract on experimental fluoride exposure in rats. **Res Vet Sci**, v. 91, n. 3, p. 422-5, Dec 2011. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980037> >.
- DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-90, May 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496922> >.
- DHILLON, N. et al. H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 2, p. 489-501, Jan 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382141> >.
- DI GIANCAMILLO, A. et al. The chemical code of porcine enteric neurons and the number of enteric glial cells are altered by dietary probiotics. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 9, p. e271-8, Sep 2010. ISSN 1365-2982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524986> >.
- DICK, J. M. et al. Investigation of the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig gastric fundus. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 4, p. 751-63, Feb 2000. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683200> >.
- DICKMAN, D. K. et al. A slowed classical pathway rather than kiss-and-run mediates endocytosis at synapses lacking synaptotagmin and endophilin. **Cell**, v. 123, n. 3, p. 521-33, Nov 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269341> >.
- DIKSHIT, B. B. Acetylcholine formation by tissues. **Quart J Exp Physiol**, v. 28, p. 243-251, 1938.
- DING, Y. et al. [Proteomic expression analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 90, n. 8, p. 564-9, Mar 2010. ISSN 0376-2491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367971> >.
- _____. The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. **J Hazard Mater**, v. 186, n. 2-3, p. 1942-6, Feb 2011. ISSN 1873-3336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21237562> >.
- DOBASHI, Y. et al. Expression of HuD protein is essential for initial phase of neuronal differentiation in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 244, n. 1, p. 226-9, Mar 1998. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514914> >.
- DOCKRAY, G. J. Physiology of enteric neuropeptides. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven, 1994. p.169-209.
- DOCKRAY, G. J.; SHARKEY, K. A. Neurochemistry of visceral afferent neurones. **Prog Brain Res**, v. 67, p. 133-48, 1986. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3823469> >.
- DOGIEL, A. S. Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. **Arch Anat Physiol Anat Abt**, v. 1899, p. 130-158, 1899.
- DOLADO, I. et al. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 11, n. 2, p. 191-205, Feb 2007. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292829> >.

Referências

-
- DONG, Y. et al. Synaptojanin cooperates in vivo with endophilin through an unexpected mechanism. **Elife**, v. 4, 2015. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918845> >.
- DREISBACH, R. H. **Fluorine, hydrogen fluoride and derivatives**. Los Altos, CA: Land Medical Publishers, 1980.
- DU, Y. et al. Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, a new Annexin A7 interacting protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 445, n. 1, p. 58-63, Feb 2014. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491534> >.
- DUBOVSKY, J. A. et al. Lymphocyte cytosolic protein 1 is a chronic lymphocytic leukemia membrane-associated antigen critical to niche homing. **Blood**, v. 122, n. 19, p. 3308-16, Nov 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009233> >.
- DUNIPACE, A. J. et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **J Dent Res**, v. 74, n. 1, p. 358-68, Jan 1995. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876430> >.
- DVORAK, A. M. et al. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system. **Hum Pathol**, v. 11, n. 6, p. 620-34, Nov 1980. ISSN 0046-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6161074> >.
- DÉNES, V. et al. Serotonin in the rabbit ileum: localization, uptake, and effect on motility. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 271, n. 2, p. 368-76, Apr 2003. ISSN 1552-4884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629679> >.
- EBERT, M. P. et al. Advances, challenges, and limitations in serum-proteome-based cancer diagnosis. **J Proteome Res**, v. 5, n. 1, p. 19-25, Jan 2006. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16396491> >.
- ECKENSTEIN, F.; THOENEN, H. Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. **EMBO J**, v. 1, n. 3, p. 363-8, 1982. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6821323> >.
- ECKERT, C.; HAMMESFAHR, B.; KOLLMAR, M. A holistic phylogeny of the coronin gene family reveals an ancient origin of the tandem-coronin, defines a new subfamily, and predicts protein function. **BMC Evol Biol**, v. 11, p. 268, 2011. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943019> >.
- EKBLAD, E.; ALM, P.; SUNDLER, F. Distribution, origin and projections of nitric oxide synthase-containing neurons in gut and pancreas. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 233-48, Nov 1994. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534882> >.
- EKBLAD, E.; BAUER, A. J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 123-8, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066017> >.
- EKBLAD, E.; MULDER, H.; SUNDLER, F. Vasoactive intestinal peptide expression in enteric neurons is upregulated by both colchicine and axotomy. **Regul Pept**, v. 63, n. 2-3, p. 113-21, Jul 1996. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837219> >.
-

-
- EKBLAD, E. et al. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. **Gut**, v. 42, n. 6, p. 836-44, Jun 1998. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9691923> >.
- _____. Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine. **Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 169-88, Jan 1987. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2436086> >.
- EKELUND, K. M.; EKBLAD, E. Structural, neuronal, and functional adaptive changes in atrophic rat ileum. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 236-45, Aug 1999. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403736> >.
- EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics during acid-base balance changes in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 18, n. 2, p. 189-94, Aug 1980. ISSN 0031-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7428802> >.
- EKSTRAND, J.; ERICSSON, Y.; ROSELL, S. Absence of protein-bound fluoride from human blood plasma. **Arch Oral Biol**, v. 22, p. 229-232, 1977.
- ELSAESSER, S. J.; GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D. New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, n. 2, p. 110-7, Apr 2010. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153629> >.
- EMERY, G. et al. Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 763-73, Sep 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16137758> >.
- ERDAL, S.; BUCHANAN, S. N. A quantitative look at fluorosis, fluoride exposure, and intake in children using a health risk assessment approach. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 1, p. 111-7, Jan 2005. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626657> >.
- EVANS, T. M. et al. Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway. **Traffic**, v. 4, n. 12, p. 869-84, Dec 2003. ISSN 1398-9219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617350> >.
- FAHRENKRUG, J. VIP as a neurotransmitter in the peripheral nervous system. In: SAID, S. I. (Ed.). **Vasoactive intestinal polypeptide**. New York: Raven Press, 1982. p.361-372.
- FAHRENKRUG, J. et al. Influence of autonomic nervous system on the release of VIP from the porcine gastrointestinal tract. **J Physiol Lond**, v. 280, p. 405-422, 1978.
- _____. Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible physiological implications. **J Physiol**, v. 284, p. 291-305, Nov 1978. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/215756> >.
- FAIRMAN, C. L. et al. Appearance of neurons in the developing chick gut. **Dev Dyn**, v. 204, n. 2, p. 192-201, Oct 1995. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589443> >.
- FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S.; VANNUCCHI, M. G. Substance P and Neurokinin 1 receptor - expression is affected in the ileum of mice with mutation in the W locus. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 511-8, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796816> >.
-

Referências

-
- FEHÉR, E. et al. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibres in the small intestine of the guinea-pig: electron-microscopic immunocytochemistry. **Cell Tissue Res**, v. 245, n. 2, p. 353-8, 1986. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527424> >.
- FEHÉR, E.; LÉRÁNT, C.; WILLIAMS, T. H. Ultrastructural identification of substance P cells and processes in the rat myenteric plexus. **Acta Morphol Hung**, v. 32, n. 1, p. 23-9, 1984. ISSN 0236-5391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6205555> >.
- FEHÉR, E.; WENGER, T. Ultrastructural immunocytochemical localization of substance P in the cat small intestine. **Anat Anz**, v. 150, n. 1-2, p. 137-43, 1981. ISSN 0003-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6171182> >.
- FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 182-91, 2004 May-Jun 2004. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153687> >.
- FEKETE, E.; BAGYANSZKI, M.; RESH, B. A. Pre-natal development of the myenteric plexus in the human fetal small intestine. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 44, n. 1-4, p. 3-19, 2000.
- FEKETE, E. et al. Sequential pattern of nerve-muscle contacts in the small intestine of developing human fetus. An ultrastructural and immunohistochemical study. **Histol Histopathol**, v. 11, p. 112-119, 1996.
- FELBERBAUM-CORTI, M.; CAVALLI, V.; GRUENBERG, J. Capture of the small GTPase Rab5 by GDI: regulation by p38 MAP kinase. **Methods Enzymol**, v. 403, p. 367-81, 2005. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473603> >.
- FELDMANN, R. E. et al. Reduction in rat phosphatidylethanolamine binding protein-1 (PEBP1) after chronic corticosterone treatment may be paralleled by cognitive impairment: a first study. **Stress**, v. 11, n. 2, p. 134-47, Mar 2008. ISSN 1607-8888. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311602> >.
- FENG, J. T.; SHANG, S.; BERETTA, L. Proteomics for the early detection and treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3810-7, Jun 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799622> >.
- FERNANDES, T. et al. Bowel wall thickening at CT: simplifying the diagnosis. **Insights Imaging**, v. 5, n. 2, p. 195-208, Apr 2014. ISSN 1869-4101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407923> >.
- FERRARI, G. et al. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 435-47, May 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338208> >.
- FISHLOCK, D. J.; PARKS, A. G. A STUDY OF HUMAN COLONIC MUSCLE IN VITRO. **Br Med J**, v. 2, n. 5358, p. 666-7, Sep 1963. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14044871> >.
- FLORA, S. J.; MITTAL, M.; MISHRA, D. Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. **J Neurol Sci**, v. 285, n. 1-2, p. 198-205, Oct 2009. ISSN 1878-5883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635623> >.
-

-
- FRANÇA, N. R. M. J., D.LIMA, A. B.PUCCI, F. V. C.ANDRADE, L. E. C.SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 6, p. 695-709, 2010.
- FREELEY, M. et al. L-plastin regulates polarization and migration in chemokine-stimulated human T lymphocytes. **J Immunol**, v. 188, n. 12, p. 6357-70, Jun 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581862> >.
- FRYDMAN, J. et al. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. **Nature**, v. 370, n. 6485, p. 111-7, Jul 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8022479> >.
- FU, H.; COBURN, J.; COLLIER, R. J. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 6, p. 2320-4, Mar 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8460141> >.
- FUJIMIYA, M.; YAMAMOTO, H.; KUWAHARA, A. Effect of VIP and PACAP on basal release of serotonin from isolated vascularly and luminally perfused rat duodenum. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 1, p. G731-9, Oct 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756504> >.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, Jul 2000. ISSN 0165-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869706> >.
- _____. A comprehensive overview of all aspects of the enteric nervous system. In: (Ed.). **The Enteric Nervous System**. Oxford: Blackwell, 2006.
- _____. **The Enteric Nervous System**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: YAMADA, T.; ALPERS, D. H., et al (Ed.). **Gastroenterology I**. Philadelphia, USA: Lippincott, 1994.
- FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: YAMADA, T. (Ed.). **Textbook of Gastroenterology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. p.11-35.
- _____. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **Trends Neurosci**, v. 15, n. 2, p. 66-71, Feb 1992. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374965> >.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Projections of intestinal neurons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide are consistent with these neurons being the enteric inhibitory neurons. **Neurosci Lett**, v. 15, n. 2-3, p. 199-204, Dec 1979. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/43497> >.
- _____. **The enteric nervous system**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M.; ECKENSTEIN, F. Neurones localized with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. **Neurosci Lett**, v. 40, n. 2, p. 105-9, Sep 1983. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355914> >.
- FURNESS, J. B. et al. Plarity and projections of peptide containing neurons in the guinea-pig small intestine. In: GROSSMAN, M. I.; BRAZIER, M. A. B., et al (Ed.). **Celulas basis of chemical**
-

Referências

messengers in the digestive system. UCLA Forum in Medical Sciences. New York: Academic Press, v.23, 1981a.

_____. Polarity and projections of peptide containing neurons in the guinea-pig small intestine. In: GROSSMAN, M. I.; BRAZIER, M. A. B., *et al* (Ed.). **Celulas basis of chemical messengers in the digestive system.** UCLA Forum in Medical Sciences. New York: Academic Press, v.23, 1981b.

_____. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol Motil**, v. 7, n. 2, p. 89-96, Jun 1995. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621324> >.

_____. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Prog Neurobiol**, v. 72, n. 2, p. 143-64, Feb 2004. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063530> >.

_____. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 1, p. 1-18, Jan 1998. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460790> >.

_____. Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. **Cell Tissue Res**, v. 317, n. 1, p. 1-12, Jul 2004. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170562> >.

_____. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 108, n. 2, p. 554-63, Feb 1995. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7835599> >.

FUXE, K. et al. Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. **Neurosci Lett**, v. 5, n. 5, p. 241-6, Aug 1977. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605001> >.

FÖGER, N. et al. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 839-42, Aug 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902139> >.

GABELLA, G. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract.** New York: Raven Press, 1987. p.335-381.

GALLIGAN, J. J. Mechanisms of excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **Tokai J Exp Clin Med**, v. 23, n. 3, p. 129-36, Jun 1998. ISSN 0385-0005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9972540> >.

_____. Nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 45, p. 231-4, 2002. ISSN 0083-8969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434587> >.

GALLIGAN, J. J. et al. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, n. 1-3, p. 97-103, Jul 2000. ISSN 0165-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869707> >.

GALLINA, A.; ROSSI, F.; MILANESI, G. Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. **Virology**, v. 283, n. 1, p. 7-18, Apr 2001. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312657> >.

-
- GAMET-PAYRASTRE, L. et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 60, n. 5, p. 1426-33, Mar 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728709> >.
- GANGULA, P. R. et al. Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 470-5, Jan 2000. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642343> >.
- GANNIS, D. et al. Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in the human intestine. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 1, p. 41-51, Jan 2006. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267786> >.
- GAO, Q.; LIU, Y.; GUANA, Z. DECREASED LEARNING AND MEMORY ABILITY IN RATS WITH FLUOROSIS: INCREASED OXIDATIVE STRESS AND REDUCED CHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE BRAIN. **Fluoride**, v. 42, n. 4, p. 277-285, 2009.
- GAO, X.; HARDWIDGE, P. R. Ribosomal protein s3: a multifunctional target of attaching/effacing bacterial pathogens. **Front Microbiol**, v. 2, p. 137, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738525> >.
- GAO, Y. et al. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 1043-50, Jun 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351421> >.
- GARCIA-ESPARCIA, P. et al. Purine metabolism gene deregulation in Parkinson's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Jan 2015. ISSN 1365-2990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25597950> >.
- GARTHWAITE, J. Neural nitric oxide signalling. **Trends Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 51-2, Feb 1995. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537404> >.
- GATFIELD, J. et al. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 6, p. 2786-98, Jun 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800061> >.
- GAUTHIER, E. et al. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. **Environ Res**, v. 84, p. 234-46, 2000.
- GE, Y. et al. Effects of high fluoride and low iodine on brain effects of high fluoride and low iodine on brain histopathology in offspring rats. **Fluoride**, v. 38, p. 127-32., 2005.
- _____. Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 1, p. 27-33, Jan 2011. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364248> >.
- GE, Y. M. et al. Apoptosis in brain cells of offspring rats exposed to high fluoride and low iodine. **Fluoride**, v. 39, p. 173-178, 2006.
- GEERAERTS, F. et al. Kinetics of fluoride penetration in liver and brain. **Fluoride**, v. 19, p. 108-112, 1986.
- GENUINO, H. C. et al. A review of hydrofluoric acid and its use in the car wash industry. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1529-1539, 2012.
-

Referências

-
- GERSHON, M. D. The enteric nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 4, p. 227-72, 1981. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6111979> >.
- _____. **The Second Brain**. New York: Harper Collins, 1998.
- GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L.; WADE, P. R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 3rd. New York, NY: Raven Press, 1994. p.381-422.
- GESSNER, B. D. et al. Acute fluoride poisoning from a public water system. **N Engl J Med**, v. 330, n. 2, p. 95-9, Jan 1994. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8259189> >.
- GHARZOULI, K.; SENATOR, A. Fluoride absorption in vitro by the gastrointestinal tract of the rat. **Fluoride**, v. 27, n. 4, p. 185-8, 1994.
- GIARONI, C. et al. Plasticity in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 117, n. 6, p. 1438-58, Dec 1999. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579986> >.
- GIBSON, A. et al. L-NG-monomethyl arginine and L-NG-nitro arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 3, p. 602-6, Mar 1990. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2331584> >.
- GINDHART, J. G. et al. The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the Drosophila nervous system. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 8, p. 3356-65, Aug 2003. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925768> >.
- GIRAUD, M. F.; VELOURS, J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the F1 delta subunit, sequence and disruption of the structural gene. **Eur J Biochem**, v. 222, n. 3, p. 851-9, Jun 1994. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026496> >.
- _____. The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. **Eur J Biochem**, v. 245, n. 3, p. 813-8, May 1997. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9183023> >.
- GLENNEY, J. R. et al. F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments. **J Biol Chem**, v. 256, n. 17, p. 9283-8, Sep 1981. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6894925> >.
- GODLEWSKI, J.; KALECZYC, J. Somatostatin, substance P and calcitonin gene-related peptide-positive intramural nerve structures of the human large intestine affected by carcinoma. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 48, n. 3, p. 475-83, Sep 2010. ISSN 1897-5631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071356> >.
- GOLDBERG, A. D. et al. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 678-91, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211137> >.
- GOLDHILL, J. M. et al. Neural control of mouse small intestinal longitudinal muscle: interactions with inflammatory mediators. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, n. 1, p. 72-7, Jul 1995. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7616450> >.
-

-
- GOLDMANN, W. H. Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling. **Cell Biol Int**, v. 26, n. 4, p. 313-7, 2002. ISSN 1065-6995. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991660> >.
- GOLOUBINOFF, P. et al. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. **Nature**, v. 342, n. 6252, p. 884-9, 1989 Dec 21-28 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532860> >.
- GOMBASH, S. E. et al. Neuroprotective potential of pleiotrophin overexpression in the striatonigral pathway compared with overexpression in both the striatonigral and nigrostriatal pathways. **Gene Ther**, v. 21, n. 7, p. 682-93, Jul 2014. ISSN 1476-5462. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807806> >.
- GOMES, M. L. et al. Investigação sorológica da doença de Chagas e isolamento do T. cruzi em indivíduos de cinco municípios da região noroeste do Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 25, n. III, p. 94, 1992.
- GOYAL, R. K.; SAID, S. I.; RATTAN, S. Influence of VIP antiserum on lower esophageal sphincter relaxation: possible evidence for VIP as the inhibitory neurotransmitter. **Gastroenterology**, v. 76, p. 1142, 1979.
- GRABER, M. W. et al. Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus. **Ann Surg Oncol**, v. 3, n. 2, p. 192-7, Mar 1996. ISSN 1068-9265. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646521> >.
- GRAHAM, J. D. P. The effect of drugs on the motility of isolated strips of human stomach muscle. **J Pharm Pharmacol**, v. 1, p. 95-102, 1949.
- GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 3, p. 330-8, Mar 2014. ISSN 1474-4465. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556010> >.
- GRIDER, J. R. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. **Am J Physiol**, v. 264, n. 2 Pt 1, p. G334-40, Feb 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8447417> >.
- _____. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. **Am J Physiol**, v. 266, n. 6 Pt 1, p. G1139-45, Jun 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912896> >.
- GRIDER, J. R. et al. Vasoactive intestinal peptide. Relaxant neurotransmitter in tenia coli of the guinea pig. **Gastroenterology**, v. 89, n. 1, p. 36-42, Jul 1985. ISSN 0016-5085. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861138> >.
- GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Vasoactive intestinal peptide. Transmitter of inhibitory motor neurons of the gut. **Ann N Y Acad Sci**, v. 527, p. 369-77, 1988. ISSN 0077-8923. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2898909> >.
- GRIDER, J. R. et al. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. **Am J Physiol**, v. 262, n. 4 Pt 1, p. G774-8, Apr 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566853> >.
-

Referências

-
- GRONGNET, J. F.; DAVID, J. C. Reciprocal variations of nNOS and HSP90 are associated with fasting in gastrointestinal tract of the piglet. **Dig Dis Sci**, v. 48, n. 2, p. 365-72, Feb 2003. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12643617> >.
- GRUNDY, D.; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 22, n. 2, p. 102-10, Mar 2006. ISSN 0267-1379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462164> >.
- GUAN, Z. Z. et al. Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. **Neurotoxicol Teratol**, v. 20, n. 5, p. 537-42, 1998 Sep-Oct 1998. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761592> >.
- _____. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. **Arch Toxicol**, v. 74, n. 10, p. 602-8, Dec 2000. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201667> >.
- GUILLEMETTE, B.; GAUDREAU, L. [H2A.Z: a histone variant that decorates gene promoters]. **Med Sci (Paris)**, v. 22, n. 11, p. 941-6, Nov 2006. ISSN 0767-0974. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101095> >.
- GULCICEK, E. E. et al. Proteomics and the analysis of proteomic data: an overview of current protein-profiling technologies. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 13, p. Unit 13.1, Jul 2005. ISSN 1934-340X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428746> >.
- GUTKNECHT, J.; WALTER, A. Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 644, n. 1, p. 153-6, Jun 1981. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266462> >.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- GÁBRIEL, R. et al. Some neurohistochemical properties of nerve elements in myenteric plexus of rabbit ileum: similarities and dissimilarities to the rodent pattern. **Cell Tissue Res**, v. 292, n. 2, p. 283-91, May 1998. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560471> >.
- HABER, H. P. et al. Colonic wall thickness measured by ultrasound: striking differences in patients with cystic fibrosis versus healthy controls. **Gut**, v. 40, n. 3, p. 406-11, Mar 1997. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135533> >.
- HAGL, C. I. et al. Proteome analysis of isolated myenteric plexus reveals significant changes in protein expression during postnatal development. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 1-8, Oct 2005. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183334> >.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.
- HANANI, M. et al. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. **J Comp Neurol**, v. 462, n. 3, p. 315-27, Jun 2003. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794735> >.
- _____. Nitric oxide-containing nerves in bowel segments of patients with Hirschsprung's disease. **J Pediatr Surg**, v. 30, n. 6, p. 818-22, Jun 1995. ISSN 0022-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7666315> >.
-

-
- HANSSON, J. et al. Time-resolved quantitative proteome analysis of in vivo intestinal development. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 3, p. M110.005231, Mar 2011. ISSN 1535-9484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191033> >.
- HARDY, S.; ROBERT, F. Random deposition of histone variants: A cellular mistake or a novel regulatory mechanism? **Epigenetics**, v. 5, n. 5, p. 368-72, Jul 2010. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448466> >.
- HARRIS, T. W. et al. Mutations in synaptotagmin disrupt synaptic vesicle recycling. **J Cell Biol**, v. 150, n. 3, p. 589-600, Aug 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931870> >.
- HARRISON, S. et al. Association of SNPs in LCP1 and CTIF with hearing in 11 year old children: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) birth cohort and the G-EAR consortium. **BMC Med Genomics**, v. 8, p. 48, 2015. ISSN 1755-8794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264041> >.
- HASSAN, H. A.; ABDEL-AZIZ, A. F. Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 8-9, p. 1999-2004, 2010 Aug-Sep 2010. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472017> >.
- HATA, F. et al. Essential role of nitric oxide in descending inhibition in the rat proximal colon. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 172, n. 3, p. 1400-6, Nov 1990. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2244920> >.
- HE, H. et al. pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. **Biochim Biophys Acta**, v. 1372, n. 2, p. 244-54, Jul 1998. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675300> >.
- HEANUE, T. A.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 466-79, Jun 2007. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17514199> >.
- HEBEISS, K.; KILBINGER, H. Differential effects of nitric oxide donors on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric neurones. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 8, p. 2073-8, Aug 1996. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864545> >.
- HEINDEL, J. J. et al. Developmental toxicity evaluation of sodium fluoride administered to rats and rabbits in drinking water. **Fundam Appl Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 162-77, Apr 1996. ISSN 0272-0590. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812262> >.
- HELFAND, B. T. et al. Rapid transport of neural intermediate filament protein. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 11, p. 2345-59, Jun 2003. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711702> >.
- HELLWIG, E.; LENNON, A. M. Systemic versus topical fluoride. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 258-62, 2004 May-Jun 2004. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153698> >.
- HENION, P. D. et al. Screen for mutations affecting development of Zebrafish neural crest. **Dev Genet**, v. 18, n. 1, p. 11-7, 1996. ISSN 0192-253X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742830> >.
-

-
- HENS, J. et al. The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons. **Histochem Cell Biol**, v. 117, n. 6, p. 481-92, Jun 2002. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107499> >.
- HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-97, Apr 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109490> >.
- HERMEKING, H. The 14-3-3 cancer connection. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 12, p. 931-43, Dec 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737123> >.
- HERMES-ULIANA, C. et al. Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? **Dig Dis Sci**, v. 59, n. 5, p. 937-48, May 2014. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370785> >.
- HIDA, H. et al. Pleiotrophin exhibits a trophic effect on survival of dopaminergic neurons in vitro. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 10, p. 2127-34, May 2003. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12786979> >.
- HIENOLA, A. et al. HB-GAM inhibits proliferation and enhances differentiation of neural stem cells. **Mol Cell Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 75-88, May 2004. ISSN 1044-7431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121180> >.
- HIRAKAWA, H. et al. Absence of NADPH-diaphorase activity in internal anal sphincter (IAS) achalasia. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 20, n. 1, p. 54-8, Jan 1995. ISSN 0277-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533833> >.
- HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 519-26, Jan 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438838> >.
- HIROKAWA, N.; TAKEMURA, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 201-14, Mar 2005. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15711600> >.
- HIROTA, C. L.; MCKAY, D. M. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. **Br J Pharmacol**, v. 149, n. 5, p. 463-79, Nov 2006. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981004> >.
- HOFF, S. et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. **J Comp Neurol**, v. 509, n. 4, p. 356-71, Aug 2008. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512230> >.
- HOLLENBECK, P. J. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. **Front Biosci**, v. 1, p. d91-102, Jul 1996. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159217> >.
- HOLZER, P. Implications of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. **Digestion**, v. 59, n. 4, p. 269-83, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 0012-2823. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693197> >.
- _____. Inflammation and gut hypersensitivity. Peripheral mechanisms. **Gastroenterol Int**, v. 14, p. 32-45, 2001.
-

- HOLZER, P. et al. Calcitonin gene-related peptide action on intestinal circular muscle. **Am J Physiol**, v. 256, n. 3 Pt 1, p. G546-52, Mar 1989. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2564254> >.
- HOLZER, P.; HOLZER-PETSCH, U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. **Pharmacol Ther**, v. 73, n. 3, p. 173-217, 1997a. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175155> >.
- _____. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 73, n. 3, p. 219-63, 1997b. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175156> >.
- HOLZER, P.; LEMBECK, F. Neurally mediated contraction of ileal longitudinal muscle by substance P. **Neurosci Lett**, v. 17, n. 1-2, p. 101-5, Apr 1980. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189007> >.
- HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Substance P can contract the longitudinal muscle of the guinea-pig small intestine by releasing intracellular calcium. **Br J Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 259-67, May 1984. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6203591> >.
- HOLZER, P.; LIVINGSTON, E. H.; GUTH, P. H. Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. **Gastroenterology**, v. 101, n. 2, p. 416-23, Aug 1991. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065919> >.
- HONG, L. et al. Timing of fluoride intake in relation to development of fluorosis on maxillary central incisors. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 34, n. 4, p. 299-309, Aug 2006. ISSN 0301-5661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16856950> >.
- HORTON, K. M.; ABRAMS, R. A.; FISHMAN, E. K. Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. **Radiographics**, v. 20, n. 2, p. 419-30, 2000 Mar-Apr 2000. ISSN 0271-5333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10715340> >.
- HRYHORENKO, L. M.; WOSKOWSKA, Z.; FOX-THRELKELD, J. A. Nitric oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum: relationship to motility and release of nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 271, n. 2, p. 918-26, Nov 1994. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965813> >.
- HU, B. R. et al. Protein aggregation after transient cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 20, n. 9, p. 3191-9, May 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777783> >.
- HU, Y. H.; WU, S. S. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 51, n. 12, p. 1591-3, Dec 1988. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3221229> >.
- HUANG, W. et al. Lentivirus-mediated gene silencing of NOB1 suppresses non-small cell lung cancer cell proliferation. **Oncol Rep**, v. 34, n. 3, p. 1510-6, Sep 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26178254> >.
- HUITOREL, P.; PANTALONI, D. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. **Eur J Biochem**, v. 150, n. 2, p. 265-9, Jul 1985. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4018083> >.

Referências

-
- HUIZINGA, J. D. et al. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 347-9, Jan 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530333> >.
- HUMPHRIES, C. L. et al. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. **J Cell Biol**, v. 159, n. 6, p. 993-1004, Dec 2002. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499356> >.
- HÖKFELT, T. et al. Peptidergic neurones. **Nature**, v. 284, p. 515-521, 1980.
- ICHIKAWA, S. et al. Immunohistochemical localization of peptidergic nerve fibers and neuropeptide receptors in Peyer's patches of the cat ileum. **Regul Pept**, v. 54, n. 2-3, p. 385-95, Dec 1994. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536334> >.
- ICHIMURA, T. et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 19, p. 7084-8, Oct 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2902623> >.
- _____. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. **FEBS Lett**, v. 219, n. 1, p. 79-82, Jul 1987. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2885229> >.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, Dec 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2827174> >.
- IHEOZOR-EJIOFOR, Z. et al. Water fluoridation for the prevention of dental caries. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 6, p. CD010856, Jun 2015. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092033> >.
- IIZUMI, G. et al. Proteomic characterization of the site-dependent functional difference in the rat small intestine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1774, n. 10, p. 1289-98, Oct 2007. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881305> >.
- IKUTA, J. et al. Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 1, p. 127-32, Feb 2 2007. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173861> >.
- INKIELEWICZ-STEPNIAK, I.; CZARNOWSKI, W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 6, p. 1607-11, Jun 2010. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347920> >.
- ISAACSON, R. L.; VARNER, J. A.; JENSEN, K. F. Toxin-induced blood vessel inclusions caused by the chronic administration of aluminum and sodium fluoride and their implications for dementia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 825, p. 152-66, Oct 1997. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369984> >.
- JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a neural messenger. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 11, p. 417-40, 1995. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689564> >.
-

- JAGANNATHAN, R. et al. AT1 receptor induced alterations in histone H2A reveal novel insights into GPCR control of chromatin remodeling. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12552, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838438> >.
- JANSSEN, G. M.; MÖLLER, W. Kinetic studies on the role of elongation factors 1 beta and 1 gamma in protein synthesis. **J Biol Chem**, v. 263, n. 4, p. 1773-8, Feb 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3338993> >.
- JARVINEN, M. K. et al. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anat Embryol (Berl)**, v. 199, n. 2, p. 99-112, Feb 1999. ISSN 0340-2061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930618> >.
- JAYACHANDRAN, R. et al. Coronin 1 regulates cognition and behavior through modulation of cAMP/protein kinase A signaling. **PLoS Biol**, v. 12, n. 3, p. e1001820, Mar 2014. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667537> >.
- JIA, S. et al. Protein phosphatase 4 cooperates with Smads to promote BMP signaling in dorsoventral patterning of zebrafish embryos. **Dev Cell**, v. 22, n. 5, p. 1065-78, May 2012. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22595677> >.
- JIANG, P. et al. The small intestine proteome is changed in preterm pigs developing necrotizing enterocolitis in response to formula feeding. **J Nutr**, v. 138, n. 10, p. 1895-901, Oct 2008. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806098> >.
- JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, Dec 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471242> >.
- JOHNSON, J. A. et al. Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. **J Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 2013-23, May 1993. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478688> >.
- JOHNSON, P. J. et al. Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the guinea-pig ileum. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 4, p. 973-83, Jun 1996. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799571> >.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 12th. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAFER, G. R.; CARLTON, P. M.; LEHNERT, S. A. The histone variant H2A.Z is dynamically expressed in the developing mouse placenta and in differentiating trophoblast stem cells. **Placenta**, Sep 2015. ISSN 1532-3102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26363621> >.
- KAMINSKY, L. S.; ZHANG, Q. Y. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 12, p. 1520-5, Dec 2003. ISSN 0090-9556. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625348> >.
- KAN, K. S.; CHAO, L. P.; FORNO, L. S. Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the human cerebellum. **Brain Res**, v. 193, n. 1, p. 165-71, Jul 1980. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991056> >.
- KANG, B. et al. Phosphorylation of H4 Ser 47 promotes HIRA-mediated nucleosome assembly. **Genes Dev**, v. 25, n. 13, p. 1359-64, Jul 2011. ISSN 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724829> >.

-
- KANG, P. J. et al. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 137-43, Nov 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234077> >.
- KARAOSMANOGLU, T. et al. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. **Anat Rec**, v. 244, p. 470-80, 1996.
- KARMELI, F. et al. Gastric mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. **Gastroenterology**, v. 100, n. 5 Pt 1, p. 1206-16, May 1991. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707383> >.
- KASASHIMA, K. et al. Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation. **Genes Cells**, v. 4, n. 11, p. 667-83, Nov 1999. ISSN 1356-9597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620013> >.
- KATADA, E. et al. Neuronal distribution and subcellular localization of HCNP-like immunoreactivity in rat small intestine. **J Neurocytol**, v. 29, n. 3, p. 199-207, Mar 2000. ISSN 0300-4864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11428049> >.
- KAUR, T.; BIJARNIA, R. K.; NEHRU, B. Effect of concurrent chronic exposure of fluoride and aluminum on rat brain. **Drug Chem Toxicol**, v. 32, n. 3, p. 215-21, 2009. ISSN 1525-6014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538017> >.
- KAWASAKI, H. Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. **Jpn J Pharmacol**, v. 88, n. 1, p. 39-43, Jan 2002. ISSN 0021-5198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11855676> >.
- KEEF, K. D. et al. Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1303-14, Nov 1994. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870287> >.
- KENNEDY, S. The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. **Biomarkers**, v. 7, n. 4, p. 269-90, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 1354-750X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171755> >.
- KENT, A. J.; BANKS, M. R. Pharmacological management of diarrhea. **Gastroenterol Clin N Am**, v. 39, p. 495-507, 2010.
- KERÄNEN, U. et al. Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. **J Auton Nerv Syst**, v. 54, n. 3, p. 177-83, Sep 1995. ISSN 0165-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7490419> >.
- KETTERER, B. T., K. H. MEYER, D. J. COLES, B. Glutathione S-transferase: possible role in detoxification of DNA and lipid hydroperoxides. In: MANTLE, T. J.; PICKETT, C. B., et al (Ed.). **Glutathione S-transferases and carcinogenesis**. London: Taylor and Francis, 1987. p.149-163.
- KILBINGER, H. et al. Nitrergic modulation of acetylcholine release in the enteric nervous system: differences between guinea-pig and man. **Inflammopharmacology**, v. 10, n. 4-6, p. 461-469, 2002.
-

KILBINGER, H.; WOLF, D. Increase by NO synthase inhibitors of acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 349, n. 5, p. 543-5, May 1994. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520537> >.

KIM, B. J. et al. Involvement of Na(+)-leak channel in substance P-induced depolarization of pacemaking activity in interstitial cells of Cajal. **Cell Physiol Biochem**, v. 29, n. 3-4, p. 501-10, 2012. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508057> >.

KIM, H.; HWAN KIM, K. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 200-7, May 2001. ISSN 0031-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359995> >.

KIM, H.; PAGE, G. P.; BARNES, S. Proteomics and mass spectrometry in nutrition research. **Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 155-65, Jan 2004. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698031> >.

KIMURA, H. et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. **Gut**, v. 42, n. 2, p. 180-7, Feb 1998. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9536941> >.

KLEIN, J. B.; THONGBOONKERD, V. Proteomics in Nephrology. In: THONGBOONKERD, V. e KLEIN, J. B. (Ed.). **Overview of proteomics**. Basel: Karger, v.141, 2004. p.1-10.

KLEMMER, P. J.; HADLER, N. M. Subacute fluorosis: a consequence of abuse of an organofluoride anesthetic. **Ann Intern Med**, v. 89, n. 5 Pt 1, p. 607-11, Nov 1978. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/717928> >.

KOBAYASHI, C. A. et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. **Chem Biol Interact**, v. 180, n. 2, p. 305-11, Jul 2009. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497429> >.

KOCH, T. R.; CARNEY, J. A.; GO, V. L. Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. **Dig Dis Sci**, v. 32, n. 4, p. 369-76, Apr 1987. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2435473> >.

KOON, H. W.; POTHOUKAKIS, C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1088, p. 23-40, Nov 2006. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192554> >.

KOSCHNY, R. et al. Fatal course of a suicidal intoxication with hydrochloric Acid. **Case Rep Gastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 89-96, Jan 2013. ISSN 1662-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569439> >.

KOZIELSKI, F. et al. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 985-94, Dec 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428521> >.

KRELLMAN, J. W. et al. Behavioral and neuroanatomical abnormalities in pleiotrophin knockout mice. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e100597, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000129> >.

Referências

-
- KRISHNAMACHARI, K. A. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. **Prog Food Nutr Sci**, v. 10, n. 3-4, p. 279-314, 1986. ISSN 0306-0632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3295994> >.
- KUBES, P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. **Am J Physiol**, v. 262, n. 6 Pt 1, p. G1138-42, Jun 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616043> >.
- KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am J Med**, v. 109, n. 2, p. 150-8, Aug 2000. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967157> >.
- KUMAR, A. Fatality due to sodium fluoride ingestion – suicide or accident? **Can. Soc. Forensic Sci. J.**, v. 42, p. 69-74, 2009.
- KUNZE, W. A.; FURNESS, J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 117-42, 1999. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099684> >.
- KURJAK, M. et al. Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. **J Physiol**, v. 534, n. Pt 3, p. 827-36, Aug 2001. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483712> >.
- KUSAO, I.; TROELSTRUP, D.; SHIRAMIZU, B. Possible Mitochondria-Associated Enzymatic Role in Non-Hodgkin Lymphoma Residual Disease. **Cancer Growth Metastasis**, v. 1, p. 3-8, Nov 2008. ISSN 1179-0644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936279> >.
- KUWAHARA, A.; KURAMOTO, H.; KADOWAKI, M. 5-HT activates nitric oxide-generating neurons to stimulate chloride secretion in guinea pig distal colon. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 1, p. G829-34, Oct 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756515> >.
- KUŹMA-KOZAKIEWICZ, M. et al. Changes in kinesin expression in the CNS of mice with dynein heavy chain 1 mutation. **Acta Biochim Pol**, v. 60, n. 1, p. 51-5, 2013. ISSN 1734-154X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460941> >.
- LAPAILLE, M. et al. Loss of mitochondrial ATP synthase subunit beta (Atp2) alters mitochondrial and chloroplastic function and morphology in Chlamydomonas. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 8, p. 1533-9, Aug 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416275> >.
- LARSSON, L. I. et al. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 9, p. 3197-200, Sep 1976. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/787988> >.
- LE SOURD, F. et al. eEF1B: At the dawn of the 21st century. **Biochim Biophys Acta**, v. 1759, n. 1-2, p. 13-31, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624425> >.
- LEACH, T. J. et al. Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 30, p. 23267-72, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801889> >.
-

- LECH, T. Fatal cases of acute suicidal sodium and accidental zinc fluorosilicate poisoning. Review of acute intoxications due to fluoride compounds. **Forensic Sci Int**, v. 206, n. 1-3, p. e20-4, Mar 2011. ISSN 1872-6283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655674> >.
- LEFEBVRE, R. A.; DE VRIESE, A.; SMITS, G. J. Influence of vasoactive intestinal polypeptide and NG-nitro-L-arginine methyl ester on cholinergic neurotransmission in the rat gastric fundus. **Eur J Pharmacol**, v. 221, n. 2-3, p. 235-42, Oct 1992. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330623> >.
- LEFEBVRE, R. A.; SMITS, G. J.; TIMMERMANS, J. P. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. **Br J Pharmacol**, v. 116, n. 3, p. 2017-26, Oct 1995. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640340> >.
- LEITE, A. E. L. 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**, v. 26, n. 5, p. 435-40, May 2007. ISSN 0960-3271. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623768> >.
- LEITE, A. L. **Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda de flúor**. 2010. (Mestrado). Biological Sciences, Universidade de São Paulo, Bauru.
- LEITNER, A. et al. The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. **Structure**, v. 20, n. 5, p. 814-25, May 2012. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503819> >.
- LEVY, S. M.; KIRITSY, M. C.; WARREN, J. J. Sources of fluoride intake in children. **J Public Health Dent**, v. 55, n. 1, p. 39-52, 1995. ISSN 0022-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7776292> >.
- LEW, Y. et al. Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. **Pancreas**, v. 7, n. 2, p. 144-52, 1992. ISSN 0885-3177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372736> >.
- LI, C. et al. Substance P is essential for maintaining gut muscle contractility: a novel role for coneurotransmission revealed by botulinum toxin. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 306, n. 10, p. G839-48, May 2014. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699329> >.
- LI, C. G.; RAND, M. J. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. **Eur J Pharmacol**, v. 191, n. 3, p. 303-9, Dec 1990. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1964906> >.
- LI, Y. et al. The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells. **Neuropeptides**, v. 31, n. 5, p. 503-9, Oct 1997. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413029> >.
- LI, Y. S. et al. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1690-4, Dec 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2270483> >.
- LI, Z. S.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 294, n. 1, p. 35-43, Oct 1998. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724454> >.

-
- LIANG, Y.; ACKERMAN, S. H. Characterization of mutations in the beta subunit of the mitochondrial F1-ATPase that produce defects in enzyme catalysis and assembly. **J Biol Chem**, v. 271, n. 43, p. 26522-8, Oct 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900121> >.
- LIDBECK, W. L.; HILL, I. B.; BEEMAN, J. A. Acute sodium fluoride poisoning. **JAMA**, v. 121, n. 11, p. 826-827, 1943.
- LIN, C. S. et al. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. **J Biol Chem**, v. 268, n. 4, p. 2781-92, Feb 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428952> >.
- _____. Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 2457-67, Apr 1994. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139549> >.
- LIN, Z. et al. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol Motil**, v. 14, n. 2, p. 197-204, Apr 2002. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975720> >.
- LIN, Z.; SANDGREN, K.; EKBLAD, E. Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine. **Auton Neurosci**, v. 107, n. 1, p. 9-19, Aug 2003. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927222> >.
- _____. Increased expression of nitric oxide synthase in cultured neurons from adult rat colonic submucous ganglia. **Auton Neurosci**, v. 114, n. 1-2, p. 29-38, Jul 2004. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331042> >.
- LINDEN, D. R. Colitis is associated with a loss of intestinofugal neurons. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, n. 10, p. G1096-104, Nov 2012. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997196> >.
- LINDEN, D. R. et al. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. **Neurogastroenterol Motil**, v. 17, n. 5, p. 751-60, Oct 2005. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185315> >.
- LINDESTROM, L. M.; EKBLAD, E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 7-8, p. 1212-22, Aug 2004. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15387349> >.
- LINDHOLM, D.; WOOTZ, H.; KORHONEN, L. ER stress and neurodegenerative diseases. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 3, p. 385-92, Mar 2006. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397584> >.
- LIU, K. X. et al. Proteomic analysis of intestinal ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning in rats reveals the protective role of aldose reductase. **Proteomics**, v. 10, n. 24, p. 4463-75, Dec 2010. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21136599> >.
- LLEWELLYN-SMITH, I. J. Neuropeptides and the microcircuitry of the enteric nervous system. **Experientia**, v. 43, n. 7, p. 813-21, Jul 1987. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3595799> >.
-

- LLEWELLYN-SMITH, I. J.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. Ultrastructural analysis of substance P-immunoreactive nerve fibers in myenteric ganglia of guinea pig small intestine. **J Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 167-74, Jan 1989. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464046> >.
- LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Substance P-containing nerves in the human small intestine. Distribution, ultrastructure, and characterization of the immunoreactive peptide. **Gastroenterology**, v. 86, n. 3, p. 421-35, Mar 1984. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6198237> >.
- LOBO, J. G. et al. Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. **J Dent Res**, v. 94, n. 7, p. 990-7, Jul 2015. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861800> >.
- LODISH, H. et al. Myosin: The Actin Motor Protein. In: FREEMAN, W. H. (Ed.). **Molecular Cell Biology**. New York, 2000.
- LOMAX, A. E.; FERNÁNDEZ, E.; SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterol Motil**, v. 17, n. 1, p. 4-15, Feb 2005. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670258> >.
- LOMAX, A. E.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell Tissue Res**, v. 302, n. 1, p. 59-72, Oct 2000. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079716> >.
- LOMAX, A. E. et al. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. **Auton Neurosci**, v. 126-127, p. 250-7, Jun 2006. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616704> >.
- LONG, Y. G. et al. Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 6, p. 751-7, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460657> >.
- LOPES, C. R. et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 12, p. 3106-15, Dec 2012. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878915> >.
- LOWREY, P. L. et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**, v. 288, n. 5465, p. 483-92, Apr 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775102> >.
- LU, F. et al. RACK1 downregulation suppresses migration and proliferation of neuroblastoma cell lines. **Oncol Rep**, v. 27, n. 5, p. 1646-52, May 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246531> >.
- LU, Y. et al. Study of cognitive function impairment caused by fluorosis. **Fluoride**, v. 33, p. 74-8, 2000.
- LUND, E. G.; COLLAS, P.; DELBARRE, E. Transcription outcome of promoters enriched in histone variant H3.3 defined by positioning of H3.3 and local chromatin marks. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, n. 2, p. 348-53, May 2015. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783056> >.

Referências

-
- LUNDY, F. T.; LINDEN, G. J. NEUROPEPTIDES AND NEUROGENIC MECHANISMS IN ORAL AND PERIODONTAL INFLAMMATION. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 2, p. 82-98, 2004. ISSN 1544-1113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059944> >.
- LYON, A. N. et al. Calcium binding is essential for plastin 3 function in Smn-deficient motoneurons. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 8, p. 1990-2004, Apr 2014. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271012> >.
- MACARI, M.; MEGIBOW, A. J.; BALTHAZAR, E. J. A pattern approach to the abnormal small bowel: observations at MDCT and CT enterography. **AJR Am J Roentgenol**, v. 188, n. 5, p. 1344-55, May 2007. ISSN 1546-3141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449781> >.
- MACNEIL, A. J.; YANG, Y. J.; LIN, T. J. MAPK kinase 3 specifically regulates Fc epsilonRI-mediated IL-4 production by mast cells. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 3374-82, Sep 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841136> >.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Porto alegre, RS, Brasil: Artmed Editora SA, 2010.
- MAGGI, C. A.; HOLZER, P.; GIULIANI, S. Effect of omega-conotoxin on cholinergic and tachykinergic excitatory neurotransmission to the circular muscle of the guinea-pig colon. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 350, n. 5, p. 529-36, Nov 1994. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532790> >.
- MAGGI, C. A. et al. Calcitonin gene-related peptide activates non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of the rat isolated duodenum. **J Pharm Pharmacol**, v. 39, n. 4, p. 327-8, Apr 1987. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2884305> >.
- MAGGI, C. A.; MELI, A.; SANTICIOLI, P. Four motor effects of capsaicin on guinea-pig distal colon. **Br J Pharmacol**, v. 90, n. 4, p. 651-60, Apr 1987. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2884004> >.
- MAGGI, C. A. et al. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. **J Auton Pharmacol**, v. 13, n. 1, p. 23-93, Feb 1993. ISSN 0144-1795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382703> >.
- MAKI, M. et al. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 61, n. 2, p. 176-85, Feb 2002. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853019> >.
- MAKINO, A. et al. O-GlcNAcase overexpression reverses coronary endothelial cell dysfunction in type 1 diabetic mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, p. ajpcell.00069.2015, Aug 2015. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269457> >.
- MALLICK, I. H. et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 9, p. 1359-77, Sep 2004. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481305> >.
- MANDELKOW, E.; HOENGER, A. Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 1, p. 34-44, Feb 1999. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047529> >.
-

- MANG, C. F. et al. Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, n. 5, p. G1132-8, Nov 2002. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381527> >.
- MANN, P. T.; FURNESS, J. B.; SOUTHWELL, B. R. Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. **Cell Tissue Res**, v. 297, n. 2, p. 241-8, Aug 1999. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470494> >.
- MANTYH, C. R. et al. Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 9, p. 3235-9, May 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2834738> >.
- MANÇANARES, A. C. F. **Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos**. 2012. (Masters). Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP.
- MARCHIONINI, D. M. et al. Role of heparin binding growth factors in nigrostriatal dopamine system development and Parkinson's disease. **Brain Res**, v. 1147, p. 77-88, May 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368428> >.
- MARESE, A. C.; DE FREITAS, P.; NATALI, M. R. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Auton Neurosci**, v. 137, n. 1-2, p. 10-8, Dec 2007. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574931> >.
- MARGOLIS, K. G. et al. Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 588-98, 598.e1-2, Aug 2011. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635893> >.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**, v. 268, n. 17, p. 12231-4, Jun 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685338> >.
- _____. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-30, Sep 1994. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522970> >.
- MAROSTI, A. R. et al. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X2 receptors. **Histol Histopathol**, Nov 2014. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25400134> >.
- MARRUCHELLA, G. et al. Enteroglial and neuronal involvement without apparent neuron loss in ileal enteric nervous system plexuses from scrapie-affected sheep. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 10, p. 2899-904, Oct 2007. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872545> >.
- MARSHALL, T. A. et al. Associations between Intakes of fluoride from beverages during infancy and dental fluorosis of primary teeth. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 2, p. 108-16, Apr 2004. ISSN 0731-5724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047676> >.
- MARTIN, S. L. et al. Proteomic analysis of the winter-protected phenotype of hibernating ground squirrel intestine. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 1, p. R316-28, Jul 2008. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434441> >.

Referências

-
- MARTINEZ, M. A. et al. The tissue distribution of fluoride in a fatal case of self-poisoning. **J. Anal. Toxicol.**, v. 31, p. 526–533, 2007.
- MARTÍN, M. J.; JIMÉNEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 10, p. 881-908, Jul 2001. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472246> >.
- MARUSICH, M. F. et al. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. **J Neurobiol**, v. 25, n. 2, p. 143-55, Feb 1994. ISSN 0022-3034. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517436> >.
- MARVIN-GUY, L. et al. Proteomics of the rat gut: analysis of the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2561-9, Jul 2005. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984044> >.
- MASHIMO, H. et al. Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. **J Clin Invest**, v. 98, n. 1, p. 8-13, Jul 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690808> >.
- MATSUI, S. et al. Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acetylcholine-induced sweating via GSK3 β activation. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 2, p. 326-34, Feb 2014. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900020> >.
- MAWE, G. M. et al. Immunocytochemical analysis of potential neurotransmitters present in the myenteric plexus and muscular layers of the corpus of the guinea pig stomach. **Anat Rec**, v. 224, n. 3, p. 431-42, Jul 1989. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476950> >.
- MAZE, I. et al. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 4, p. 259-71, Apr 2014. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614311> >.
- MAZZUOLI, G. et al. Morphology and neurochemistry of descending and ascending myenteric plexus neurons of sheep ileum. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 290, n. 12, p. 1480-91, Dec 2007. ISSN 1932-8486. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972278> >.
- MCCAFFERTY, D. M. et al. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut**, v. 45, n. 6, p. 864-73, Dec 1999. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562585> >.
- MCDONALD, T. J. et al. Canine myenteric, deep muscular, and submucosal plexus preparations of purified nerve varicosities: content and chromatographic forms of certain neuropeptides. **Peptides**, v. 11, n. 1, p. 95-102, 1990 Jan-Feb 1990. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342994> >.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G.; PENG, J. H. Choline acetyltransferase: purification and immunohistochemical localization. **Life Sci**, v. 34, n. 24, p. 2319-38, Jun 1984. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6374351> >.
- MCHUGH, K. M.; LESSARD, J. L. The development expression of the rat alpha-vascular and gamma-enteric smooth muscle isoactins: isolation and characterization of a rat gamma-enteric actin cDNA. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 5224-31, Dec 1988. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3244353> >.
-

- MCKNIGHT, N. C. et al. Genome-wide siRNA screen reveals amino acid starvation-induced autophagy requires SCOC and WAC. **EMBO J**, v. 31, n. 8, p. 1931-46, Apr 2012. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22354037> >.
- MCPHERSON, P. S. et al. p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation. **J Biol Chem**, v. 269, n. 48, p. 30132-9, Dec 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982917> >.
- MEANEY, C.; O'DRISCOLL, C. Mucus as a barrier to the permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in the absence and presence of sodium taurocholate micellar systems using cell culture models. **Eur J Pharm Sci**, v. 8, n. 3, p. 167-75, Jul 1999. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379039> >.
- MENDEL-HARTVIG, J.; CAPALDI, R. A. Nucleotide-dependent and dicyclohexylcarbodiimide-sensitive conformational changes in the epsilon subunit of Escherichia coli ATP synthase. **Biochemistry**, v. 30, n. 45, p. 10987-91, Nov 1991. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1834172> >.
- MENDONÇA, S. et al. Prevalence of Helicobacter pylori resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, v. 5, n. 2, p. 79-83, Jun 2000. ISSN 1083-4389. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849055> >.
- MESSER, H. H.; OPHAUG, R. Effect of delayed gastric emptying on fluoride absorption in the rat. **Biol Trace Elem Res**, v. 31, n. 3, p. 305-15, Dec 1991. ISSN 0163-4984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723619> >.
- MESSER, H. H.; OPHAUG, R. H. Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. **J Dent Res**, v. 72, n. 3, p. 619-22, Mar 1993. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8383710> >.
- MI, R.; CHEN, W.; HÖKE, A. Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 11, p. 4664-9, Mar 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360581> >.
- MIACZYNSKA, M. et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. **Cell**, v. 116, n. 3, p. 445-56, Feb 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016378> >.
- MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, K. A. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. **Neurogastroenterol Motil**, v. 11, n. 3, p. 193-206, Jun 1999. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354344> >.
- MILGROM, P. et al. Pharmacokinetics of fluoride in toddlers after application of 5% sodium fluoride dental varnish. **Pediatrics**, v. 134, n. 3, p. e870-4, Sep 2014. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136045> >.
- MILLER, M. J. et al. Substance P levels in experimental ileitis in guinea pigs: effects of misoprostol. **Am J Physiol**, v. 265, n. 2 Pt 1, p. G321-30, Aug 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690187> >.
- MIMORI, K. et al. Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma. **Gut**, v. 38, n. 1, p. 66-70, Jan 1996. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566862> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. **Guia de recomendações para o uso dos fluoretos no Brasil**. DEPARTAMENTO, S. D. A. À. S.-. 2009.

MINOWA, T. et al. Proteomic analysis of the small intestine and colon epithelia of adenomatous polyposis coli gene-mutant mice by two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 9, p. 1782-6, May 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10870965> >.

MITSUI, G. et al. Harmful effects and acute lethal toxicity of intravenous administration of low concentrations of hydrofluoric acid in rats. **Toxicol Ind Health**, v. 23, n. 1, p. 5-12, Feb 2007. ISSN 0748-2337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722734> >.

MITSUI, R. Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 2, p. 331-41, Feb 2011. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104189> >.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753454> >.

MONGARDI FANTAGUZZI, C. et al. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. **Cell Tissue Res**, v. 336, n. 2, p. 179-89, May 2009. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19326148> >.

MORAES-FILHO, J. P. et al. Comorbidities are frequent in patients with gastroesophageal reflux disease in a tertiary health care hospital. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 8, p. 785-90, 2009. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690664> >.

MOREIRA, M. D. et al. Regenerative process evaluation of neuronal subclasses in chagasic patients with megacolon. **Hum Immunol**, v. 74, n. 2, p. 181-8, Feb 2013. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220499> >.

MORERO, R. D. et al. Fusion of phospholipid vesicles induced by muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the absence of calcium. **Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1904-9, Apr 1985. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4016090> >.

MORGAN, A.; BURGOYNE, R. D. Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. **Nature**, v. 355, n. 6363, p. 833-6, Feb 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538762> >.

MUELLER, D. M. Partial assembly of the yeast mitochondrial ATP synthase. **J Bioenerg Biomembr**, v. 32, n. 4, p. 391-400, Aug 2000. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768301> >.

MULHOLLAND, M. W.; JAFFER, S. Stimulation of acetylcholine release in myenteric plexus by calcitonin gene-related peptide. **Am J Physiol**, v. 259, n. 6 Pt 1, p. G934-9, Dec 1990. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1701974> >.

MULLENIX, P. J. et al. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. **Neurotoxicol Teratol**, v. 17, n. 2, p. 169-77, 1995 Mar-Apr 1995. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7760776> >.

- MULÈ, F. et al. Myogenic NOS and endogenous NO production are defective in colon from dystrophic (mdx) mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, n. 5, p. G1264-70, Nov 2001. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11668035> >.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J Clin Invest**, v. 78, n. 1, p. 1-5, Jul 1986. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2873150> >.
- MURAKAMI, K.; SITU, S. Y.; ESHETE, F. A gene variation of 14-3-3 zeta isoform in rat hippocampus. **Gene**, v. 179, n. 2, p. 245-9, Nov 1996. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8972907> >.
- MURIALE, L. et al. Fatality due to acute fluoride poisoning following dermal contact with hydrofluoric acid in a palynology laboratory. **Ann Occup Hyg**, v. 40, n. 6, p. 705-10, Dec 1996. ISSN 0003-4878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8958774> >.
- MURTHY, K. S. et al. Interplay of VIP and nitric oxide in the regulation of neuromuscular function in the gut. **Ann N Y Acad Sci**, v. 805, p. 355-62; discussion 362-3, Dec 1996. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993416> >.
- MUSUNURU, K.; DARNELL, R. B. Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 239-62, 2001. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283311> >.
- MYERS, B. S. et al. Acute experimental distal colitis alters colonic transit in rats. **J Surg Res**, v. 69, n. 1, p. 107-12, Apr 1997. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202655> >.
- NABAVI, S. F. et al. Protective effects of curcumin against fluoride-induced oxidative stress in the rat brain. **Neurophysiology**, v. 43, n. 4, p. 287-291, 2011.
- _____. Protective role of gallic acid on sodium fluoride induced oxidative stress in rat brain. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 89, n. 1, p. 73-7, Jul 2012. ISSN 1432-0800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531840> >.
- NAGASHIO, R. et al. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. **Lung Cancer**, v. 69, n. 1, p. 54-9, Jul 2010. ISSN 1872-8332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892429> >.
- NAKAJIMA, H. et al. The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. **J Biol Chem**, v. 282, n. 36, p. 26562-74, Sep 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613523> >.
- NAKAJIMA, K. et al. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. **J Chem Neuroanat**, v. 18, n. 1-2, p. 31-40, Feb 2000. ISSN 0891-0618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708917> >.
- NAL, B. et al. Coronin-1 expression in T lymphocytes: insights into protein function during T cell development and activation. **Int Immunol**, v. 16, n. 2, p. 231-40, Feb 2004. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734608> >.

-
- NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 5, p. 381-92, 2000.
- NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84-90, Jan 2003. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477766> >.
- NIEMANTSVERDRIET, M. et al. Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character. **Oncogene**, v. 27, n. 9, p. 1315-9, Feb 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704798> >.
- NIH. **Opportunities and Challenges in Digestive Diseases Research: Recommendations of the National Commission on Digestive Diseases**. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, U. S. D. O. H. A. H. S. Bethesda, MD: National Institutes of Health. 08: 6514 p. 2009.
- NISHI, S.; NORTH, R. A. Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **J Physiol**, v. 231, n. 3, p. 471-91, Jun 1973. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4783093> >.
- NISHIDA, W.; KITAMI, Y.; HIWADA, K. cDNA cloning and mRNA expression of calponin and SM22 in rat aorta smooth muscle cells. **Gene**, v. 130, n. 2, p. 297-302, Aug 1993. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359698> >.
- NIU, R. et al. Proteomic analysis of hippocampus in offspring male mice exposed to fluoride and lead. **Biol Trace Elem Res**, v. 162, n. 1-3, p. 227-33, Dec 2014. ISSN 1559-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260320> >.
- NIU, R. Y. et al. Effects of fluoride and lead on locomotor behavior and expression of Nissl body in brain of adult rats. **Fluoride**, v. 41, p. 276-82,
- _____. Effects of fluoride and lead on locomotor behavior and expression of Nissl body in brain of adult rats. **Fluoride**, v. 41, p. 276-82, 2008.
- NOJI, H. et al. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. **Nature**, v. 386, n. 6622, p. 299-302, Mar 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9069291> >.
- NOMURA, Y. [Cellular and molecular pharmacological studies on membrane receptor-signaling and stress-responses in the brain]. **Yakugaku Zasshi**, v. 121, n. 12, p. 899-908, Dec 2001. ISSN 0031-6903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766404> >.
- NOPAKUN, J.; MESSER, H. H. Mechanism of fluoride absorption from the rat small intestine. **Nutrition Research**, v. 10, p. 771-780, 1990.
- NOPAKUN, J.; MESSER, H. H.; VOLLER, V. Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. **J Nutr**, v. 119, n. 10, p. 1411-7, Oct 1989. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2585131> >.
- NOVOTNY, A. et al. Is acetylcholine a signaling molecule for human colon cancer progression? **Scand J Gastroenterol**, v. 46, n. 4, p. 446-55, Apr 2011. ISSN 1502-7708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265716> >.
- OGNIBENE, M. et al. Identification of a novel mouse Dbl proto-oncogene splice variant: evidence that SEC14 domain is involved in GEF activity regulation. **Gene**, v. 537, n. 2, p. 220-9, Mar 2014. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412292> >.
-

- OHTANI, R. et al. Localization of calcitonin gene-related peptide in the small intestine of various vertebrate species. **Cell Tissue Res**, v. 258, n. 1, p. 35-42, Oct 1989. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680100> >.
- OKANO, H. J.; DARNELL, R. B. A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. **J Neurosci**, v. 17, n. 9, p. 3024-37, May 1997. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096138> >.
- OKISHIO, Y. et al. Examination of the role of cholinergic myenteric neurons with the impairment of neural reflexes in the ileum of c-kit mutant mice. **J Smooth Muscle Res**, v. 41, n. 1, p. 49-60, Feb 2005. ISSN 0916-8737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855739> >.
- OKU, T. et al. Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. **Biochem J**, v. 387, n. Pt 2, p. 325-31, Apr 2005. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601263> >.
- OPREA, G. E. et al. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. **Science**, v. 320, n. 5875, p. 524-7, Apr 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440926> >.
- ORGANIZATION, W. H. **Environmental Health Criteria, Fluorides**. ORGANIZATION, W. H. Geneva 2002.
- ORSI, A. et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 10, p. 1860-73, May 2012. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456507> >.
- OSTE, M. et al. The intestinal trophic response to enteral food is reduced in parenterally fed preterm pigs and is associated with more nitrergic neurons. **J Nutr**, v. 135, n. 11, p. 2657-63, Nov 2005. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251626> >.
- OZAKI, H. et al. Cyclic AMP-mediated regulation of excitation-contraction coupling in canine gastric smooth muscle. **J Physiol**, v. 447, p. 351-72, Feb 1992. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317433> >.
- O'NEIL, M. J. et al. Fluorine. In: (Ed.). **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 13 th. NJ: Whitehouse Station, 2001. p.737.
- PALMER, J. M. et al. Calcitonin gene-related peptide excites myenteric neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 132, n. 2-3, p. 163-70, Dec 1986. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493162> >.
- PARAN, T. S.; ROLLE, U.; PURI, P. Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood. **Pediatr Surg Int**, v. 22, n. 12, p. 945-59, Dec 2006. ISSN 0179-0358. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001489> >.
- PARIS, F. et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 293-7, Jul 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452123> >.
- PARKINS, F. M. et al. Active transport of fluoride by the rat intestine in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 126, n. 3, p. 513-24, Nov 1966. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5965272> >.

-
- PAWLIK, W. W. et al. Role of calcitonin gene related peptide in the modulation of intestinal circulatory, metabolic, and myoelectric activity during ischemia/reperfusion. **J Physiol Pharmacol**, v. 51, n. 4 Pt 2, p. 933-42, Dec 2000. ISSN 0867-5910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11220500> >.
- PECKHAM, S.; AWOFOSE, N. Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 293019, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719570> >.
- PENDRYIS, D. G. Fluoride ingestion and oral health. **Nutrition**, v. 17, n. 11-12, p. 979-80, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744358> >.
- PENG, H. B. et al. The role of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in the postsynaptic induction in cultured muscle cells. **J Neurosci**, v. 15, n. 4, p. 3027-38, Apr 1995. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722643> >.
- PEREIRA, H. A. et al. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75343, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069403> >.
- _____. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75343, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069403> >.
- PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol Rev**, v. 35, n. 2, p. 85-141, Jun 1983. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6196797> >.
- PERRONE-BIZZOZERO, N.; BIRD, C. W. Role of HuD in nervous system function and pathology. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 5, p. 554-63, 2013. ISSN 1945-0524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277068> >.
- PERROT, A. et al. A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 118, n. 4, p. e1-15, Jul 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602524> >.
- PHILLIPS, R. J. et al. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. **J Neurosci Methods**, v. 133, n. 1-2, p. 99-107, Feb 2004. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757350> >.
- PIDSUDKO, Z. et al. Distribution and chemical coding of intramural neurons in the porcine ileum during proliferative enteropathy. **J Comp Pathol**, v. 138, n. 1, p. 23-31, Jan 2008. ISSN 0021-9975. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061202> >.
- PIERCE, W. M.; CAI, J. Applications of mass spectrometry in proteomics. **Contrib Nephrol**, v. 141, p. 40-58, 2004. ISSN 0302-5144. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14650224> >.
- PIMONT, S. et al. Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus. **Neurogastroenterol Motil**, v. 15, n. 6, p. 655-62, Dec 2003. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651601> >.
- PINZAGLIA, M. et al. EIF6 over-expression increases the motility and invasiveness of cancer cells by modulating the expression of a critical subset of membrane-bound proteins. **BMC Cancer**, v. 15, p. 131, 2015. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25886394> >.
-

- PLOURDE, V.; ST-PIERRE, S.; QUIRION, R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 1 Pt 1, p. G191-6, Jul 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252526> >.
- PORTBURY, A. L. et al. Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res**, v. 286, n. 3, p. 281-92, Dec 1996. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929331> >.
- _____. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. **J Anat**, v. 187 (Pt 2), p. 303-21, Oct 1995. ISSN 0021-8782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591994> >.
- PORTER, A. J. et al. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1916-23, Dec 1997. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394731> >.
- _____. Choline acetyltransferase immunoreactivity in the human small and large intestine. **Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 401-8, Aug 1996. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690205> >.
- POURESLAMI, H. R.; HORRI, A.; GARRUSIB, B. IQ of children age 7–9 in a high and a low F water city in Iran. **Fluoride**, v. 44, n. 3, p. 163-167, 2011.
- PRAHLAD, V. et al. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. **J Cell Biol**, v. 143, n. 1, p. 159-70, Oct 1998. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763428> >.
- PRIBILLA, D. Four cases of acute silicofluoride intoxication. **Fluoride**, v. 1, p. 103–108, 1968.
- PUBLIC HEALTH SERVICES, U. S. “**Review of Fluoride Benefits and Risks**: 17 p. 1991.
- PUBMED-TP53. TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]. p. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>, 2015.
- QI, J. et al. The E3 ubiquitin ligase Siah2 contributes to castration-resistant prostate cancer by regulation of androgen receptor transcriptional activity. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 332-46, Mar 2013. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518348> >.
- QU, Z. D. et al. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 334, n. 2, p. 147-61, Nov 2008. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855018> >.
- QUATTRONE, A. et al. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11668-73, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11573004> >.
- QUIGLEY, E. M. et al. Prevalence and management of abdominal cramping and pain: a multinational survey. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, n. 2, p. 411-9, Jul 2006. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842469> >.
- RAMIRES, I. et al. [External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 5, p. 883-9, Oct 2006. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301911> >.

-
- RAMJAUN, A. R.; MCPHERSON, P. S. Tissue-specific alternative splicing generates two synaptotagmin isoforms with differential membrane binding properties. **J Biol Chem**, v. 271, n. 40, p. 24856-61, Oct 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798761> >.
- RAMM, S. et al. Application of a discovery to targeted LC-MS proteomics approach to identify deregulated proteins associated with idiosyncratic liver toxicity in a rat model of LPS/diclofenac co-administration. **Toxicology**, v. 331, p. 100-11, May 2015. ISSN 1879-3185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772430> >.
- RAMÓN Y CAJAL, S. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés**. Paris: Maloine 1911.
- RANGASAMY, D. et al. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. **EMBO J**, v. 22, n. 7, p. 1599-607, Apr 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660166> >.
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. Oxidative stress indices in erythrocytes, liver, and kidneys of fluoride-exposed rabbits. **Fluoride**, v. 42, n. 2, p. 88-93, 2009.
- RASMUSSEN, T. N. et al. Calcitonin gene-related peptide: effect on contractile activity and luminal cross-sectional area in the isolated, perfused porcine ileum. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, n. 9, p. 787-92, Sep 1992. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1411287> >.
- _____. Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on motility and on the release of substance P, neurokinin A, somatostatin and gastrin in the isolated perfused porcine antrum. **Neurogastroenterol Motil**, v. 13, n. 4, p. 353-9, Aug 2001a. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576394> >.
- _____. Localisation and neural control of the release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from the isolated perfused porcine ileum. **Regul Pept**, v. 98, n. 3, p. 137-43, Apr 2001b. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231043> >.
- RAUD, J. et al. Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 180, n. 3, p. 1429-35, Nov 1991. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1719983> >.
- RAUVALA, H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. **EMBO J**, v. 8, n. 10, p. 2933-41, Oct 1989. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2583087> >.
- RAUVALA, H. et al. Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility. **Matrix Biol**, v. 19, n. 5, p. 377-87, Sep 2000. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980414> >.
- RAY, S. et al. Serum proteome analysis of vivax malaria: An insight into the disease pathogenesis and host immune response. **J Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 3063-80, Jun 2012. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086083> >.
- REDDY, P. Y.; REDDY, K. P.; KUMAR, K. P. Neurodegenerative changes in different regions of brain, spinal cord and sciatic nerve of rats treated with sodium fluoride. **Journal of Medical and Allied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.
-

- REDON, C. et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 2, p. 162-9, Apr 2002. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893489> >.
- REFSNES, M. et al. Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems. **Hum Exp Toxicol**, v. 22, n. 3, p. 111-23, Mar 2003. ISSN 0960-3271. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723891> >.
- _____. Mechanisms in fluoride-induced interleukin-8 synthesis in human lung epithelial cells. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 145-58, Oct 2001. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567778> >.
- REINDERS, J.; SICKMANN, A. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. **Biomol Eng**, v. 24, n. 2, p. 169-77, Jun 2007. ISSN 1389-0344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17419095> >.
- REISS, N. et al. Interaction of purified protein kinase C with key proteins of energy metabolism and cellular motility. **Biochem Mol Biol Int**, v. 38, n. 4, p. 711-9, Apr 1996. ISSN 1039-9712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728100> >.
- REN, W.; BAIG, A.; LI, S. K. Passive and iontophoretic transport of fluorides across enamel in vitro. **J Pharm Sci**, v. 103, n. 6, p. 1692-700, Jun 2014. ISSN 1520-6017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24715598> >.
- REYNOLDS, K. E.; WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H. Acute fluoride toxicity: the influence of acid-base status. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 45, n. 2, p. 415-27, Aug 1978. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30184> >.
- RICCIO, A. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 11, p. 1330-7, Nov 2010. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975757> >.
- RIDLEY, W.; MATSUOKA, M. Fluoride-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in A549 human pulmonary epithelial cells. **Toxicol Lett**, v. 188, n. 3, p. 180-5, Aug 2009. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376214> >.
- RIORDAN, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1066-73, Sep 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475911> >.
- RIVERA, L. R. et al. Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 2, p. 565-76, Aug 2012. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688956> >.
- _____. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. **Neurogastroenterol Motil**, v. 23, n. 11, p. 980-8, Nov 2011. ISSN 1365-2982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895878> >.
- ROBINOW, S. et al. The elav gene product of Drosophila, required in neurons, has three RNP consensus motifs. **Science**, v. 242, n. 4885, p. 1570-2, Dec 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3144044> >.

Referências

-
- ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 180-6, Apr 1997. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9069255> >.
- ROCHA, R. A.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D. In vitro study of intestinal transport of fluoride using the Caco-2 cell line. **Food Chem Toxicol**, v. 55, p. 156-63, May 2013. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291323> >.
- ROCHA, R. A.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. In vitro evaluation of intestinal fluoride absorption using different cell models. **Toxicol Lett**, v. 210, n. 3, p. 311-7, May 2012. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387159> >.
- ROCHA-AMADOR, D.; NAVARRO, M. E.; CARRIZALES, L. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 4, p. 579-587, 2007.
- RODRIGUES, M. L.; MOTTA, M. E. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **J Pediatr (Rio J)**, v. 88, n. 1, p. 17-24, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22344626> >.
- ROHOLM, K. **Fluorine intoxication: a clinical-hygienic study with a review of the literature and some experimental investigations.** . London: HK Lewis, 1937.
- ROLLE, U.; NEMETH, L.; PURI, P. Nitroergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood. **J Pediatr Surg**, v. 37, n. 4, p. 551-67, Apr 2002. ISSN 1531-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912511> >.
- ROSENFELD, M. G. et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, v. 304, n. 5922, p. 129-35, 1983 Jul 14-20 1983. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6346105> >.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum Reprod Update**, v. 4, n. 1, p. 3-24, 1998 Jan-Feb 1998. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622410> >.
- ROSTAM, M. A. et al. Peptidyl-prolyl isomerases: functionality and potential therapeutic targets in cardiovascular disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 2, p. 117-24, Feb 2015. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25377120> >.
- ROTHMAN, J. E. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. **Cell**, v. 59, n. 4, p. 591-601, Nov 1989. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573430> >.
- ROUCH, A. J.; WHITFORD, G. M.; CAMPBELL, H. T. Fluoride flux in the rabbit CCD: a pH-dependent event. **Kidney Int**, v. 41, n. 2, p. 342-9, Feb 1992. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1552707> >.
- RYBAKIN, V.; CLEMEN, C. S. Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. **Bioessays**, v. 27, n. 6, p. 625-32, Jun 2005. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892111> >.
- RYBAKIN, V. et al. Coronin 7, the mammalian POD-1 homologue, localizes to the Golgi apparatus. **FEBS Lett**, v. 573, n. 1-3, p. 161-7, Aug 2004. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327992> >.
-

- SAADY, J. J.; ROSE, C. S. A case of nonfatal sodium fluoride ingestion. **J Anal Toxicol**, v. 12, n. 5, p. 270-1, 1988 Sep-Oct 1988. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3226123> >.
- SABET SARVESTANI, F.; RAHMANIFAR, F.; TAMADON, A. Histomorphometric changes of small intestine in pregnant rat. **Vet Res Forum**, v. 6, n. 1, p. 69-73, 2015. ISSN 2008-8140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992254> >.
- SACK, S. et al. X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. **Biochemistry**, v. 36, n. 51, p. 16155-65, Dec 1997. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405049> >.
- SADEGHINEZHAD, J. et al. Neurochemistry of myenteric plexus neurons of bank vole (*Myodes glareolus*) ileum. **Res Vet Sci**, v. 95, n. 3, p. 846-53, Dec 2013. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969205> >.
- _____. Intrinsic innervation of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*) ileum. **Anat Histol Embryol**, v. 42, n. 3, p. 201-12, Jun 2013. ISSN 1439-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22943835> >.
- SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science**, v. 169, n. 3951, p. 1217-8, Sep 1970. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5450698> >.
- SAKAI, N. et al. p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. 6, p. 998-1004, Jun 2002. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032188> >.
- SAND, E. et al. Structural and functional consequences of busserelin-induced enteric neuropathy in rat. **BMC Gastroenterol**, v. 14, n. 1, p. 209, 2014 2014. ISSN 1471-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496312> >.
- SANDERS, J. et al. Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum. **J Cell Sci**, v. 109 (Pt 5), p. 1113-7, May 1996. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743958> >.
- SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am J Physiol**, v. 262, n. 3 Pt 1, p. G379-92, Mar 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347974> >.
- SANDGREN, K. et al. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture. **J Neurosci Res**, v. 72, n. 5, p. 595-602, Jun 2003. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749024> >.
- SANG, Q.; YOUNG, H. M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. **Cell Tissue Res**, v. 284, n. 1, p. 39-53, Apr 1996. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601295> >.
- _____. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. **Anat Rec**, v. 251, n. 2, p. 185-99, Jun 1998. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624448> >.

Referências

-
- SANTISTEBAN, M. S.; KALASHNIKOVA, T.; SMITH, M. M. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 411-22, Oct 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081628> >.
- SANTORO, S. W.; DULAC, C. Histone variants and cellular plasticity. **Trends Genet**, v. 31, n. 9, p. 516-27, Sep 2015. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299477> >.
- SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação e Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa**, 2001.
- SATO, T.; YOSHITAKE, K.; HITOMI, G. **Mecanism of fluoride absorption from the gastrointestinal tract in rats**. 14th Conference of the International Society for Fluoride Research. TSINUDA, H. e YU, M. H. Morioka-Japan: Elsevier Science Publisher 1985.
- SAVIDGE, T. C. S-nitrosothiol signals in the enteric nervous system: lessons learnt from big brother. **Front Neurosci**, v. 5, p. 31, 2011. ISSN 1662-453X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441985> >.
- SAVIDGE, T. C. et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1344-58, Apr 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408650> >.
- SAXENA, S.; SAHAY, A.; GOEL, P. Effect of fluoride exposure on the intelligence of school children in Madhya Pradesh, India. **J Neurosci Rural Pract**, v. 3, n. 2, p. 144-9, May 2012. ISSN 0976-3155. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865964> >.
- SAYEGH, A. I.; RITTER, R. C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 271, n. 1, p. 209-16, Mar 2003. ISSN 1552-4884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12552637> >.
- SCHICHO, R.; HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Gastric enteric neurones that respond to luminal injury. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 129-32, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066018> >.
- SCHICHO, R. et al. Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach. **Neurogastroenterol Motil**, v. 15, n. 1, p. 33-44, Feb 2003. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588467> >.
- SCHLICHTHOLZ, B. et al. Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. **Pancreas**, v. 30, n. 2, p. 99-104, Mar 2005. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15714131> >.
- SCHNEIDER, J. et al. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. **Neurogastroenterol Motil**, v. 13, n. 3, p. 255-64, Jun 2001. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437988> >.
- SCHULTE, I. et al. Peptides in body fluids and tissues as markers of disease. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 5, n. 2, p. 145-57, Mar 2005. ISSN 1473-7159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833045> >.
-

- SCHULTZBERG, M. et al. VIP-, enkephalin-, substance P- and somatostatin-like immunoreactivity in neurons intrinsic to the intestine: immunohistochemical evidence from organotypic tissue cultures. **Brain Res**, v. 155, n. 2, p. 239-48, Oct 1978. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/356933> >.
- SCHWARTZENTRUBER, J. et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 226-31, Feb 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286061> >.
- SCHWARZE, P. E. et al. Role of signal transduction pathways in lung inflammatory responses. **Toxicol Lett**, v. 112-113, p. 165-70, Mar 2000. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720727> >.
- SCHÄFER, K. H.; HÄNSGEN, A.; MESTRES, P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. **Anat Rec**, v. 256, n. 1, p. 20-8, Sep 1999. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456982> >.
- SCHÄFER, K. H.; VAN GINNEKEN, C.; COPRAY, S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 292, n. 12, p. 1940-52, Dec 2009. ISSN 1932-8494. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943347> >.
- SEIDL, P. et al. Three-dimensional fibroblast-tumor cell interaction causes downregulation of RACK1 mRNA expression in breast cancer cells in vitro. **Int J Cancer**, v. 102, n. 2, p. 129-36, Nov 2002. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385007> >.
- SESIKERAN, B. et al. Studies on sural nerve biopsies in endemic skeletal fluorosis. **Fluoride**, v. 27, p. 189-193, 1994.
- SHANTHAKUMARI, D.; SRINIVASALU, S.; SUBRAMANIAN, S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. **Toxicology**, v. 204, n. 2-3, p. 219-28, Nov 2004. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388248> >.
- SHARKEY, K. A. Substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in gastrointestinal inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 664, p. 425-42, 1992. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280934> >.
- SHARKEY, K. A.; KROESE, A. B. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. **Anat Rec**, v. 262, n. 1, p. 79-90, Jan 2001. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146431> >.
- SHARMA, A. et al. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency as a cause of renal failure. **Nephrology (Carlton)**, v. 20, n. 6, p. 439-40, Jun 2015. ISSN 1440-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25900388> >.
- SHARMA, J. D.; SOHU, D.; JAIN, P. Prevalence of neurological manifestation in a human population exposed to fluoride in drinking water. **Fluoride**, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2009.
- SHARRAD, D. F.; CHEN, B. N.; BROOKES, S. J. Neurochemical coding compared between varicose axons and cell bodies of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neurosci Lett**, v. 534, p. 171-6, Feb 2013. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123789> >.

Referências

-
- SHASHI, A. Gastric lesions in experimental fluorosis. **Asian J Microbiol Biotech Env Sc**, v. 1, n. 3-4, p. 171-5, 1999.
- _____. Histopathological effects of sodium fluoride on the duodenum of rabbits. **Fluoride**, v. 35, n. 1, p. 28-37, 2002.
- SHEU, G. T.; TRAUGH, J. A. Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in *Escherichia coli*. Subunit interactions, elongation activity, and phosphorylation by protein kinase CKII. **J Biol Chem**, v. 272, n. 52, p. 33290-7, Dec 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407120> >.
- SHI, M. et al. Identification of glutathione S-transferase pi as a protein involved in Parkinson disease progression. **Am J Pathol**, v. 175, n. 1, p. 54-65, Jul 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498008> >.
- SHI, X. Z.; SARNA, S. K. Inflammatory modulation of muscarinic receptor activation in canine ileal circular muscle cells. **Gastroenterology**, v. 112, n. 3, p. 864-74, Mar 1997. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041248> >.
- SHIMIZU, Y. et al. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 2, p. 295-311, Jan 2008. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952369> >.
- SHIMIZU, Y.; ROSE, D. M.; GINSBERG, M. H. Integrins in the immune system. **Adv Immunol**, v. 72, p. 325-80, 1999. ISSN 0065-2776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361579> >.
- SHIOW, L. R. et al. The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. **Nat Immunol**, v. 9, n. 11, p. 1307-15, Nov 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836449> >.
- SHIVARAJASHANKARA, Y. M. et al. Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. **35**, v. 3, n. 197-203, 2002.
- SIGISMUND, S. et al. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. **Dev Cell**, v. 15, n. 2, p. 209-19, Aug 2008. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694561> >.
- SILVA, B. V. et al. Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. **Quím Nova**, v. 32, n. 2, 2009.
- SILVA, T. C. et al. The use of xylitol as a strategy for prevention of dental caries. **Rev Odonto Cienc**, v. 24, n. 2, p. 205-212, 2009.
- SINGARAM, C. et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. **Lancet**, v. 346, n. 8979, p. 861-4, Sep 1995. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564669> >.
- SIROVER, M. A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1432, n. 2, p. 159-84, Jul 1999. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407139> >.
-

-
- SJÖLUND, K. et al. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation). **Neurogastroenterol Motil**, v. 9, n. 3, p. 143-50, Sep 1997. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347469> >.
- SLISKOVIC, I.; RATURI, A.; MUTUS, B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 8733-41, Mar 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611098> >.
- SMITH, C. E.; NANJI, A.; DENBESTEN, P. K. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. **Anat Rec**, v. 237, p. 243-258, 1993.
- SOARES, A. et al. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. **BMC Gastroenterol**, v. 15, p. 3, 2015. ISSN 1471-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609418> >.
- SONDHI, H.; GUPTA, M. L.; GUPTA, G. L. Intestinal effects of sodium fluoride in Swiss albino mice. **Fluoride**, v. 28, n. 1, p. 21-4, 1995.
- SORRELLS, S. et al. Ccdc94 protects cells from ionizing radiation by inhibiting the expression of p53. **PLoS Genet**, v. 8, n. 8, p. e1002922, 2012. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952453> >.
- SPENCER, H. et al. Effect of aluminum hydroxide on fluoride metabolism. **Clin Pharmacol Ther**, v. 28, n. 4, p. 529-35, Oct 1980. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7408412> >.
- SPENCER, N. J.; KYLOH, M.; DUFFIELD, M. Identification of different types of spinal afferent nerve endings that encode noxious and innocuous stimuli in the large intestine using a novel anterograde tracing technique. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112466, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383884> >.
- STACH, W. A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: SINGER, M. V. e GOEBELL, H. (Ed.). **Nerves and the gastrointestinal tract**. Lancaster: Kluwer, 1989. p.29-45.
- STEELE, P. A.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 227-39, 1991. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1721693> >.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, n. 5111, p. 173-4, Oct 1967. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4862079> >.
- STENKAMP-STRAHM, C. M. et al. High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. **Cell Tissue Res**, v. 354, n. 2, p. 381-94, Nov 2013. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881404> >.
- STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 8, p. 513-25, Aug 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603039> >.
-

-
- STEPHENS, A. N. et al. Proteomic analysis of the intestinal adaptation response reveals altered expression of fatty acid binding proteins following massive small bowel resection. **J Proteome Res**, v. 9, n. 3, p. 1437-49, Mar 2010. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943703> >.
- STERNINI, C. Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 39-51, 1991. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1950791> >.
- STERNINI, C.; REEVE, J. R.; BRECHA, N. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. **Gastroenterology**, v. 93, n. 4, p. 852-62, Oct 1987. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3305137> >.
- STIRNIMANN, C. U. et al. WD40 proteins propel cellular networks. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 10, p. 565-74, Oct 2010. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451393> >.
- STOOKEY, G. K.; DELLINGER, E. L.; MUHLER, J. C. IN VITRO STUDIES CONCERNING FLUORIDE ABSORPTION. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 115, p. 298-301, Feb 1964. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14121593> >.
- SUAREZ, P.; QUINTANA, M. C.; HERNANDEZ, L. Determination of bioavailable fluoride from sepiolite by "in vivo" by digestibility assays. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 490-493, 2008.
- SUNAGA, K. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is over-expressed during apoptotic death of neuronal cultures and is recognized by a monoclonal antibody against amyloid plaques from Alzheimer's brain. **Neurosci Lett**, v. 200, n. 2, p. 133-6, Nov 1995. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614562> >.
- SUNDLER, F. et al. VIP innervation of the gallbladder. **Gastroenterology**, v. 72, n. 6, p. 1375-7, Jun 1977. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/858483> >.
- SUNDLER, F.; EKBLAD, E.; HÅKANSON, R. Occurrence and distribution of substance P- and CGRP-containing nerve fibers in gastric mucosa: species differences. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 29-37, 1991. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1719780> >.
- SUNG, T. S. et al. Alteration of nitrenergic neuromuscular transmission as a result of acute experimental colitis in rat. **J Vet Sci**, v. 7, n. 2, p. 143-50, Jun 2006. ISSN 1229-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645339> >.
- SUSHEELA, A. K.; DAS, T. K. Chronic fluoride toxicity: A scanning electron microscopic study of duodenal mucosa. **Journal of Clinic Toxicology**, v. 26, p. 467-76, 1988.
- SUSHEELA, A. K. et al. Fluoride ingestion and its correlation with gastrointestinal discomfort. **Fluoride**, v. 25, n. 1, p. 5-22, 1992.
- _____. Prevalence of endemic Fluorosis with gastrointestinal manifestations in People living in some North-Indian villages. **Fluoride**, v. 26, n. 2, p. 97-104, 1993.
- SVOTELIS, A. et al. H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ER α ligand dependency. **EMBO J**, v. 30, n. 19, p. 3947-61, Oct 2011. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841772> >.
-

- SWANSON, L.; FILANDRINOS, D. T.; SHEVLIN, J. M. Death from accidental ingestion of an ammonium and sodium bifluoride glass etching compound. **Vet. Human Toxicol.**, v. 35, p. 351, 1993.
- SZABO, A. et al. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. **Cell**, v. 67, n. 2, p. 325-33, Oct 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655278> >.
- TACHÉ, Y. Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin [correction of calciton] gene-related peptide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 657, p. 240-7, Jun 1992. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1637088> >.
- TACK, J. **The myenteric plexus in the control and pharmacotherapy of gastro-intestinal motility**. 1997. Department of Internal Medicine, Catholic University of Leuven, Leuven-Belgium.
- TAHA, M. O. et al. Effects of L-nitro-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia/reperfusion injury in rabbits. **Transplant Proc**, v. 42, n. 2, p. 457-60, Mar 2010. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304164> >.
- TAKAHASHI, T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. **J Gastroenterol**, v. 38, n. 5, p. 421-30, 2003. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768383> >.
- TAKASE, I. et al. Fatality due to acute fluoride poisoning in the workplace. **Leg Med (Tokyo)**, v. 6, n. 3, p. 197-200, Jul 2004. ISSN 1344-6223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231293> >.
- TAM, S. et al. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 1155-62, Oct 2006. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980959> >.
- TANABE, T. et al. Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on substance-P-induced superoxide production in human neutrophils. **Eur J Pharmacol**, v. 314, n. 1-2, p. 175-83, Oct 1996. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957234> >.
- TANAKA, S.; UEHARA, T.; NOMURA, Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. **J Biol Chem**, v. 275, n. 14, p. 10388-93, Apr 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10744727> >.
- TANG, Q. et al. Fluoride and Children's Intelligence: A Meta-analysis. **Biol Trace Elem Res**, v. 126, p. 115-120, 2008.
- TAVES, D. R. Electrophoretic mobility of serum fluoride. **Nature**, v. 220, p. 582-583, 1968a.
- _____. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v. 15, n. 9, p. 969-74, Sep 1968b. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18960390> >.
- TAYLOR, G. S.; BYWATER, R. A. Antagonism of non-cholinergic excitatory junction potentials in the guinea-pig ileum by a substance P analogue antagonist. **Neurosci Lett**, v. 63, n. 1, p. 23-6, Jan 1986. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419800> >.

Referências

TEITELBAUM, D. T. The Halogens. In: BINGHAM, E.; COHRSEN, B., *et al* (Ed.). **Patty's Toxicology**. 5th. New York: John Wiley & Sons, 2001.

TER BEEK, W. P. *et al*. Substance P receptor expression in patients with inflammatory bowel disease. Determination by three different techniques, i.e., storage phosphor autoradiography, RT-PCR and immunohistochemistry. **Neuropeptides**, v. 41, n. 5, p. 301-6, Oct 2007. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602742> >.

TERZI, Y. K.; KOCAEFE, Y. C.; AYTER, S. Coronin 1A inhibits neurite outgrowth in PC12 cells. **Neurosci Lett**, v. 582, p. 38-42, Oct 2014. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25179994> >.

THONGBOONKERD, V.; KLEIN, E.; KLEIN, J. B. Sample preparation for 2-D proteomic analysis. **Contrib Nephrol**, v. 141, p. 11-24, 2004. ISSN 0302-5144. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14650222> >.

THORSLUND, S. E. *et al*. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with Yersinia pseudotuberculosis virulence function. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16784, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347310> >.

TIMMERMANS, J. P. *et al*. Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitrergic neurons in the pig small intestine. **Ann Anat**, v. 176, n. 6, p. 515-25, Dec 1994. ISSN 0940-9602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530411> >.

TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **Anat Rec**, v. 262, n. 1, p. 71-8, Jan 2001. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146430> >.

TIMMERMANS, J. P. *et al*. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the human small intestine. **Acta Anat (Basel)**, v. 143, n. 1, p. 48-53, 1992. ISSN 0001-5180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1585788> >.

_____. Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 260, n. 2, p. 367-79, May 1990. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694106> >.

TIPPINS, J. R. *et al*. The myotropic and plasma-calcium modulating effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP). **Neuropeptides**, v. 4, n. 5, p. 425-34, Sep 1984. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6333647> >.

TIWARI, S. *et al*. Simultaneous exposure of excess fluoride and calcium deficiency alters VDR, CaR, and calbindin D 9 k mRNA levels in rat duodenal mucosa. **Calcif Tissue Int**, v. 75, n. 4, p. 313-20, Oct 2004. ISSN 0171-967X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549646> >.

TODA, N.; HERMAN, A. G. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 3, p. 315-38, Sep 2005. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109838> >.

TOKER, A. *et al*. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. **Eur J Biochem**, v. 206, n. 2, p. 453-61, Jun 1992. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317796> >.

- TOLKATCHEV, D.; YU, L.; YU, C. A. Potential induced redox reactions in mitochondrial and bacterial cytochrome b-c1 complexes. **J Biol Chem**, v. 271, n. 21, p. 12356-63, May 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647838> >.
- TORIHASHI, S. et al. Expression of nitric oxide synthase in mucosal cells of the canine colon. **Histochem Cell Biol**, v. 105, n. 1, p. 33-41, Jan 1996. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824904> >.
- TOSCO, A. et al. Dietary effects of copper and iron deficiency on rat intestine: a differential display proteome analysis. **J Proteome Res**, v. 4, n. 5, p. 1781-8, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212433> >.
- TOTTRUP, A.; SVANE, D.; FORMAN, A. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. G385-9, Mar 1991. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003605> >.
- TOUMI, F. et al. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. **Neurogastroenterol Motil**, v. 15, n. 3, p. 239-42, Jun 2003. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787332> >.
- TRABELSI, M.; GUERMAZI, F.; ZEGHAL, N. Effect of fluoride on thyroid function and cerebellar development in mice. **Fluoride**, v. 34, p. 165-173, 2001.
- TREGGAR, G. W. et al. Synthesis of substance P. **Nat New Biol**, v. 232, n. 29, p. 87-9, Jul 1971. ISSN 0090-0028. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5285347> >.
- TRIVEDI, M. H. et al. Effect of high water on children's intelligence in India. **Fluoride**, v. 40, p. 178-83, 2007.
- TROUNCE, J. R. et al. Studies in achalasia of the cardia. **Q J Med**, v. 26, n. 104, p. 433-43, Oct 1957. ISSN 0033-5622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13494691> >.
- TSHALA-KATUMBAY, D. et al. Probing mechanisms of axonopathy. Part I: Protein targets of 1,2-diacetylbenzene, the neurotoxic metabolite of aromatic solvent 1,2-diethylbenzene. **Toxicol Sci**, v. 105, n. 1, p. 134-41, Sep 2008. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502740> >.
- TØTTRUP, A.; SVANE, D.; FORMAN, A. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. G385-9, Mar 1991. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003605> >.
- UNIPROT-P21708. Mitogen-activated protein kinase 3. p. <http://www.uniprot.org/uniprot/P21708>, 2015.
- UYTTEBROEK, L. et al. Neurochemical coding of enteric neurons in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). **J Comp Neurol**, v. 518, n. 21, p. 4419-38, Nov 2010. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853514> >.
- VAIOPOULOU, A. et al. Current advantages in the application of proteomics in inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 11, p. 2755-64, Nov 2012. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740064> >.
- VALENTIN, N.; ACOSTA, A.; CAMILLERI, M. Early investigational therapeutics for gastrointestinal motility disorders: from animal studies to Phase II trials. **Expert Opin Investig**

Referências

-
- Drugs**, v. 24, n. 6, p. 769-79, Jun 2015. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971881> >.
- VALKOVA-VALCHANOVA, M. B. et al. Isolation and characterization of a two-subunit cytochrome b-c1 subcomplex from *Rhodobacter capsulatus* and reconstitution of its ubihydroquinone oxidation (Qo) site with purified Fe-S protein subunit. **Biochemistry**, v. 37, n. 46, p. 16242-51, Nov 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819216> >.
- VALSECKI JR, A.; VERTUAN, V. Técnica de Spray Para Aplicações Tópicas de Soluções Fluoretadas: II- Ingestão e Toxicidade do Flúor. **RGO**, v. 47, n. 2, p. 97-101, 1999.
- VAN ASSCHE, G. et al. Region-specific antiproliferative effect of VIP and PACAP-(1-38) on rabbit enteric smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. G303-10, Jan 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887008> >.
- VAN GELDRE, L. A.; FRAEYMAN, N. H.; LEFEBVRE, R. A. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. **Biochem Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 145-53, Jul 2000. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807956> >.
- VAN GELDRE, L. A.; LEFEBVRE, R. A. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 20, p. 2483-97, 2004. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320758> >.
- VAN GINNEKEN, C. et al. Morphological changes in the enteric nervous system of aging and APP23 transgenic mice. **Brain Res**, v. 1378, p. 43-53, Mar 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241669> >.
- _____. Developmental changes in heme-oxygenase-2 and bNOS expression in enteric neurons in the pig duodenum. **Auton Neurosci**, v. 91, n. 1-2, p. 16-25, Aug 2001. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515797> >.
- VANDERWINDEN, J. M. et al. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. **N Engl J Med**, v. 327, n. 8, p. 511-5, Aug 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378938> >.
- VANI, L. M.; REDDY, P. K. Effect of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscles of mice. **Fluoride**, v. 33 n. 17-26. , 2000.
- VANNER, S. Corelease of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in guinea pig ileum. **Am J Physiol**, v. 267, n. 4 Pt 1, p. G650-5, Oct 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524349> >.
- VANNUCCHI, M. G.; CORSANI, L.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Co-distribution of NK2 tachykinin receptors and substance P in nerve endings of guinea-pig ileum. **Neurosci Lett**, v. 287, n. 1, p. 71-5, Jun 2000. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841994> >.
- VARNER, J. A. et al. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 284-98, Feb 1998. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518651> >.
- VENTO, P. et al. Quantitative comparison of growth-associated protein-43 and substance P in ulcerative colitis. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 6, p. 749-58, Jun 2001. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373321> >.
-

- VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-5, 2009 Jan-Mar 2009. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466305> >.
- VILHENA, F. V. et al. Low-fluoride acidic dentifrice: a randomized clinical trial in a fluoridated area. **Caries Res**, v. 44, n. 5, p. 478-84, 2010. ISSN 1421-976X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861632> >.
- VITERI, F. E.; SCHNEIDER, R. E. Gastrointestinal alterations in protein-calorie malnutrition. **Med Clin North Am**, v. 58, n. 6, p. 1487-505, Nov 1974. ISSN 0025-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4214971> >.
- VOGT, R. L. et al. Acute fluoride poisoning associated with an on-site fluoridator in a Vermont elementary school. **Am J Public Health**, v. 72, n. 10, p. 1168-9, Oct 1982. ISSN 0090-0036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7114344> >.
- VOLLBERG, T. M.; COOL, B. L.; SIROVER, M. A. Biosynthesis of the human base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase. **Cancer Res**, v. 47, n. 1, p. 123-8, Jan 1987. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3791199> >.
- WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 19-23, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15065999> >.
- WAGER, T. T. et al. Casein kinase 1δ/ε inhibitor PF-5006739 attenuates opioid drug-seeking behavior. **ACS Chem Neurosci**, v. 5, n. 12, p. 1253-65, Dec 2014. ISSN 1948-7193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299732> >.
- WAGNER, M. J. Absorption of fluoride by the gastric mucosa in the rat. **J Dent Res**, v. 41, p. 667-71, 1962 May-Jun 1962. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13998260> >.
- WAKAMATSU, Y.; WESTON, J. A. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. **Development**, v. 124, n. 17, p. 3449-60, Sep 1997. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310339> >.
- WALDBOTT, G. L. Gastric ulcer and fluoride. **Fluoride**, v. 10, p. 149-151, 1977.
- WALDBOTT, G. L.; LEE, J. R. Toxicity from repeated low-grade exposure to hydrogen fluoride--case report. **Clin Toxicol**, v. 13, n. 3, p. 391-402, 1978a. ISSN 0009-9309. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/743869> >.
- _____. Toxicity from repeated low-grade exposure to hydrogen fluoride--Case report. **Clinical Toxicology**, v. 13, p. 391-402, 1978b.
- WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 44, n. 45, p. 7342-72, Dec 2005. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267872> >.

Referências

WANG, A. G. et al. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes. **Biomed Environ Sci**, v. 17, n. 2, p. 217-22, Jun 2004. ISSN 0895-3988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15386948> >.

WANG, J. et al. Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 13, p. 4112-8, Jul 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818712> >.

_____. Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. **Am J Pathol**, v. 160, n. 6, p. 2063-72, Jun 2002. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057911> >.

WANG, S. X. et al. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 4, p. 643-7, Apr 2007. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450237> >.

WANG, T.; HIMOIE, A. Kinetics of the rabbit muscle enolase-catalyzed dehydration of 2-phosphoglycerate. Fluoride and phosphate inhibition. **J Biol Chem**, v. 249, n. 12, p. 3895-902, Jun 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4857983> >.

WANG, X. et al. Mechanism of SNAP potentiating antiproliferative effect of calcitonin gene-related peptide in cultured vascular smooth muscle cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 9, p. 1599-606, Sep 1999. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471344> >.

_____. Pno1 tissue-specific expression and its functions related to the immune responses and proteasome activities. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46093, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029399> >.

WANG, Y. et al. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic stroke. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 166-72, Feb 2012. ISSN 1873-5592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22204316> >.

WANG, Y. F. et al. Colocalization of inhibitory mediators, NO, VIP and galanin, in canine enteric nerves. **Peptides**, v. 19, n. 1, p. 99-112, 1998. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9437742> >.

WARNER, J. R.; MCINTOSH, K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? **Mol Cell**, v. 34, n. 1, p. 3-11, Apr 2009. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362532> >.

WARREN, J. J.; LEVY, S. M. Systemic fluoride. Sources, amounts, and effects of ingestion. **Dent Clin North Am**, v. 43, n. 4, p. 695-711, Oct 1999. ISSN 0011-8532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553251> >.

WARREN, J. J. et al. Considerations on optimal fluoride intake using dental fluorosis and dental caries outcomes--a longitudinal study. **J Public Health Dent**, v. 69, n. 2, p. 111-5, 2009. ISSN 0022-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054310> >.

WATANABE, M. et al. Molecular cloning of rat cDNAs for the zeta and theta subtypes of 14-3-3 protein and differential distributions of their mRNAs in the brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 25, n. 1-2, p. 113-21, Aug 1994. ISSN 0169-328X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984035> >.

WATTCHOW, D. A.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. **Gastroenterology**, v. 109, n. 3, p. 866-75, Sep 1995. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657116> >.

WESTER, T.; O'BRIAN, D. S.; PURI, P. Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. **Gut**, v. 44, n. 5, p. 666-74, May 1999. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10205203> >.

WHISSTOCK, J. C.; LESK, A. M. Prediction of protein function from protein sequence and structure. **Q Rev Biophys**, v. 36, n. 3, p. 307-40, Aug 2003. ISSN 0033-5835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15029827> >.

WHITFORD, G. M. Fluoride in dental products: safety considerations. **J Dent Res**, v. 66, n. 5, p. 1056-60, May 1987. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3301934> >.

_____. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monographs in oral science**, v. 13, p. 1-160, 1989.

_____. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J Dent Res**, v. 69 Spec No, p. 539-49; discussion 556-7, Feb 1990. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2179312> >.

_____. Intake and metabolism of fluoride. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 1, p. 5-14, Jun 1994. ISSN 0895-9374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7993560> >.

_____. **The Metabolism and Toxicity of Fluoride**. 2nd. Basel: S Karger, 1996.

WHITFORD, G. M.; ALLMANN, D. W.; SHAHED, A. R. Topical fluorides: effects on physiologic and biochemical processes. **J Dent Res**, v. 66, n. 5, p. 1072-8, May 1987. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3475325> >.

WHITFORD, G. M.; BILES, E. D.; BIRDSOONG-WHITFORD, N. L. A comparative study of fluoride pharmacokinetics in five species. **J Dent Res**, v. 70, n. 6, p. 948-51, Jun 1991. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2045573> >.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H. Fluoride absorption: the influence of gastric acidity. **Calcif Tissue Int**, v. 36, n. 3, p. 302-7, May 1984. ISSN 0171-967X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088010> >.

_____. Fluoride reabsorption by nonionic diffusion in the distal nephron of the dog. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 196, n. 2, p. 178-83, Feb 1991. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1990408> >.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H.; REYNOLDS, K. E. Fluoride absorption from the rat urinary bladder: a pH-dependent event. **Am J Physiol**, v. 232, n. 1, p. F10-5, Jan 1977. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13661> >.

_____. Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. **Am J Physiol**, v. 238, p. 141-148, 1979.

WHITFORD, G. M.; PASHLEY, D. H.; STRINGER, G. I. Fluoride renal clearance: a pH-dependent event. **Am J Physiol**, v. 230, n. 2, p. 527-32, Feb 1976. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1259032> >.

Referências

-
- WHITFORD, G. M. et al. Fluoride uptake by *Streptococcus mutans* 6715. **Infect Immun**, v. 18, n. 3, p. 680-7, Dec 1977. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22490> >.
- WHO, W. H. O. Environmental Health Criteria, Fluorides. Geneva, 2002.
- WIELOCH, M. et al. Do toxic heavy metals affect antioxidant defense mechanisms in humans? **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 78, p. 195-205, Apr 2012. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169892> >.
- WIESNER, W. et al. Normal colonic wall thickness at CT and its relation to colonic distension. **J Comput Assist Tomogr**, v. 26, n. 1, p. 102-6, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 0363-8715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801911> >.
- WILLISON, K. et al. The t complex polypeptide 1 (TCP-1) is associated with the cytoplasmic aspect of Golgi membranes. **Cell**, v. 57, n. 4, p. 621-32, May 1989. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2655925> >.
- WIMALAWANSA, S. J. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. **Endocr Rev**, v. 17, n. 5, p. 533-85, Oct 1996. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897024> >.
- WOOD, J. D.; KIRCHGESSNER, A. Slow excitatory metabotropic signal transmission in the enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 71-80, Apr 2004. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066009> >.
- WOSCHOLSKI, R.; PARKER, P. J. Inositol lipid 5-phosphatases--traffic signals and signal traffic. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 11, p. 427-31, Nov 1997. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9397684> >.
- WRZOS, H. F. et al. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2106-10, Oct 1997. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9365143> >.
- WU, C. et al. Effects of high fluoride and arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. **Fluoride**, v. 39, n. 4, p. 274-279, 2006.
- WU, G. F. et al. Giant panda ribosomal protein S14: cDNA, genomic sequence cloning, sequence analysis, and overexpression. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 4, p. 2004-15, 2010. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957604> >.
- WU, L. et al. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting the nin one binding protein. **Oncol Rep**, v. 33, n. 5, p. 2309-18, May 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760058> >.
- WU, X. F. et al. S-Nitrosylating protein disulphide isomerase mediates α -synuclein aggregation caused by methamphetamine exposure in PC12 cells. **Toxicol Lett**, v. 230, n. 1, p. 19-27, Oct 2014. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25090657> >.
- XIANG, Q. et al. Effect of fluoride in drinking water on children,s intelligence. **Fluoride**, v. 36, p. 84-94, 2003.
- _____. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. **Fluoride**, v. 36, n. 2, p. 84-94, 2003.
-

- XU, H. et al. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. **Toxicol Lett**, v. 160, n. 1, p. 69-75, Dec 2005. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16043314> >.
- XUE, L. et al. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 4, p. 1851-5, Feb 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677545> >.
- YAFFE, M. B. et al. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 245-8, Jul 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1630491> >.
- YAM, A. Y. et al. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. **Nat Struct Mol Biol**, v. 15, n. 12, p. 1255-62, Dec 2008. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011634> >.
- YAMADA, K. M.; MIYAMOTO, S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 681-9, Oct 1995. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573343> >.
- YAN, N. et al. Fluoride-Induced Neuron Apoptosis and Expressions of Inflammatory Factors by Activating Microglia in Rat Brain. **Mol Neurobiol**, Aug 8 2015. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26253724 >.
- YAN, X. et al. Fluoride induces apoptosis and alters collagen I expression in rat osteoblasts. **Toxicol Lett**, v. 200, n. 3, p. 133-8, Feb 2011. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093551> >.
- YANG, P. et al. Quantitative changes of nitrergic neurons during postnatal development of chicken myenteric plexus. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 14, n. 10, p. 886-95, Oct 2013. ISSN 1862-1783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101205> >.
- YANG, S. et al. Pleiotrophin is involved in the amniotic epithelial cell-induced differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells. **Neurosci Lett**, v. 539, p. 86-91, Feb 2013. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403104> >.
- YANG, Y. et al. The effects of high levels of fluoride and iodine on child intellectual ability and the metabolism of fluoride and iodine. **Fluoride**, v. 41, n. 4, p. 336-339, 2008.
- YAU, W. M.; YOUTHER, M. L.; VERDUN, P. R. A presynaptic site of action of substance P and vasoactive intestinal polypeptide on myenteric neurons. **Brain Res**, v. 330, n. 2, p. 382-5, Mar 1985. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580593> >.
- YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. **Pharm Res**, v. 14, n. 6, p. 763-6, Jun 1997. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210194> >.
- ZEMP, I.; KUTAY, U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. **FEBS Lett**, v. 581, n. 15, p. 2783-93, Jun 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509569> >.

-
- ZHANG, J. et al. Proteome changes in the small intestinal mucosa of broilers (*Gallus gallus*) induced by high concentrations of atmospheric ammonia. **Proteome Sci**, v. 13, p. 9, 2015. ISSN 1477-5956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741220> >.
- ZHANG, M. et al. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. **Toxicol Lett**, v. 179, n. 1, p. 1-5, Jun 2008. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485627> >.
- ZHAO, D. et al. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. **Biochem J**, v. 368, n. Pt 2, p. 665-72, Dec 2002. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169092> >.
- ZHAO, L. B. et al. Effect of a high fluoride water supply on children's intelligence. **Fluoride**, v. 29, p. 190-2, 1996.
- ZHAO, X.; WA, J. H. Actions of sodium fluoride on acetylcholinesterase activities in rats. **Biomed Env Sci**, v. 11, p. 1-6, 1998.
- ZHENG, Y. et al. The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. **Toxicol Lett**, v. 133, n. 1, p. 77-82, Jul 2002. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076512> >.
- ZHONG, D. B. et al. Effect of fluoride on proliferation, differentiation, and apoptosis of cultured caprine (goat) osteoblasts. **Fluoride**, v. 38, n. 3, p. 230-231, 2005.
- ZHOU, R. et al. KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 802-13, Nov 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914172> >.
- ZHOU, W. P. et al. EXPRESSION MECHANISM AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF NOB1 IN GASTRIC CANCER TISSUE AND ADJACENT NORMAL TISSUE. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 29, n. 2, p. 423-30, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122232> >.
- ZHU, A. L. et al. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination and depletion profile of flunixin residues in tissues after single oral administration in rabbits. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 934, p. 8-15, Sep 2013. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891913> >.
- ZOGHBI, H. Y.; ORR, H. T. Glutamine repeats and neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 217-47, 2000. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845064> >.
- ÜNALA, C. M.; STEINERT, M. Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 78, n. 3, p. 544-71, Sep 2014. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184565> >.
-

Anexos

ANEXO 1. Parecer aprovado da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em animais
FOB/USP/BAURU

**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 014/2011

Bauru, 28 de junho de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação da inervação entérica e análise proteômica do intestino delgado de ratos expostos à dose aguda ou crônica de fluoreto**, de autoria de Carina Guimarães de Souza Melo, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **21 de junho de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

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

ANEXO 2. Características dos anticorpos primários: antígenos, hospedeiros, diluições e especificações (códigos de compra e empresas)

Antígenos	Anticorpos Primários		
	Hospedeiro	Diluição	Especificações (Código de compra-Empresas)
nNOS	Rabbit	1:200	Anti nNOS1 Antibody (H-299): SC-8309/Santa Cruz
HuC/HuD	Mouse	1:200	Anti-HuC/HuD (Clone 16A11) liofilizado A-21271/Invitrogen
CGRP	Rabbit	1:300	Anti-CGRP-AB15360/Millipore
SP	Goat	1:300	Anti-Subst. P-SC9758/Santa Cruz
ChAT	Goat	1:200	Anti-ChAt-AB144P/Millipore
VIP	Rabbit	1:300	Anti-VIP (66-80)-V0390/Sigma

ANEXO 3. Características dos anticorpos secundários para as técnicas de imunofluorescência realizadas: comprimento de onda, antígenos, hospedeiros, diluições e especificações (códigos de compra e empresas)

Técnica realizada	Anticorpos Secundários				
	Comprimento de onda (λ)	Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Especificações (Código de compra-Empresa)
nNOS	546	Rabitt	Donkey	1:500	Invitrogen A10040
HuC/HuD	488	Mouse	Donkey	1:500	Invitrogen A21202
CGRP	546	Rabitt	Donkey	1:200	Invitrogen A10040
SP	568	Goat	Donkey	1:200	Invitrogen A11057
ChAT	568	Goat	Donkey	1:200	Invitrogen A11057
VIP	546	Rabitt	Donkey	1:200	Invitrogen A10040

ANEXO 4. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (HuC/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo de 10 ppm F: HuC/D (D), nNOS (E) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (F). Grupo de 50 ppm F: HuC/D (G), nNOS (H) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (I). Objetiva de 20X

ANEXO 5. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo de 10 ppm F: HuC/D (C), nNOS (D) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (E). Grupo de 50 ppm F: HuC/D (F), nNOS (G) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (H). Objetiva de 20X

ANEXO 6. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do íleo de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (HuC/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo de 10 ppm F: HuC/D (D), nNOS (E) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (F). Grupo de 50 ppm F: HuC/D (G), nNOS (H) e HuC/D e nNOS (I). Objetiva de 20X

ANEXO 7. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo da dose aguda de 25mgF/Kg: HuC/D (D), nNOS (E) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (F). Objetiva de 20X

ANEXO 8. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (HuC/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo da dose aguda de 25mgF/Kg: HuC/D (D), nNOS (E) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (F). Objetiva de 20X

ANEXO 9. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos do íleo de ratos IR-HuC/D (verde), IR-nNOS (vermelho) e duplamente marcados (Huc/D e nNOS). Grupo controle: HuC/D (A), nNOS (B) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (C). Grupo da dose aguda de 25mgF/Kg: HuC/D (D), nNOS (E) e dupla marcação-HuC/D e nNOS (F). Objetiva de 20X

ANEXO 10. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 11. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 12. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 13. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 14. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 15. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 16. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 17. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 18. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do íleo de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 19. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do duodeno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 20. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do jejuno de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 21. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do íleo de ratos expostos cronicamente ao F. Grupo controle (A), Grupo de 10 ppm F (B) e Grupo de 50 ppm F (C). Objetiva de 40X

ANEXO 22. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 23. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 24. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-CGRP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 25. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 26. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 27. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-VIP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 28. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 29. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 30. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-ChAT do íleo de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 31. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do duodeno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X.

ANEXO 32. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do jejuno de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 33. Fotomicrografia das varicosidades mioentéricas IR-SP do íleo de ratos expostos à dose aguda de F. Grupo controle (A), Grupo da dose aguda de 25 mg F/Kg. Objetiva de 40X

ANEXO 34. Proteínas identificadas no duodeno de ratos com expressão diferencial (suprarreguladas ou subreguladas) no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo Controle (0 ppm F). Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias.

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score	Razão da expressão da proteína Grupo de 10 ppm F : Grupo Controle
D3ZP59	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	353,69	1,92
E9PT29	<i>Ddx17</i>	<i>Protein Ddx17</i>	434,38	1,72
A0A096MIX2	<i>Ddx17</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a</i>	512,19	1,69
M3ZCQ3	<i>LOC100910765</i>	<i>LOC100910765</i>	285,43	1,69
D3ZJF8	<i>Fcgbp</i>	<i>Protein Fcgbp</i>	294,05	1,69
Q62669	<i>Hbb-b1</i>	<i>Protein Hbb-b1</i>	285,43	1,64
P01946	<i>Hba1</i>	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>	2052,37	1,61
P0CG51	<i>Ubb</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	481,18	1,59
Q62667	<i>Mvp</i>	<i>Major vault protein</i>	164,18	1,54
Q08290	<i>Cnn1</i>	<i>Calponin-1</i>	189,1	1,52
P52555	<i>Erp29</i>	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	174,5	1,49
Q4KLZ6	<i>Dak</i>	<i>Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)</i>	251,54	1,45
B0BMS8	<i>Myl9</i>	<i>Myl9 protein</i>	8936,01	1,43
F1LY34	<i>Gm16519</i>	<i>Protein Gm16519</i>	342,81	1,41
G3V8L3	<i>Lmna</i>	<i>Lamin A, isoform CRA_b</i>	146,38	1,41
Q5XIV1	<i>Pgk2</i>	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	248,28	1,41
Q64122	<i>Myl9</i>	<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	9023,9	1,41
P18666	<i>Myl12b</i>	<i>Myosin regulatory light chain 12B</i>	2513,31	1,39
D4A8N3	<i>RGD1563956</i>	<i>Protein RGD1563956</i>	342,81	1,37
P23358	<i>Rpl12</i>	<i>60S ribosomal protein L12</i>	375,5	1,37
P48679	<i>Lmna</i>	<i>Prelamin-A/C</i>	151,71	1,37
C0JPT7	<i>Flna</i>	<i>Filamin alpha</i>	929,87	1,35
P07632	<i>Sod1</i>	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	254,03	1,35
P13832	<i>Rlc-a</i>	<i>Myosin regulatory light chain RLC-A</i>	2476,81	1,35
P48037	<i>Anxa6</i>	<i>Annexin A6</i>	128,4	1,35
Q6IFW5	<i>Krt12</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 12</i>	139,52	1,35

Q6IFV3	<i>Krt15</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 15</i>	259,73	1,33
D3ZSM0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	262,23	1,32
D4A931	<i>Krt12</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 12</i>	139,52	1,32
M0R4B6	<i>Rpl12</i>	<i>RCG64424</i>	375,5	1,32
M0R6X5	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A</i>	534,18	1,32
M0RCG4	<i>Myl6l</i>	<i>Protein LOC100910474</i>	1387,68	1,32
M0RDR9	<i>Col6a1</i>	<i>Protein Col6a1</i>	233,96	1,32
P10111	<i>Ppia</i>	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	7154,46	1,32
P31000	<i>Vim</i>	<i>Vimentin</i>	449,15	1,32
Q4V8H5	<i>Dnpep</i>	<i>Aspartyl aminopeptidase</i>	213,94	1,32
Q63279	<i>Krt19</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 19</i>	4635,26	1,32
D3ZVT6	<i>Asb7</i>	<i>Ankyrin repeat and SOCS box-containing 7</i>	158,15	1,3
P48675	<i>Des</i>	<i>Desmin</i>	4826,38	1,3
Q00715	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2B type 1</i>	10186,13	1,3
Q6IFU7	<i>Krt42</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 42</i>	744,07	1,3
Q6IFV1	<i>Krt14</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>	750,39	1,3
Q6P725	<i>Des</i>	<i>Desmin</i>	4826,38	1,3
G3V9C7	<i>Hist1h2bk</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,28
Q6IFU8	<i>Krt17</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	815,39	1,28
Q6IFV4	<i>Krt13</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 13</i>	843,12	1,28
D3ZYW2	<i>Hnrnp1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	148,84	1,27
D4A817	<i>LOC100912338</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,27
M0R5J4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	434,13	1,27
P62963	<i>Pfn1</i>	<i>Profilin-1</i>	348,49	1,27
Q6AY07	<i>Aldoart2</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	269,91	1,27
Q6P9V9	<i>Tuba1b</i>	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	2611,01	1,27
D4A115	<i>Col6a3</i>	<i>Protein Col6a3</i>	198,34	1,25
F1LNH3	<i>Col6a2</i>	<i>Procollagen, type VI, alpha 2, isoform CRA_a</i>	222,52	1,25
P06761	<i>Hspa5</i>	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	1442,94	1,23
P68370	<i>Tuba1a</i>	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	2611,01	1,23
Q4QRB4	<i>Tubb3</i>	<i>Tubulin beta-3 chain</i>	2929,78	1,23
Q64119	<i>Myl6</i>	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	1577,45	1,23
Q68FR8	<i>Tuba3a</i>	<i>Tubulin alpha-3 chain</i>	192,19	1,23

Q6AYZ1	<i>Tuba1c</i>	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	2648,47	1,23
D3ZEN5	<i>Prdx5</i>	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	1092,29	1,22
M0R5B4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2432,08	1,22
M0RBL5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	224,17	1,22
P00884	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	2972,1	1,22
P25030	<i>Krt20</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	1113,48	1,22
Q5BJY9	<i>Krt18</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 18</i>	765,96	1,22
Q6P9T8	<i>Tubb4b</i>	<i>Tubulin beta-4B chain</i>	4837,4	1,22
Q9R063	<i>Prdx5</i>	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	1092,29	1,22
D3ZD09	<i>Cox6b1</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6B1</i>	4235,68	1,2
E9PTU4	<i>Myh11</i>	<i>Myosin-11</i>	2660,33	1,2
P11598	<i>Pdia3</i>	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	706,87	1,2
P13084	<i>Npm1</i>	<i>Nucleophosmin</i>	567,98	1,2
Q5XIF6	<i>Tuba4a</i>	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	238,76	1,2
Q6AZ25	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha</i>	1281,55	1,2
B5DFH4	<i>Papss2</i>	<i>Papss2 protein</i>	2030,74	1,19
D3ZLY9	<i>Hist1h2bh</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,19
D3ZNZ9	<i>Hist3h2ba</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,19
F1LPR6	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	3019,83	1,19
F1LZI1	<i>LOC680121</i>	<i>Protein LOC680121</i>	1185,85	1,19
P07335	<i>Ckb</i>	<i>Creatine kinase B-type</i>	2401,02	1,19
P46462	<i>Vcp</i>	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	332,31	1,19
Q3KRE8	<i>Tubb2b</i>	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	5228,32	1,19
Q63610	<i>Tpm3</i>	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	910,19	1,19
Q66HT1	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	3339,1	1,19
D3Z7Y6	<i>Krt20</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	1113,48	1,18
D3ZIA7	<i>Agr2</i>	<i>Anterior gradient 2 (Xenopus laevis) (Predicted), isoform CRA_a</i>	2954,19	1,18
D4A4S3	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	399,57	1,18
G3V6D3	<i>Atp5b</i>	<i>ATP synthase subunit beta</i>	4833,17	1,18
G3V7C6	<i>Tubb4b</i>	<i>RCG45400</i>	5468,93	1,18
M0RBQ5	<i>Hist3h2bb</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,18
M0RCB1	<i>LOC102549957</i>	<i>Protein LOC102549957</i>	2328,01	1,18
P55063	<i>Hspa1l</i>	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	1514,18	1,18

P69897	<i>Tubb5</i>	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	5381,69	1,18
P85108	<i>Tubb2a</i>	<i>Tubulin beta-2A chain</i>	5257,43	1,18
D3ZNH4	<i>Hist1h2bo</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,16
G3V6P7	<i>LOC100911597</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle</i>	236,11	1,16
M0R8M9	<i>Hspa8</i>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	2699,48	1,16
P05065	<i>Aldoa</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	1056,3	1,16
P10719	<i>Atp5b</i>	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	4833,17	1,16
P63018	<i>Hspa8</i>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	2676,97	1,16
Q10758	<i>Krt8</i>	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	4242,51	1,16
Q63862	<i>Myh11</i>	<i>Myosin-11</i>	2051,26	1,16
Q68FY0	<i>Uqcrc1</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	340,51	1,16
Q9ESV6	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific</i>	3498,33	1,16
Q9Z1P2	<i>Actn1</i>	<i>Alpha-actinin-1</i>	505,14	1,16
F1M3U4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	1314,16	1,15
M0RDZ9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2277,4	1,15
P02091	<i>Hbb</i>	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	7606,81	1,15
P14659	<i>Hspa2</i>	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	1760,28	1,15
Q4QQV0	<i>Tubb6</i>	<i>Protein Tubb6</i>	2421,59	1,15
Q62812	<i>Myh9</i>	<i>Myosin-9</i>	222,3	1,15
P02770	<i>Alb</i>	<i>Serum albumin</i>	1709,88	1,14
P0DMW0	<i>Hspa1a</i>	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	1514,18	1,14
B1WBQ8	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	3498,33	1,12
B4F7C2	<i>Tubb4a</i>	<i>Protein Tubb4a</i>	3836,72	1,12
D4A111	<i>Col6a3</i>	<i>Protein Col6a3</i>	101,9	1,12
P04636	<i>Mdh2</i>	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	3826,73	1,12
Q9ER34	<i>Aco2</i>	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	429,22	1,12
F7FK40	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c</i>	2083,34	1,11
O88752	<i>Hbe1</i>	<i>Epsilon 1 globin</i>	4171,59	1,11
O88989	<i>Mdh1</i>	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	896,63	1,11
P00770	<i>Mcpt2</i>	<i>Mast cell protease 2</i>	1459,96	1,11
P04692	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	1652,65	1,11
P11517	<i>Non-identified</i>	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	4373,36	1,11
Q91XN6	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_h</i>	1652,65	1,11
Q9QXQ0	<i>Actn4</i>	<i>Alpha-actinin-4</i>	738,19	1,11

P05197	<i>Eef2</i>	<i>Elongation factor 2</i>	1019,12	1,1
D3ZGY4	<i>Gapdh-ps2</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5595,83	1,09
E9PTN6	<i>RGD1564688</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5588,86	1,09
F1LP05	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	3199,46	1,09
D3ZWM5	<i>Hist1h2bb</i>	<i>Histone H2B</i>	10186,13	1,08
M0R590	<i>LOC685186</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5595,83	1,08
P15999	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	3209,54	1,08
P04797	<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5595,83	1,06
P62738	<i>Acta2</i>	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	15014,96	1,06
P63269	<i>Actg2</i>	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	14891,44	1,06
P68035	<i>Actc1</i>	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	15846,68	1,06
D3ZRN3	<i>Actbl2</i>	<i>Protein Actbl2</i>	6740,97	1,05
P60711	<i>Actb</i>	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	19399,04	1,05
P68136	<i>Acta1</i>	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	14594,31	1,05
P63259	<i>Actg1</i>	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	19399,04	1,04
V9GZ85	<i>LOC100361457</i>	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	19399,04	1,04
D3ZXS6	<i>RGD1566344</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	980,66	0,93
G3V9Y1	<i>Myh10</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b</i>	242,11	0,93
M0R757	<i>LOC100360413</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	980,66	0,93
P62630	<i>Eef1a1</i>	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	980,66	0,93
M0RAS8	<i>Non-identified</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	980,66	0,93
P38983	<i>Rpsa</i>	<i>40S ribosomal protein SA</i>	1857,71	0,92
Q9JLT0	<i>Myh10</i>	<i>Myosin-10</i>	244,53	0,92
P04785	<i>P4hb</i>	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	246,9	0,9
D3ZWE0	<i>Hist2h2ab</i>	<i>Histone H2A</i>	681,81	0,89
P04904	<i>Gsta3</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-3</i>	443,91	0,88
P38918	<i>Akr7a3</i>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3</i>	1742,29	0,88
Q5BJT9	<i>Ckmt1b</i>	<i>Creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous</i>	464,88	0,88
F1LML2	<i>Ubc</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	481,18	0,86
G3V9Z2	<i>LOC100360645</i>	<i>Protein LOC100360645</i>	481,18	0,86
Q07936	<i>Anxa2</i>	<i>Annexin A2</i>	457	0,86
M0RBL0	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	178,63	0,85
P04182	<i>Oat</i>	<i>Ornithine aminotransferase, mitochondrial</i>	658,6	0,85
M0R9W7	<i>LOC679149</i>	<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	222	0,85
G3V8I8	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	178,63	0,84

P31232	<i>Tagln</i>	<i>Transgelin</i>	1819,18	0,84
G3V8A9	<i>Pnliprp1</i>	<i>Triacylglycerol lipase</i>	203,89	0,83
G3V9D8	<i>Ces2c</i>	<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	135,77	0,83
P54316	<i>Pnliprp1</i>	<i>Inactive pancreatic lipase-related protein 1</i>	203,89	0,83
Q6NYB7	<i>Rab1A</i>	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>	226,03	0,83
P04906	<i>Gstp1</i>	<i>Glutathione S-transferase P</i>	915,84	0,82
P07338	<i>Ptrb1</i>	<i>Chymotrypsinogen B</i>	2068,08	0,81
F1MA56	<i>Ptrb1</i>	<i>Chymotrypsinogen B</i>	2068,08	0,8
P00406	<i>Mtco2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	708,6	0,79
P14942	<i>Gsta4</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-4</i>	357	0,79
P58775	<i>Tpm2</i>	<i>Tropomyosin beta chain</i>	1205,75	0,79
Q8SEZ5	<i>Mt-co2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	708,6	0,78
D4ADS8	<i>Rab4a</i>	<i>Ras-related protein Rab-4A</i>	299,11	0,76
M0R6Y8	<i>RGD1560402</i>	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	248,28	0,76
P55260	<i>Anxa4</i>	<i>Annexin A4</i>	288,42	0,76
P04642	<i>Ldha</i>	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1875,49	0,76
P13221	<i>Got1</i>	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	143,63	0,76
G3V976	<i>Cpa2</i>	<i>Carboxypeptidase A2</i>	727,58	0,75
P05714	<i>Rab4a</i>	<i>Ras-related protein Rab-4A</i>	299,11	0,75
P19222	<i>Cpa2</i>	<i>Carboxypeptidase A2</i>	727,58	0,75
P63245	<i>Gnb2l1</i>	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	297,71	0,75
Q5RKJ9	<i>Rab10</i>	<i>RAB10, member RAS oncogene family</i>	226,03	0,75
F1M5M8	<i>Rab37</i>	<i>Protein LOC100364984</i>	226,03	0,74
P62804	<i>Hist1h4b</i>	<i>Histone H4</i>	5707,84	0,74
P63039	<i>Hspd1</i>	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	257,82	0,74
Q5U362	<i>Anxa4</i>	<i>Annexin</i>	288,42	0,74
P10536	<i>Rab1b</i>	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>	226,03	0,72
D4A0G7	<i>Rab37</i>	<i>Protein LOC100364984</i>	226,03	0,72
G3V6H0	<i>LOC100363782</i>	<i>Protein LOC100363782</i>	226,03	0,72
P51156	<i>Rab26</i>	<i>Ras-related protein Rab-26</i>	226,03	0,72
P70550	<i>Rab8b</i>	<i>Ras-related protein Rab-8B</i>	226,03	0,7
Q05962	<i>Slc25a4</i>	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	716,67	0,68
Q09073	<i>Slc25a5</i>	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	716,67	0,68
Q6P9Y4	<i>Slc25a4</i>	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	469,81	0,68
E2RUH2	<i>Rnh1</i>	<i>Ribonuclease inhibitor</i>	208,05	0,67

Q8CJD3	Zg16	Zymogen granule membrane protein 16	404,48	0,65
P29315	Rnh1	Ribonuclease inhibitor	208,05	0,65
D3ZLL8	LOC691716	Protein LOC100909878	291,28	0,63
G3V741	Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	154,56	0,63
G3V7Q8	Prss3	Cationic trypsinogen	248,17	0,63
G3V8A7	Pnlip	Triacylglycerol lipase	1482,54	0,63
P08426	Try3	Cationic trypsin-3	248,17	0,63
P27657	Pnlip	Pancreatic triacylglycerol lipase	1482,54	0,63
G3V6S2	Aco1	Aconitate hydratase	199,01	0,63
P42123	Ldhd	L-lactate dehydrogenase B chain	921,55	0,63
D3ZAM3	Cpb1	Carboxypeptidase B	1290,17	0,62
M0RC99	Rab5a	Ras-related protein Rab-5A	120,27	0,61
P16036	Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	188,86	0,61
P19223	Cpb1	Carboxypeptidase B	1321,55	0,61
P62246	Rps15a	40S ribosomal protein S15a	291,28	0,6
E9PSI7	Amy2a3	Alpha-amylase	6772,62	0,58
P00689	Amy2	Pancreatic alpha-amylase	7901,7	0,58
P55091	Ctrc	Chymotrypsin-C	383,63	0,58
P07340	Atp1b1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	484,95	0,56
A0A096MJ19	Atp1b1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	484,95	0,55
G3V844	Amy2a3	Alpha-amylase	7901,27	0,55
P00773	Cela1	Chymotrypsin-like elastase family member 1	258,39	0,54
G3V7G2	Cel	Carboxylic ester hydrolase	388,06	0,53
P00762	Prss1	Anionic trypsin-1	457,37	0,51
P07882	Cel	Bile salt-activated lipase	388,06	0,51
P00774	Cela2a	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	455,68	0,48
Q9Z1N4	Bpnt1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	238,12	0,48
F1M219	Non-identified	Alpha-amylase	1433,91	0,48
P00731	Cpa1	Carboxypeptidase A1	135,64	0,48
E9PSQ1	Amy1a	Alpha-amylase	1384,24	0,46
G3V729	Prg2	Bone marrow proteoglycan	349,15	0,42
Q63189	Prg2	Bone marrow proteoglycan	349,15	0,39
G3V786	Akr1b8	Protein Akr1b8	248,15	0,37
Q5M875	Hsd17b13	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13	125,05	0,37

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor da razão entre a expressão da proteína Grupo de 10 ppm F : Grupo Controle. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 35. Proteínas identificadas no duodeno de ratos com expressão diferencial (suprarreguladas ou subrreguladas) no grupo de 50 ppm F em relação ao grupo Controle (0 ppm F). Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias.

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score	Razão da expressão da proteína Grupo de 50 ppm F : Grupo Controle
F1M516	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	250	2,27
Q62669	<i>Hbb-b1</i>	<i>Protein Hbb-b1</i>	285	2,17
P0CG51	<i>Ubb</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	481	1,59
P00773	<i>Cela1</i>	<i>Chymotrypsin-like elastase family member 1</i>	258	1,56
P01946	<i>Hba1</i>	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>	2052	1,32
P16409	<i>Myl3</i>	<i>Myosin light chain 3</i>	341	1,32
D3ZFG3	<i>Cela3b</i>	<i>Elastase 3B, pancreatic, isoform CRA_b</i>	304	1,3
Q00729	<i>Hist1h2ba</i>	<i>Histone H2B type 1-A</i>	320	1,26
D3ZSM0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	262	1,2
P02770	<i>Alb</i>	<i>Serum albumin</i>	1710	1,15
D3ZJF8	<i>Fcgbp</i>	<i>Protein Fcgbp</i>	294	1,11
P06761	<i>Hspa5</i>	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	1443	1,09
Q08290	<i>Cnn1</i>	<i>Calponin-1</i>	189	1,27
C0JPT7	<i>Flna</i>	<i>Filamin alpha</i>	930	0,94
M0RCB1	<i>LOC102549957</i>	<i>Protein LOC102549957</i>	2328	0,94
O88752	<i>Hbe1</i>	<i>Epsilon 1 globin</i>	4172	0,94
P02091	<i>Hbb</i>	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	7607	0,94
F7FK40	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c</i>	2083	0,93
M0R8M9	<i>Hspa8</i>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	2699	0,93
P63018	<i>Hspa8</i>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	2677	0,93
A0A0A0MXW3	<i>H2afz</i>	<i>Histone H2A.Z</i>	1030	0,91
D4ACV3	<i>Hist2h2ac</i>	<i>Histone H2A</i>	1030	0,91
F1LML2	<i>Ubc</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	481	0,91
P04692	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	1653	0,91
P0C169	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 1-C</i>	1030	0,91
P13832	<i>Rlc-a</i>	<i>Myosin regulatory light chain RLC-A</i>	2477	0,91
P18666	<i>Myl12b</i>	<i>Myosin regulatory light chain 12B</i>	2513	0,91
Q63081	<i>Pdia6</i>	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	356	0,91
A9UMV8	<i>H2aff</i>	<i>Histone H2A.J</i>	1030	0,90
D3ZWE0	<i>Hist2h2ab</i>	<i>Histone H2A</i>	682	0,90
D3ZXP3	<i>H2afx</i>	<i>Histone H2A</i>	1030	0,90

D4AEC0	H2afv	Histone H2A	1030	0,90
P02262	Non-identified	Histone H2A type 1	1030	0,90
P07338	Ptrb1	Chymotrypsinogen B	2068	0,90
P0C0S7	H2afz	Histone H2A.Z	1030	0,90
P0C170	Non-identified	Histone H2A type 1-E	1030	0,90
P0CC09	Hist2h2aa3	Histone H2A type 2-A	1030	0,90
Q4FZT6	Non-identified	Histone H2A type 3	1030	0,90
Q64598	Non-identified	Histone H2A type 1-F	1030	0,90
Q9QXQ0	Actn4	Alpha-actinin-4	738	0,90
Q9Z1P2	Actn1	Alpha-actinin-1	505	0,90
D3ZIA7	Agr2	Anterior gradient 2 (Xenopus laevis)	2954	0,90
D3ZVK7	Hist1h2ak	Histone H2A	1030	0,90
M0RCL5	LOC100910554	Histone H2A	1030	0,90
M0RDM4	LOC680322	Histone H2A	1030	0,90
Q6I8Q6	Hist1h2af	Histone H2A	1030	0,90
P07335	Ckb	Creatine kinase B-type	2401	0,89
P48675	Des	Desmin	4826	0,89
Q00728	Non-identified	Histone H2A type 4	1030	0,89
Q6P725	Des	Desmin	4826	0,89
D4A115	Col6a3	Protein Col6a3	198	0,88
D4A111	Col6a3	Protein Col6a3	102	0,87
F1LNH3	Col6a2	Procollagen, type VI, alpha 2, isoform CRA_a	223	0,87
E9PTU4	Myh11	Myosin-11	2660	0,86
G3V9Z2	LOC100360645	Protein LOC100360645	481	0,86
D3ZUL3	Col6a1	Protein Col6a1	476	0,84
P82995	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	1114	0,84
Q6IFV4	Krt13	Keratin, type I cytoskeletal 13	843	0,84
M0R6J6	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	322	0,84
M0R6X5	Non-identified	Histone H2A	534	0,84
P09605	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	322	0,84
P10719	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4833	0,84
Q63862	Myh11	Myosin-11	2051	0,84
G3V6D3	Atp5b	ATP synthase subunit beta	4833	0,83
Q9ER34	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	429	0,83
B5DFH4	Papss2	Papss2 protein	2031	0,82
F1M6C2	LOC100360150	Elongation factor 1-alpha	750	0,82
G3V8C3	Vim	Vimentin	442	0,82
P18418	Calr	Calreticulin	413	0,82
P34058	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	2306	0,82

Q09073	<i>Slc25a5</i>	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	717	0,82
D3ZXS6	<i>RGD1566344</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	981	0,81
G3V8A9	<i>Pnliprp1</i>	<i>Inactive pancreatic lipase-related protein 1</i>	204	0,81
G3V9D8	<i>Ces2c</i>	<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	136	0,81
M0R757	<i>LOC100360413</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	981	0,81
M0RAS8	<i>Non-identified</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	981	0,81
M0RBL5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	224	0,81
P05065	<i>Aldoa</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	1056	0,81
P31000	<i>Vim</i>	<i>Vimentin</i>	449	0,81
P61107	<i>Rab14</i>	<i>Ras-related protein Rab-14</i>	226	0,81
P62630	<i>Eef1a1</i>	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	981	0,81
P62632	<i>Eef1a2</i>	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	750	0,81
G3V976	<i>Cpa2</i>	<i>Carboxypeptidase A2</i>	728	0,80
M0R8B6	<i>Tubb1</i>	<i>Protein Tubb1</i>	679	0,80
P54316	<i>Pnliprp1</i>	<i>Inactive pancreatic lipase-related protein 1</i>	204	0,80
P62804	<i>Hist1h4b</i>	<i>Histone H4</i>	5708	0,80
Q5D059	<i>LOC100363335</i>	<i>Hnrpk protein</i>	261	0,80
F1LTA7	<i>LOC100909504</i>	<i>Protein LOC100909504</i>	2181	0,79
P19222	<i>Cpa2</i>	<i>Carboxypeptidase A2</i>	728	0,79
P25809	<i>Ckmt1</i>	<i>Creatine kinase U-type, mitochondrial</i>	232	0,79
Q6P3V8	<i>Eif4a1</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A1</i>	258	0,79
R9PXU6	<i>Vcl</i>	<i>Vinculin</i>	218	0,79
F1LPR6	<i>Ighm</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	3020	0,79
F1LTQ2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	6608	0,79
P11884	<i>Aldh2</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	288	0,79
P38918	<i>Akr7a3</i>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3</i>	1742	0,79
P62824	<i>Rab3c</i>	<i>Ras-related protein Rab-3C</i>	177	0,79
Q6AY07	<i>Aldoart2</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	270	0,79
D3ZYW2	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	149	0,78
M0R9W7	<i>LOC679149</i>	<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	222	0,78
P12346	<i>Tf</i>	<i>Serotransferrin</i>	572	0,78
Q7TMC7	<i>Tf</i>	<i>Ab2-417</i>	578	0,78
E9PU16	<i>Rab1a</i>	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>	218	0,77
F1LN88	<i>Aldh2</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	285	0,77
O70177	<i>LOC100365112</i>	<i>Carboxylesterase</i>	189	0,77
P85972	<i>Vcl</i>	<i>Vinculin</i>	218	0,77
Q4QQV0	<i>Tubb6</i>	<i>Protein Tubb6</i>	2422	0,77
Q68FY0	<i>Uqcrc1</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	341	0,77
P00884	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	2972	0,76

P55260	<i>Anxa4</i>	<i>Annexin A4</i>	288	0,76
P85973	<i>Pnp</i>	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	525	0,76
Q4QRB4	<i>Tubb3</i>	<i>Tubulin beta-3 chain</i>	2930	0,76
D3ZXK9	<i>Pnp</i>	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	525	0,76
M0RBY5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	903	0,76
P04636	<i>Mdh2</i>	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	3827	0,76
P05714	<i>Rab4a</i>	<i>Ras-related protein Rab-4A</i>	299	0,76
Q68FR8	<i>Tuba3a</i>	<i>Tubulin alpha-3 chain</i>	192	0,76
A0A0A0MY09	<i>Hsp90b1</i>	<i>Endoplasmin</i>	554	0,75
D4ADS8	<i>Rab4a</i>	<i>Ras-related protein Rab-4A</i>	299	0,75
E9PSI7	<i>Amy2a3</i>	<i>Alpha-amylase</i>	6773	0,75
G3V9Q3	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	149	0,75
P14668	<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	154	0,75
P29315	<i>Rnh1</i>	<i>Ribonuclease inhibitor</i>	208	0,75
Q5BJT9	<i>Ckmt1b</i>	<i>Creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous</i>	465	0,75
Q5U206	<i>Calml3</i>	<i>Calmodulin-like protein 3</i>	358	0,75
Q5U362	<i>Anxa4</i>	<i>Annexin</i>	288	0,75
Q5XIF6	<i>Tuba4a</i>	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	239	0,75
Q66HH8	<i>Anxa5</i>	<i>Annexin</i>	154	0,75
Q6AY56	<i>Tuba8</i>	<i>Tubulin alpha-8 chain</i>	179	0,75
E2RUH2	<i>Rnh1</i>	<i>Ribonuclease inhibitor</i>	208	0,74
G3V7J5	<i>Ces2e</i>	<i>Carboxylesterase 5, isoform CRA_a</i>	347	0,74
P00689	<i>Amy2</i>	<i>Pancreatic alpha-amylase</i>	7902	0,74
Q66HD0	<i>Hsp90b1</i>	<i>Endoplasmin</i>	558	0,74
D3ZVT6	<i>Asb7</i>	<i>Ankyrin repeat and SOCS box-containing 7</i>	158	0,73
G3V8A7	<i>Pnlip</i>	<i>Pancreatic lipase, isoform CRA_a</i>	1483	0,73
P27657	<i>Pnlip</i>	<i>Pancreatic triacylglycerol lipase</i>	1483	0,73
P46462	<i>Vcp</i>	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	332	0,73
P85108	<i>Tubb2a</i>	<i>Tubulin beta-2A chain</i>	5257	0,73
Q07936	<i>Anxa2</i>	<i>Annexin A2</i>	457	0,73
Q66HT1	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	3339	0,73
F7F3M3	<i>Ces2a</i>	<i>Protein Ces2a</i>	347	0,73
P63039	<i>Hspd1</i>	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	258	0,73
P69897	<i>Tubb5</i>	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	5382	0,73
Q3KRE8	<i>Tubb2b</i>	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	5228	0,73
Q6NYB7	<i>Rab1A</i>	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>	226	0,73
Q6P9Y4	<i>Slc25a4</i>	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	470	0,73
D3Z7Y6	<i>Krt20</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	1113	0,72
D3ZXQ0	<i>Ces2g</i>	<i>Protein Ces2g</i>	347	0,72

Q05962	<i>Slc25a4</i>	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	482	0,72
B5DFA0	<i>Vil1</i>	<i>Protein Vil1</i>	612	0,71
G3V6P7	<i>Myh9</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle</i>	236	0,71
P04182	<i>Oat</i>	<i>Ornithine aminotransferase, mitochondrial</i>	659	0,71
P15999	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	3210	0,71
P16617	<i>Pgk1</i>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	790	0,71
P63245	<i>Gnb2l1</i>	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	298	0,71
Q62812	<i>Myh9</i>	<i>Myosin-9</i>	222	0,71
Q63716	<i>Prdx1</i>	<i>Peroxiredoxin-1</i>	825	0,71
D3ZB30	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c</i>	130	0,70
D3ZRN3	<i>Actbl2</i>	<i>Protein Actbl2</i>	6741	0,70
F1LP05	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	3199	0,70
F1M5M8	<i>Rab37</i>	<i>Protein LOC100364984</i>	226	0,70
G3V8L1	<i>Pycard</i>	<i>PYD and CARD domain containing</i>	389	0,70
P06768	<i>Rbp2</i>	<i>Retinol-binding protein 2</i>	552	0,70
P07756	<i>Cps1</i>	<i>Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial</i>	135	0,70
P35280	<i>Rab8a</i>	<i>Ras-related protein Rab-8A</i>	218	0,70
P68035	<i>Actc1</i>	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	15847	0,70
P68136	<i>Acta1</i>	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	14594	0,70
D4A5P1	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	3139	0,70
P38983	<i>Rpsa</i>	<i>40S ribosomal protein SA</i>	1858	0,70
P62738	<i>Acta2</i>	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	15015	0,70
P63269	<i>Actg2</i>	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	14891	0,70
Q5RKJ9	<i>Rab10</i>	<i>RAB10, member RAS oncogene family</i>	226	0,70
D4A0G7	<i>Rab37</i>	<i>Protein LOC100364984</i>	226	0,69
F1LM18	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	130	0,69
P10536	<i>Rab1b</i>	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>	226	0,69
P25030	<i>Krt20</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	1113	0,69
P35284	<i>Rab12</i>	<i>Ras-related protein Rab-12</i>	218	0,69
P63012	<i>Rab3a</i>	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	218	0,69
Q00438	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	130	0,69
Q63941	<i>Rab3b</i>	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	244	0,69
P07943	<i>Akr1b1</i>	<i>Aldose reductase</i>	152	0,68
P51156	<i>Rab26</i>	<i>Ras-related protein Rab-26</i>	226	0,68
Q53B90	<i>Rab43</i>	<i>Ras-related protein Rab-43</i>	218	0,68
G3V7Q8	<i>Prss3</i>	<i>Cationic trypsinogen</i>	248	0,68
M0R4D7	<i>LOC100910820</i>	<i>Protein LOC100910820</i>	1986	0,68
P35281	<i>Rab10</i>	<i>Ras-related protein Rab-10</i>	218	0,68
P60711	<i>Actb</i>	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	19399	0,68

P63259	<i>Actg1</i>	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	19399	0,68
D3ZAU6	<i>RGD1561919</i>	<i>Protein RGD1561919</i>	205	0,67
P08426	<i>Try3</i>	<i>Cationic trypsin-3</i>	248	0,67
P19629	<i>Ldhc</i>	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	215	0,67
P51146	<i>Rab4b</i>	<i>Ras-related protein Rab-4B</i>	218	0,67
P70550	<i>Rab8b</i>	<i>Ras-related protein Rab-8B</i>	226	0,67
V9GZ85	<i>LOC100361457</i>	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	19399	0,67
B4F7C2	<i>Tubb4a</i>	<i>Protein Tubb4a</i>	3837	0,66
G3V6H0	<i>LOC100363782</i>	<i>Protein LOC100363782</i>	226	0,66
P06687	<i>Atp1a3</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3</i>	193	0,66
D3ZSY4	<i>Epx</i>	<i>Eosinophil peroxidase</i>	343	0,66
Q6AYX2	<i>Ldhc</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	215	0,66
D3ZCV0	<i>Actn2</i>	<i>Protein Actn2</i>	196	0,65
D3ZE29	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	252	0,65
D4AC62	<i>Krt222</i>	<i>Protein Krt222</i>	564	0,65
M0RDI1	<i>LOC102550391</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	444	0,65
D4A376	<i>Rab12</i>	<i>Ras-related protein Rab-12</i>	218	0,64
P62161	<i>Calm1</i>	<i>Calmodulin</i>	332	0,64
G3V8I1	<i>Alpi</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	415	0,64
G3V9Y1	<i>Myh10</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b</i>	242	0,64
Q9JLT0	<i>Myh10</i>	<i>Myosin-10</i>	245	0,64
M0RBL0	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	179	0,63
P00770	<i>Mcpt2</i>	<i>Mast cell protease 2</i>	1460	0,63
P06685	<i>Atp1a1</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	551	0,63
P19223	<i>Cpb1</i>	<i>Carboxypeptidase B</i>	1322	0,62
P50399	<i>Gdi2</i>	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	609	0,62
Q08163	<i>Cap1</i>	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	304	0,62
Q8VHF5	<i>Cs</i>	<i>Citrate synthase, mitochondrial</i>	270	0,62
G3V936	<i>Cs</i>	<i>Citrate synthase</i>	270	0,61
M0R451	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	2197	0,61
P50398	<i>Gdi1</i>	<i>Rab GDP dissociation inhibitor alpha</i>	430	0,61
Q8CJD3	<i>Zg16</i>	<i>Zymogen granule membrane protein 16</i>	404	0,61
F7EPH4	<i>Ppa1</i>	<i>Protein Ppa1</i>	162	0,61
G3V8I8	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	179	0,61
Q9ESV6	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific</i>	3498	0,61
D4A3W5	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	2138	0,60
P04642	<i>Ldha</i>	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1875	0,60
P38552	<i>Lgals4</i>	<i>Galectin-4</i>	519	0,60
Q63942	<i>Rab3d</i>	<i>GTP-binding protein Rab-3D</i>	157	0,60

D3ZAM3	<i>Cpb1</i>	<i>Carboxypeptidase B</i>	1290	0,59
G3V844	<i>Amy2a3</i>	<i>Alpha-amylase</i>	7901	0,59
P04906	<i>Gstp1</i>	<i>Glutathione S-transferase P</i>	916	0,59
B1WBQ8	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	3498	0,59
F1M2N4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2197	0,59
M0R590	<i>LOC685186</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5596	0,59
P06686	<i>Atp1a2</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2</i>	193	0,58
E9PTN6	<i>RGD1564688</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5589	0,58
F1M779	<i>Cltc</i>	<i>Clathrin heavy chain</i>	143	0,58
G3V7C6	<i>Tubb4b</i>	<i>RCG45400</i>	5469	0,58
P11442	<i>Cltc</i>	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	146	0,58
F1M219	<i>Non-identified</i>	<i>Alpha-amylase</i>	1434	0,57
P04797	<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5596	0,57
Q6P9V9	<i>Tuba1b</i>	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	2611	0,57
G3V741	<i>Slc25a3</i>	<i>Phosphate carrier protein, mitochondrial</i>	155	0,57
P55091	<i>Ctrc</i>	<i>Chymotrypsin-C</i>	384	0,57
P00406	<i>Mtco2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	709	0,56
P16036	<i>Slc25a3</i>	<i>Phosphate carrier protein, mitochondrial</i>	189	0,56
D3ZGY4	<i>Gapdh-ps2</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5596	0,55
P62963	<i>Pfn1</i>	<i>Profilin-1</i>	348	0,54
Q8SEZ5	<i>Mt-co2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	709	0,54
P04903	<i>Gsta2</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-2</i>	444	0,54
P67779	<i>Phb</i>	<i>Prohibitin</i>	250	0,54
M0R660	<i>RGD1565368</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5589	0,53
P50137	<i>Tkt</i>	<i>Transketolase</i>	342	0,53
P04904	<i>Gsta3</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-3</i>	444	0,52
F7F2H5	<i>Gsta2</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	444	0,52
P00502	<i>Gsta1</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-1</i>	444	0,52
G3V826	<i>Tkt</i>	<i>Transketolase</i>	279	0,51
P68370	<i>Tuba1a</i>	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	2611	0,50
Q4FZZ3	<i>Gsta5</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	444	0,50
B0BNA5	<i>Cotl1</i>	<i>Coactosin-like protein</i>	353	0,49
Q6AYZ1	<i>Tuba1c</i>	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	2648	0,49
E9PSQ1	<i>Amy1a</i>	<i>Alpha-amylase</i>	1384	0,48

Q6P9T8	<i>Tubb4b</i>	<i>Tubulin beta-4B chain</i>	4837	0,48
G3V7G2	<i>Cel</i>	<i>Bile salt-activated lipase</i>	388	0,47
P07882	<i>Cel</i>	<i>Bile salt-activated lipase</i>	388	0,47
D3Z8U8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,46
D3ZIY0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,46
P42123	<i>Ldhb</i>	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	922	0,46
M0R5B4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2432	0,46
M0RBH6	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,46
E9PTV9	<i>RGD1562758</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	2145	0,45
P00762	<i>Prss1</i>	<i>Anionic trypsin-1</i>	457	0,45
D3ZXS2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,44
Q68FR6	<i>Eef1g</i>	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	133	0,44
F1M7P4	<i>Prph</i>	<i>Peripherin</i>	402	0,44
F1M9J9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,44
F1M4G6	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	2138	0,43
P21807	<i>Prph</i>	<i>Peripherin</i>	402	0,43
Q6IG12	<i>Krt7</i>	<i>Keratin, type II cytoskeletal 7</i>	323	0,42
G3V712	<i>Krt7</i>	<i>Keratin complex 2, basic, gene 7, isoform CRA_a</i>	323	0,41
P04166	<i>Cyb5b</i>	<i>Cytochrome b5 type B</i>	566	0,39
F1M3U4	<i>Gm15294</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	1314	0,39
P07340	<i>Atp1b1</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1</i>	485	0,35
G3V729	<i>Prg2</i>	<i>Bone marrow proteoglycan</i>	349	0,35
Q63189	<i>Prg2</i>	<i>Bone marrow proteoglycan</i>	349	0,34
A0A096MJI9	<i>Atp1b1</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1</i>	485	0,34

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor da razão entre a expressão da proteína Grupo de 50 ppm F: Grupo Controle. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 36. Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo controle da exposição crônica (ingestão de água deionizada por 30 dias).

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score
F1M6F4	<i>LOC100912210</i>	<i>Protein LOC100912210</i>	1335
M0R763	<i>LOC100911337</i>	<i>Protein LOC100911337</i>	1294
P62853	<i>Rps25</i>	<i>40S ribosomal protein S25</i>	1294
P00330	<i>ADH1</i>	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	1009
D3ZAF6	<i>Atp5j2</i>	<i>ATP synthase subunit f, mitochondrial</i>	775
P10860	<i>Glud1</i>	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	603
P04166	<i>Cyb5b</i>	<i>Cytochrome b5 type B</i>	566
B2RZD6	<i>Ndufa4</i>	<i>Ndufa4 protein</i>	502
B2RZD1	<i>Sec61b</i>	<i>Protein Sec61b</i>	467
F7FLF2	<i>Rpl22</i>	<i>Protein LOC100360057</i>	463
P47198	<i>Rpl22</i>	<i>60S ribosomal protein L22</i>	463
B2RZ72	<i>Arpc4</i>	<i>Actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (Predicted), isoform CRA_a</i>	452
B2RZA9	<i>Ube2l3</i>	<i>Protein Ube2l3</i>	422
G3V8L1	<i>Pycard</i>	<i>PYD and CARD domain containing</i>	389
G3V6G1	<i>Igj</i>	<i>Immunoglobulin joining chain</i>	383
P08010	<i>Gstm2</i>	<i>Glutathione S-transferase Mu 2</i>	376
Q5U206	<i>Calml3</i>	<i>Calmodulin-like protein 3</i>	358
D3Z8N2	<i>Rnf187</i>	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF187</i>	357
D3ZXQ0	<i>Ces2g</i>	<i>Protein Ces2g</i>	347
F7F3M3	<i>Ces2a</i>	<i>Protein Ces2a</i>	347
G3V7J5	<i>Ces2e</i>	<i>Carboxylesterase 5, isoform CRA_a</i>	347
D4AB87	<i>Gstm6l</i>	<i>Protein Gstm6l</i>	328
Q00729	<i>Hist1h2ba</i>	<i>Histone H2B type 1-A</i>	320
P0C5J3	<i>B9d2</i>	<i>B9 domain-containing protein 2</i>	316
D3ZG05	<i>LOC100912049</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	285
D3ZVQ8	<i>Gstm6</i>	<i>Protein Gstm6</i>	283

F1LXL7	<i>Gstm6l</i>	<i>Protein Gstm6</i>	283
Q5BK56	<i>Gstm4</i>	<i>Glutathione S-transferase mu 4</i>	283
Q9Z1B2	<i>Gstm5</i>	<i>Glutathione S-transferase Mu 5</i>	283
A0A096MJL6	<i>Pgk1</i>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	282
D3ZN21	<i>Ddx3y</i>	<i>Protein Ddx3y</i>	280
D4ADE8	<i>Ddx3x</i>	<i>DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked</i>	280
Q5M860	<i>Arhgdib</i>	<i>Protein Arhgdib</i>	254
F1M516	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	250
Q91ZN1	<i>Coro1a</i>	<i>Coronin-1A</i>	247
P51635	<i>Akr1a1</i>	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	240
P25235	<i>Rpn2</i>	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2</i>	229
Q9WVB9	<i>Dvl1</i>	<i>Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1</i>	224
D4A376	<i>Rab12</i>	<i>Ras-related protein Rab-12</i>	218
E9PU16	<i>Rab1a</i>	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>	218
P35280	<i>Rab8a</i>	<i>Ras-related protein Rab-8A</i>	218
P35281	<i>Rab10</i>	<i>Ras-related protein Rab-10</i>	218
P35284	<i>Rab12</i>	<i>Ras-related protein Rab-12</i>	218
P51146	<i>Rab4b</i>	<i>Ras-related protein Rab-4B</i>	218
P63012	<i>Rab3a</i>	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	218
Q53B90	<i>Rab43</i>	<i>Ras-related protein Rab-43</i>	218
Q5U316	<i>Rab35</i>	<i>Ras-related protein Rab-35</i>	218
D3ZX74	<i>Coq10a</i>	<i>Coenzyme Q10 homolog A (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b</i>	215
D3ZD94	<i>RGD1562107</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	212
F1LVC6	<i>LOC100365881</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	212
F1M0Q4	<i>LOC679594</i>	<i>Protein LOC679594</i>	211
D3ZEZ9	<i>Svil</i>	<i>Protein Svil</i>	209
Q561S0	<i>Ndufa10</i>	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	207
F1M9K9	<i>Kif1b</i>	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>	206
P85968	<i>Pgd</i>	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>	206

D3ZAU6	<i>RGD1561919</i>	<i>Protein RGD1561919</i>	205
A0A096P6M0	<i>Oaz3</i>	<i>Ornithine decarboxylase antizyme 3</i>	205
A1BPI0	<i>Oaz3</i>	<i>Ornithine decarboxylase antizyme 3</i>	205
Q5RJR8	<i>Lrrc59</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 59</i>	205
P55213	<i>Casp3</i>	<i>Caspase-3</i>	201
D3ZFH6	<i>Phb-ps1</i>	<i>RCG33110</i>	201
F1M155	<i>Svil</i>	<i>Protein Svil</i>	201
D4AA19	<i>RGD1306519</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	200
F1LWV4	<i>RGD1306519</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	199
F1M7S2	<i>Psmf1</i>	<i>Proteasome inhibitor PI31 subunit</i>	196
Q5XIU5	<i>Psmf1</i>	<i>Proteasome inhibitor PI31 subunit</i>	196
Q925D2	<i>Bik</i>	<i>Bcl2-interacting killer, isoform CRA_a</i>	196
Q78PB6	<i>Ndel1</i>	<i>Nuclear distribution protein nudE-like 1</i>	195
D3ZQS5	<i>Svil</i>	<i>Protein Svil</i>	191
D4A8G5	<i>Tgfbi</i>	<i>Protein Tgfbi</i>	189
A1L128	<i>Adh4</i>	<i>Alcohol dehydrogenase 4</i>	189
Q64563	<i>Adh4</i>	<i>Alcohol dehydrogenase 4</i>	189
F1LU96	<i>Nckap5</i>	<i>Protein Nckap5</i>	185
M0RAD4	<i>Nckap5</i>	<i>Protein Nckap5</i>	185
F1M7S7	<i>Rab17</i>	<i>Protein Rab17</i>	184
D3ZF34	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	181
D3ZME6	<i>Syncrip</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	181
Q68A21	<i>Purb</i>	<i>Transcriptional activator protein Pur-beta</i>	179
A1L1J8	<i>Rab5b</i>	<i>Protein Rab5b</i>	179
B0BNK1	<i>Rab5c</i>	<i>Protein Rab5c</i>	179
P35171	<i>Cox7a2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial</i>	179
D3ZUQ5	<i>Vom2r34</i>	<i>Protein Vom2r35</i>	179
F8WFF9	<i>Lrrc57</i>	<i>Protein LOC100910478</i>	178
P62824	<i>Rab3c</i>	<i>Ras-related protein Rab-3C</i>	177

F1LQS6	<i>Xdh</i>	<i>RCG61833</i>	177
P22985	<i>Xdh</i>	<i>Xanthine dehydrogenase/oxidase</i>	177
Q499N1	<i>Rara</i>	<i>Protein Rara</i>	171
M0R5T0	<i>Nckap5</i>	<i>Protein Nckap5</i>	168
D4ADU8	<i>Non-identified</i>	<i>Pyruvate kinase</i>	167
D3ZIE1	<i>RGD1566369</i>	<i>40S ribosomal protein S8</i>	164
F1LSQ6	<i>PsmA7</i>	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	163
F1M6I7	<i>PsmA8</i>	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	163
D4AEL0	<i>LOC691083</i>	<i>Protein LOC691083</i>	162
M0R7B5	<i>LOC102554611</i>	<i>Protein LOC102554611</i>	161
Q68FU3	<i>EtfB</i>	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	161
Q9WVJ6	<i>Tgm2</i>	<i>Protein Tgm2</i>	160
D3ZLP4	<i>Tuba1b</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	160
F1LRJ9	<i>Selenbp1</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	159
Q8VIF7	<i>Selenbp1</i>	<i>Selenium-binding protein 1</i>	159
Q63942	<i>Rab3d</i>	<i>GTP-binding protein Rab-3D</i>	157
F1LXU3	<i>Gpr87</i>	<i>Protein Gpr87</i>	157
P21643	<i>Tdo2</i>	<i>Tryptophan 2,3-dioxygenase</i>	153
P07943	<i>Akr1b1</i>	<i>Aldose reductase</i>	152
P32551	<i>Uqcrc2</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial</i>	151
D3ZEV0	<i>LOC100912427</i>	<i>Protein LOC100912427</i>	150
F1LPL7	<i>LOC100912427</i>	<i>Protein LOC100912427</i>	150
P62961	<i>Ybx1</i>	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	150
Q3ZAV2	<i>Ybx1</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	150
B0BNJ1	<i>Sri</i>	<i>LOC683667 protein</i>	148
D3Z860	<i>Btbd19</i>	<i>Protein Btbd19</i>	148
O35152	<i>Bet1l</i>	<i>BET1-like protein</i>	147
M0R3K9	<i>LOC365828</i>	<i>Protein LOC365828</i>	146
Q498S5	<i>Pex7</i>	<i>Peroxisomal biogenesis factor 7</i>	146

P11442	<i>Cltc</i>	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	146
Q8VHV7	<i>Hnrnp1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	146
F1M779	<i>Cltc</i>	<i>Clathrin heavy chain</i>	143
D4AD84	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	142
Q5XI78	<i>Ogdh</i>	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial</i>	142
Q6AXX2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein C16orf46 homolog</i>	141
D3ZAN3	<i>Ganab</i>	<i>Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit</i>	140
D3ZKR3	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	140
F1LTU2	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	140
B5DEN5	<i>Eef1b2</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2</i>	140
F1M0U2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	140
D4A1W8	<i>Mttp</i>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	139
F1LR22	<i>Smyd3</i>	<i>Protein Smyd3</i>	138
Q3T1J1	<i>Eif5a</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	138
P80385	<i>Prkag1</i>	<i>5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1</i>	138
D4A7P2	<i>Lrrtm2</i>	<i>Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2</i>	137
M0RC63	<i>Lrrtm2</i>	<i>Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2</i>	137
G3V9J5	<i>Styxl1</i>	<i>Protein Styxl1</i>	137
P0C219	<i>Slmap</i>	<i>Sarcolemmal membrane-associated protein</i>	136
G3V8S4	<i>Atp12a</i>	<i>ATPase, H⁺/K⁺ transporting, nongastric, alpha polypeptide, isoform CRA_a</i>	136
P54708	<i>Atp12a</i>	<i>Potassium-transporting ATPase alpha chain 2</i>	136
D4ABX0	<i>Dcaf12l1</i>	<i>Protein Dcaf12l1</i>	136
M0R4D8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	133
M0RB43	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	133
D3ZZ81	<i>Ppfia1</i>	<i>Protein Ppfia1</i>	132
F1LWN5	<i>LOC100910427</i>	<i>Protein LOC100910427</i>	131
D3ZB30	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c</i>	130
F1LM18	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	130
Q00438	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	130

P62828	<i>Ran</i>	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	130
Q921A3	<i>Ubd</i>	<i>Ubiquitin D</i>	129
G3V8D5	<i>Pgls</i>	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	128
P85971	<i>Pgls</i>	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	128
P25113	<i>Pgam1</i>	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	128
F1M0E9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	127
Q8CG45	<i>Akr7a2</i>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>	127
P18421	<i>Psmbl</i>	<i>Proteasome subunit beta type-1</i>	127
Q6PDW4	<i>Psmbl</i>	<i>Proteasome subunit beta type</i>	127
D4A7Q5	<i>Ddx28</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28</i>	126
Q5XI38	<i>Lcp1</i>	<i>Lymphocyte cytosolic protein 1</i>	126
Q5XIE2	<i>Mterf2</i>	<i>Transcription termination factor 2, mitochondrial</i>	124
D3ZMQ7	<i>Wdr74</i>	<i>Protein Wdr74</i>	124
Q5XI36	<i>Adgre5</i>	<i>CD97 molecule</i>	123
Q5XID7	<i>Armxc3</i>	<i>Armadillo repeat-containing X-linked protein 3</i>	122
P69682	<i>Necap1</i>	<i>Adaptin ear-binding coat-associated protein 1</i>	122
D3ZM36	<i>Il10rb</i>	<i>Protein Il10rb</i>	120
Q6MG61	<i>Clic1</i>	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	120
B1WC69	<i>Nsun6</i>	<i>NOL1/NOP2/Sun domain family, member 6</i>	119
Q5FWT9	<i>Sike1</i>	<i>Suppressor of IKBKE 1</i>	119
D3ZIZ6	<i>Abcc12</i>	<i>Multidrug resistance-associated protein 9</i>	118
F1M7G9	<i>Abcc12</i>	<i>Multidrug resistance-associated protein 9</i>	118
Q6Y306	<i>Abcc12</i>	<i>Multidrug resistance-associated protein 9</i>	118
O35460	<i>Angpt1</i>	<i>Angiopoietin-1</i>	118
D4A4D4	<i>LOC290415</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	118
Q6AXV0	<i>Pnkp</i>	<i>Polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>	116
D3ZD15	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	116
P20070	<i>Cyb5r3</i>	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	115
Q6AYS8	<i>Hsd17b11</i>	<i>Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11</i>	115

F1LUT3	<i>LOC100912524</i>	<i>Protein LOC100912524</i>	113
D3ZLA3	<i>Cpne3</i>	<i>Copine 3 protein</i>	112
O35077	<i>Gpd1</i>	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic</i>	112
O89049	<i>Txnrd1</i>	<i>Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic</i>	112
R9PXU4	<i>Txnrd1</i>	<i>Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic</i>	112
D3ZR52	<i>Lpcat4</i>	<i>Protein Lpcat4</i>	112
G3V7G0	<i>Dync1li1</i>	<i>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</i>	112
Q9QXU8	<i>Dync1li1</i>	<i>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</i>	112
F1M5V8	<i>Pilra</i>	<i>Protein LOC100910669</i>	111
Q9ERE6	<i>Mprp</i>	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	111
P55281	<i>Cdh17</i>	<i>Cadherin-17</i>	110
P97527	<i>Cntn5</i>	<i>Contactin-5</i>	108
F1M0F1	<i>Onecut3</i>	<i>One cut domain family member</i>	107
D3ZIK0	<i>Glce</i>	<i>Protein Glce</i>	107
D4A8C1	<i>Kiz</i>	<i>Protein Kiz</i>	107
Q5HZE4	<i>Mri1</i>	<i>Methylthioribose-1-phosphate isomerase</i>	107
D3ZRB1	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	107
M0RCA7	<i>LOC687399</i>	<i>Protein LOC687399</i>	107
Q5U2R4	<i>Trmt10c</i>	<i>Mitochondrial ribonuclease P protein 1</i>	106
D3ZKE6	<i>Slmap</i>	<i>Sarcolemma associated protein</i>	105
F1LPB3	<i>Acsf5</i>	<i>Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5</i>	105
O88813	<i>Acsf5</i>	<i>Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5</i>	105
G3V8Q2	<i>Ina</i>	<i>Alpha-internexin</i>	105
P23565	<i>Ina</i>	<i>Alpha-internexin</i>	105
Q3T1H2	<i>Ngrn</i>	<i>Neugrin</i>	104
Q7TP13	<i>Gpt2</i>	<i>Cc2-5</i>	104
Q811U3	<i>Erc1</i>	<i>ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1</i>	104
F1M173	<i>Cntn5</i>	<i>Contactin-5</i>	102
B1WC60	<i>Pwwp2b</i>	<i>PWWP domain containing 2</i>	102
F1LSL1	<i>Purb</i>	<i>Transcription factor Pur-beta</i>	101

D3ZY42	<i>Tchp</i>	<i>Protein Tchp</i>	101
G3V6P2	<i>Dlst</i>	<i>Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), isoform CRA_a</i>	100
Q01205	<i>Dlst</i>	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	100
B5DEY0	<i>Pls1</i>	<i>Pls1 protein</i>	98
O70199	<i>Ugdh</i>	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	98
P97577	<i>Fez1</i>	<i>Fasciculation and elongation protein zeta-1</i>	96
D4A8D5	<i>Flnb</i>	<i>Filamin, beta</i>	65

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor do *score*. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 37. Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo de 10 ppm F. Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias.

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score
P13471	Rps14	40S ribosomal protein S14	1114
Q6PDV6	Rps14	Protein LOC100911847	1114
P48500	Tpi1	Triosephosphate isomerase	1041
P62859	Rps28	40S ribosomal protein S28	1016
Q5M9I5	Uqcrh	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	968
D4A0T0	Ndufb10	Protein Ndufb10	925
P62083	Rps7	40S ribosomal protein S7	761
M0R9D9	Non-identified	Uncharacterized protein	663
M0RD75	Rps6	Uncharacterized protein	629
P62755	Rps6	40S ribosomal protein S6	629
P36201	Crip2	Cysteine-rich protein 2	520
Q9Z144	Lgals2	Galectin-2	518
Q3KRD8	Eif6	Eukaryotic translation initiation factor 6	509
P00481	Otc	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	501
M0R5M7	RGD1563812	Protein RGD1560568	500
M0RB86	LOC683456	Protein LOC683456	500
Q5U3Y8	Btf3	Basic transcription factor 3	500
A7VJC2	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
F1LM82	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
F1LNF1	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
M0R6J9	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
D3ZGN8	LOC103690015	Uncharacterized protein	428
D3ZSH6	LOC100360843	Protein LOC100360843	428
D4A6G6	LOC100362339	Protein LOC100362339	428
F1LYF3	Rps19l1	Protein Rps19l1	428

F1M764	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	428
P17074	<i>Rps19</i>	<i>40S ribosomal protein S19</i>	428
Q9Z1Z9	<i>Pdlim7</i>	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>	426
D3ZWT8	<i>Atp5h</i>	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	399
P31399	<i>Atp5h</i>	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	399
D4A2K1	<i>Hoga1</i>	<i>Protein Hoga1</i>	383
D3ZXI2	<i>Gm5611</i>	<i>Protein Gm5611</i>	354
Q5XHZ0	<i>Trap1</i>	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	340
D4A1Z2	<i>Rpl26-ps2</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	330
M0R964	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	320
F1LNA9	<i>Clps</i>	<i>Colipase</i>	312
P17084	<i>Clps</i>	<i>Colipase</i>	312
P36972	<i>Aprt</i>	<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	312
P21571	<i>Atp5j</i>	<i>ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial</i>	307
D3ZA50	<i>Klhl15</i>	<i>Protein Klhl15</i>	293
M0R4A9	<i>RGD1561730</i>	<i>Protein RGD1561730</i>	291
A0A096MJE5	<i>Klhl15</i>	<i>Protein Klhl15</i>	291
G3V983	<i>Gstm1</i>	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	278
P04905	<i>Gstm1</i>	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	278
F1M2R8	<i>RGD1560936</i>	<i>60S ribosomal protein L13</i>	273
P14604	<i>Echs1</i>	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>	268
G3V7B5	<i>Prpsap1</i>	<i>Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1</i>	266
Q63468	<i>Prpsap1</i>	<i>Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1</i>	266
F1M023	<i>LOC685411</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	262
P62909	<i>Rps3</i>	<i>40S ribosomal protein S3</i>	257
D4A5L9	<i>LOC679794</i>	<i>Protein LOC690675</i>	255
P62898	<i>Cycs</i>	<i>Cytochrome c, somatic</i>	255
Q561R0	<i>Mzb1</i>	<i>Marginal zone B- and B1-cell-specific protein</i>	233
B0K008	<i>Eif1</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1</i>	221

B5DFN1	<i>Eif1b</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1B</i>	221
F1LWP8	<i>LOC102551744</i>	<i>Protein LOC102551744</i>	221
Q5BK48	<i>Ttc5</i>	<i>Tetratricopeptide repeat protein 5</i>	220
P52847	<i>Sult1b1</i>	<i>Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1</i>	218
M0R3W8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	208
M0R903	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	208
D3ZQV0	<i>LOC100365995</i>	<i>Protein LOC100365995</i>	207
F1LSJ2	<i>Plin3</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	205
A0A096MJA0	<i>Tcp1</i>	<i>RCG44919, isoform CRA_b</i>	204
P28480	<i>Tcp1</i>	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	204
Q32Q55	<i>Ces2h</i>	<i>Protein Ces2h</i>	202
Q6MGA6	<i>Psmb9</i>	<i>Proteasome subunit beta type</i>	202
P07895	<i>Sod2</i>	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	201
M0RAE7	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	197
D3ZCV5	<i>Aldh1a7</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1</i>	197
P13601	<i>Aldh1a7</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1</i>	197
P51647	<i>Aldh1a1</i>	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	194
D3ZVH2	<i>RGD1560831</i>	<i>Protein RGD1560831</i>	193
P63004	<i>Pafah1b1</i>	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase 1B subunit alpha</i>	191
D3ZIF1	<i>Agr3</i>	<i>Protein Agr3</i>	190
F1LX46	<i>Fmr1nb</i>	<i>Protein Fmr1nb</i>	189
D4ABV5	<i>Calm2</i>	<i>Calmodulin</i>	188
A0A096MJW9	<i>Ddx17</i>	<i>Protein Ddx17</i>	187
I6L9G6	<i>Tardbp</i>	<i>Protein Tardbp</i>	186
M0R9K1	<i>LOC100359916</i>	<i>Protein Gm7964</i>	185
M0R5T1	<i>Non-identified</i>	<i>Pyruvate kinase</i>	183
O35531	<i>Cd86</i>	<i>Cd86 antigen, isoform CRA_c</i>	183
D3ZFR7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain 3, isoform CRA_b</i>	179
Q66HS7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	179

Q9JJ19	<i>Slc9a3r1</i>	<i>Na(+)/H(+)</i> exchange regulatory cofactor NHE-RF1	179
F1M0K0	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	178
F1LYK8	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	176
F1M068	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	176
M0R705	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	176
D4A1W5	<i>Rbm4</i>	<i>Protein LOC100909948</i>	176
P81155	<i>Vdac2</i>	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	172
F1LUV8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	168
D1MCF1	<i>Atp7a</i>	<i>Copper-transporting ATPase 1</i>	165
F1M6D1	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	163
G3V6R7	<i>Oxsm</i>	<i>3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial</i>	162
Q9JLJ3	<i>Aldh9a1</i>	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>	160
B1WBZ1	<i>Efs</i>	<i>Embryonal Fyn-associated substrate</i>	159
D3ZEN2	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	159
G3V6C4	<i>Ugdh</i>	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	158
F7EPE0	<i>Psap</i>	<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	157
P10960	<i>Psap</i>	<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	157
Q794E4	<i>Hnrnpf</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>	155
G3V9Z4	<i>Aspdh</i>	<i>Putative L-aspartate dehydrogenase</i>	154
Q5I0J9	<i>Aspdh</i>	<i>Putative L-aspartate dehydrogenase</i>	154
Q9Z214	<i>Homer1</i>	<i>Homer protein homolog 1</i>	153
Q5U2U8	<i>Bag3</i>	<i>Bcl2-associated athanogene 3</i>	152
D3ZM26	<i>Mecom</i>	<i>Ecotropic viral integration site 1 (Predicted), isoform CRA_a</i>	152
P45479	<i>Ppt1</i>	<i>Palmitoyl-protein thioesterase 1</i>	152
F1M5U6	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	151
B5DFC3	<i>Sec23a</i>	<i>Protein Sec23a</i>	150
M0RAG7	<i>Cadps2</i>	<i>Protein Cadps2</i>	150
B0BN17	<i>Cml5</i>	<i>Cml5 protein</i>	150
Q66HF1	<i>Ndufs1</i>	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	148

Q64633	<i>Ugt1a7c</i>	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-7</i>	148
B2RYU7	<i>Cbx5</i>	<i>Cbx5 protein</i>	148
A0A096MJM1	<i>Rhog</i>	<i>Protein Rhog</i>	147
A0A096MK75	<i>Rhog</i>	<i>Protein Rhog</i>	147
Q32PX6	<i>Rhog</i>	<i>Protein Rhog</i>	147
D4A9L9	<i>Erp27</i>	<i>Protein Erp27</i>	147
M0R4U4	<i>Non-identified</i>	<i>Triosephosphate isomerase</i>	147
M0R613	<i>Cd70</i>	<i>Protein Cd70</i>	146
P46413	<i>Gss</i>	<i>Glutathione synthetase</i>	144
Q5U300	<i>Uba1</i>	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	141
P26376	<i>ifitm3</i>	<i>Interferon-induced transmembrane protein 3</i>	140
M0RA08	<i>Plin3</i>	<i>Perilipin</i>	138
A0A096MJ07	<i>Krt9</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	138
F1M7K4	<i>Krt9</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	138
Q8CIS9	<i>Krt9</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	138
G3V6U7	<i>Msx1</i>	<i>Protein Msx1</i>	136
D3ZJ50	<i>Pkp3</i>	<i>Plakophilin 3 (Predicted), isoform CRA_a</i>	135
Q6AYD5	<i>Gspt1</i>	<i>G1 to S phase transition 1</i>	135
P07323	<i>Eno2</i>	<i>Gamma-enolase</i>	135
Q64550	<i>Ugt1a1</i>	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-1</i>	131
Q9Z252	<i>Lin7b</i>	<i>Protein lin-7 homolog B</i>	130
M0R509	<i>RGD1561998</i>	<i>Protein RGD1561998</i>	129
Q4KM31	<i>Limd2</i>	<i>LIM domain-containing protein 2</i>	129
D3ZKW5	<i>Pdik1l</i>	<i>PDLIM1 interacting kinase 1 like</i>	129
F1LRA0	<i>Pcdhga4</i>	<i>Protein LOC102557447</i>	128
D3ZVD7	<i>Kera</i>	<i>Keratocan</i>	125
G3V618	<i>Mapk13</i>	<i>Mitogen activated protein kinase 13</i>	125
Q9WTY9	<i>Mapk13</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 13</i>	125
F1LVA9	<i>Dock5</i>	<i>Protein Dock5</i>	124

F1MA88	<i>Dock5</i>	<i>Protein Dock5</i>	124
Q2YDU3	<i>Otud5</i>	<i>OTU domain-containing protein 5</i>	124
Q4FZT0	<i>Stoml2</i>	<i>Stomatin-like protein 2, mitochondrial</i>	123
P13676	<i>Apeh</i>	<i>Acylamino-acid-releasing enzyme</i>	123
D4A4P4	<i>Flad1</i>	<i>Protein Flad1</i>	121
Q9EPJ1	<i>Twist1</i>	<i>Protein Twist1</i>	119
G3V9U1	<i>Agap1</i>	<i>Centaurin, gamma 2</i>	117
D4A318	<i>Pld1</i>	<i>Phospholipase D1</i>	114
F1LMG4	<i>Pld1</i>	<i>Phospholipase D1</i>	114
P70496	<i>Pld1</i>	<i>Phospholipase D1</i>	114
Q9WU82	<i>Ctnnb1</i>	<i>Catenin beta-1</i>	114
F1LWT0	<i>Simc1</i>	<i>Protein Simc1</i>	108
D3ZRM9	<i>LOC100360491</i>	<i>60S ribosomal protein L13</i>	107
P41123	<i>Rpl13</i>	<i>60S ribosomal protein L13</i>	107
B2RYN2	<i>Fbxo31</i>	<i>F-box only protein 31</i>	95
P0C5E3	<i>Palld</i>	<i>Palladin</i>	93
G3V9G5	<i>Synm</i>	<i>Protein Synm</i>	87
M0R6B1	<i>Caprin2</i>	<i>Protein Caprin2</i>	61
F1LWH5	<i>Catsperg1</i>	<i>Protein Catsperg1</i>	50
F1LNK0	<i>Map2</i>	<i>Microtubule-associated protein</i>	44
F1MAQ5	<i>Map2</i>	<i>Microtubule-associated protein</i>	44

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor do *score*. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 38. Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo de 50 ppm F. Animais expostos cronicamente ao F através da água de beber por 30 dias.

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score
P13471	<i>Rps14</i>	40S ribosomal protein S14	1114
Q6PDV6	<i>Rps14</i>	Protein LOC100911847	1114
P48500	<i>Tpi1</i>	Triosephosphate isomerase	1041
D4A0T0	<i>Ndufb10</i>	Protein Ndufb10	925
M0RD75	<i>Rps6</i>	Uncharacterized protein	629
P62755	<i>Rps6</i>	40S ribosomal protein S6	629
Q07984	<i>Ssr4</i>	Translocon-associated protein subunit delta	535
Q3KRD8	<i>Eif6</i>	Eukaryotic translation initiation factor 6	509
M0RCH2	<i>Glud1</i>	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	498
A7VJC2	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
F1LM82	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
F1LNF1	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
M0R6J9	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	484
D3ZGN8	<i>LOC103690015</i>	Uncharacterized protein	428
D4A1G4	<i>Cyb5a</i>	Cytochrome b5	403
P00173	<i>Cyb5a</i>	Cytochrome b5	403
D4A2K1	<i>Hoga1</i>	Protein Hoga1	383
D3ZXI2	<i>Gm5611</i>	Protein Gm5611	354
M0R8U7	<i>Spata17</i>	Protein Spata17	349
P35704	<i>Prdx2</i>	Peroxiredoxin-2	337
F1LNA9	<i>Clps</i>	Colipase	312
P17084	<i>Clps</i>	Colipase	312
M0R8K1	<i>Rnf187</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RNF187	302
P14604	<i>Echs1</i>	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	268

P62909	<i>Rps3</i>	<i>40S ribosomal protein S3</i>	257
F1LWH8	<i>LOC100911795</i>	<i>Protein LOC100911795</i>	255
Q561R0	<i>Mzb1</i>	<i>Marginal zone B- and B1-cell-specific protein</i>	233
F1LSW7	<i>Rpl14</i>	<i>60S ribosomal protein L14</i>	223
Q63507	<i>Rpl14</i>	<i>60S ribosomal protein L14</i>	223
Q6TUH8	<i>LOC306079</i>	<i>LRRGT00066</i>	223
D4A0D6	<i>Bcl7b</i>	<i>Protein Bcl7b</i>	221
B0BN51	<i>Snrpb</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein</i>	215
P17136	<i>Snrpb</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B</i>	215
P63164	<i>Snrpn</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N</i>	215
Q5XIU9	<i>Pgrmc2</i>	<i>Membrane-associated progesterone receptor component 2</i>	201
M0RAE7	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	197
D3ZVH2	<i>RGD1560831</i>	<i>Protein RGD1560831</i>	193
M0RAB2	<i>Gm20721</i>	<i>Protein Gm20721</i>	192
O88637	<i>Pcyt2</i>	<i>Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase</i>	188
O89035	<i>Slc25a10</i>	<i>Mitochondrial dicarboxylate carrier</i>	187
M0R9C1	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	187
Q5BJY3	<i>Ino80c</i>	<i>INO80 complex subunit C</i>	183
D3ZYU0	<i>Non-identified</i>	<i>Enolase</i>	180
D3ZFR7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain 3, isoform CRA_b</i>	179
Q66HS7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	179
M0RDH6	<i>LOC100909427</i>	<i>Protein LOC100909427</i>	171
P18757	<i>Cth</i>	<i>Cystathionine gamma-lyase</i>	166
Q9EQS4	<i>Cth</i>	<i>Cystathionase (Cystathionine gamma-lyase)</i>	166
P13437	<i>Acaa2</i>	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	164
M0R6R9	<i>LOC102549011</i>	<i>Protein LOC102549011</i>	162
D4A3P1	<i>Ubqln4</i>	<i>Protein Ubqln4</i>	160
D3ZRL6	<i>Fcar</i>	<i>Protein Fcar</i>	154
P15429	<i>Eno3</i>	<i>Beta-enolase</i>	153

D3ZZP2	<i>Rab39a</i>	<i>Protein Rab39a</i>	152
D3ZBG8	<i>Papd5</i>	<i>PAP associated domain containing 5</i>	152
G3V9U2	<i>Acaa2</i>	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	152
A0A096MJZ0	<i>Dnal1</i>	<i>Protein Dnal1</i>	150
F1LMV0	<i>Dnalc1</i>	<i>Protein Dnal1</i>	150
Q9WTT6	<i>Gda</i>	<i>Guanine deaminase</i>	149
P46413	<i>Gss</i>	<i>Glutathione synthetase</i>	144
Q9Z0V5	<i>Prdx4</i>	<i>Peroxiredoxin-4</i>	142
M0R7F0	<i>Htra3</i>	<i>Serine protease HTRA3</i>	139
Q9EPH8	<i>Pabpc1</i>	<i>Polyadenylate-binding protein 1</i>	138
F7F379	<i>Armc1</i>	<i>Armadillo repeat containing 1</i>	138
P25086	<i>Il1rn</i>	<i>Interleukin-1 receptor antagonist protein</i>	137
A0A096MK39	<i>Hsf4</i>	<i>Protein Hsf4</i>	136
D4A5A8	<i>Hsf4</i>	<i>Heat shock transcription factor 4 (Predicted), isoform CRA_c</i>	136
P07323	<i>Eno2</i>	<i>Gamma-enolase</i>	135
Q5XIR8	<i>Clhc1</i>	<i>Clathrin heavy chain linker domain-containing protein 1</i>	134
D3ZR12	<i>Sntg2</i>	<i>Protein Sntg2</i>	133
O08701	<i>Arg2</i>	<i>Arginase-2, mitochondrial</i>	132
D3ZD13	<i>LOC100911261</i>	<i>Protein LOC100911261</i>	131
Q5U204	<i>Lamtor3</i>	<i>Ragulator complex protein LAMTOR3</i>	131
Q64550	<i>Ugt1a1</i>	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-1</i>	131
D3Z9G0	<i>Traf3</i>	<i>Protein Traf3</i>	129
F1LXE7	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	128
F7ELD4	<i>Ugt1a5</i>	<i>Protein LOC100912040</i>	128
Q6T5E7	<i>Ugt1a1</i>	<i>Protein LOC100912040</i>	128
Q6T5E9	<i>Ugt1a1</i>	<i>Protein LOC100912040</i>	128
Q6T5F1	<i>Ugt1a1</i>	<i>Protein LOC100912040</i>	128
Q6T5F2	<i>Ugt1a1</i>	<i>Protein LOC100912040</i>	128
D3ZWW3	<i>Rasal3</i>	<i>Protein Rasal3</i>	127

D3ZLV3	<i>Ybx2</i>	<i>Protein Ybx2</i>	127
D3ZKY9	<i>Spata22</i>	<i>Protein Spata22</i>	125
G3V8F4	<i>Scrn3</i>	<i>Protein Scrn3</i>	125
D3ZTQ3	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	125
F1M4R7	<i>Cspg5</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 5</i>	121
Q9ERQ6	<i>Cspg5</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 5</i>	121
Q3B7U2	<i>Taf1a</i>	<i>TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A</i>	120
Q9JKB7	<i>Gda</i>	<i>Guanine deaminase</i>	120
Q5MPP5	<i>Ly49i7</i>	<i>Immunoreceptor Ly49i7</i>	120
P05426	<i>Rpl7</i>	<i>60S ribosomal protein L7</i>	120
D3ZRF7	<i>Hsh2d</i>	<i>Protein Hsh2d</i>	119
A0A096MJV3	<i>Hsf4</i>	<i>Protein Hsf4</i>	119
D3ZCQ0	<i>Col19a1</i>	<i>Protein Col19a1</i>	119
F1LQX9	<i>Nploc4</i>	<i>Nuclear protein localization protein 4 homolog</i>	118
Q9ES54	<i>Nploc4</i>	<i>Nuclear protein localization protein 4 homolog</i>	118
Q4PJT6	<i>Spata24</i>	<i>Spermatogenesis-associated protein 24</i>	118
F1LRJ8	<i>Lmx1a</i>	<i>Protein Lmx1a</i>	117
D3ZZK1	<i>LOC100359563</i>	<i>Protein LOC100359563</i>	116
M0RAK8	<i>LOC100912386</i>	<i>Protein LOC100912386</i>	116
P60868	<i>Rps20</i>	<i>40S ribosomal protein S20</i>	116
D3ZTX5	<i>Efhh</i>	<i>EF hand domain family, member B (Predicted), isoform CRA_b</i>	115
M0RAW8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	115
B0K031	<i>Rpl7</i>	<i>60S ribosomal protein L7</i>	115
F1M087	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	115
P02454	<i>Col1a1</i>	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	114
Q5M9G8	<i>Dcaf11</i>	<i>DDB1- and CUL4-associated factor 11</i>	113
D3ZRD2	<i>Ccdc15</i>	<i>Protein Ccdc15</i>	112
P13803	<i>EtfA</i>	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</i>	112
F1LM66	<i>Eftud2</i>	<i>Protein Eftud2</i>	111

B2GV10	<i>Efhb</i>	<i>Efhb protein</i>	111
F1LPS4	<i>Cyp11b2</i>	<i>Cytochrome P450 11B2, mitochondrial</i>	110
P30099	<i>Cyp11b2</i>	<i>Cytochrome P450 11B2, mitochondrial</i>	110
P30100	<i>Cyp11b3</i>	<i>Cytochrome P450 11B3, mitochondrial</i>	110
D3ZGK3	<i>Tbata</i>	<i>Protein Tbata</i>	110
F1LZT3	<i>Tbata</i>	<i>Protein Tbata</i>	110
Q6Q0N1	<i>Cndp2</i>	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	110
D3ZFK6	<i>Atg16l1</i>	<i>Protein Atg16l1</i>	110
G3V7H6	<i>Arg2</i>	<i>Arginase</i>	109
D4AAD0	<i>Nxpe5</i>	<i>Protein Nxpe5</i>	108
F1M0C7	<i>Nxpe5</i>	<i>Protein Nxpe5</i>	108
Q5U2Y2	<i>Satb1</i>	<i>DNA-binding protein SATB</i>	107
Q4V7E3	<i>Zbed3</i>	<i>Protein Zbed3</i>	106
Q66X93	<i>Snd1</i>	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>	106
Q6AXT5	<i>Rab21</i>	<i>Ras-related protein Rab-21</i>	106
Q9JHZ4	<i>Gripap1</i>	<i>GRIP1-associated protein 1</i>	105
B5DF80	<i>Pabpc6</i>	<i>Poly(A) binding protein, cytoplasmic 3</i>	105
Q4V8G8	<i>Tekt3</i>	<i>Tektin-3</i>	104
D3ZN01	<i>RGD1307830</i>	<i>Protein RGD1307830</i>	103
D3ZV63	<i>RGD1307830</i>	<i>Protein RGD1307830</i>	103
F1LQS3	<i>Rpl6</i>	<i>60S ribosomal protein L6</i>	103
H7C5Y5	<i>Rpl6</i>	<i>60S ribosomal protein L6</i>	103
P21533	<i>Rpl6</i>	<i>60S ribosomal protein L6</i>	103
Q5U2S7	<i>Psmc3</i>	<i>Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3</i>	102
Q9R1J4	<i>Myoc</i>	<i>Myocilin</i>	100
D4A455	<i>Pcdhga10</i>	<i>Protein Pcdhga10</i>	99
D4A4D7	<i>E2f7</i>	<i>Transcription factor E2F7</i>	90
M0R5L4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	83
A0A096UWG9	<i>Dgke</i>	<i>Protein Dgke</i>	80

M0R7G2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	77
--------	-----------------------	--------------------------------	----

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor do *score*. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 39. Proteínas identificadas com expressão diferencial (suprarreguladas ou subrreguladas) no duodeno de ratos da exposição aguda ao F, do grupo que recebeu a gavagem gástrica na dose de 25 mg F/Kg peso corporal.

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score	Razão da expressão da proteína Grupo de 25 mg F/Kg : Grupo Controle
M0RCG4	<i>Myl6l</i>	<i>LOC100910474</i>	2985	7,32
M0RAE7	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	1385	7,31
P00689	<i>Amy2</i>	<i>Pancreatic alpha-amylase</i>	1014	4,48
P12346	<i>Tf</i>	<i>Serotransferrin</i>	134	4,31
P02770	<i>Alb</i>	<i>Serum albumin</i>	2126	4,18
P02091	<i>Hbb</i>	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	2643	3,56
D3ZFR7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain 3, isoform CRA_b</i>	158	1,95
P01946	<i>Hba1</i>	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>	2367	1,86
Q63862	<i>Myh11</i>	<i>Myosin-11</i>	2450	1,86
Q6AZ25	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha</i>	618	1,84
P19223	<i>Cpb1</i>	<i>Carboxypeptidase B</i>	287	1,82
Q9JLT0	<i>Myh10</i>	<i>Myosin-10</i>	390	1,80
P31232	<i>Tagln</i>	<i>Transgelin</i>	1907	1,73
P09495	<i>Tpm4</i>	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	381	1,70
D3ZAM3	<i>Cpb1</i>	<i>Carboxypeptidase B</i>	287	1,63
P20760	<i>Igg-2a</i>	<i>Ig gamma-2A chain C region</i>	218	1,57
P48675	<i>Des</i>	<i>Desmin</i>	4542	1,42
G3V9Y1	<i>Myh10</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b</i>	390	1,31
G3V844	<i>Amy2a3</i>	<i>Alpha-amylase</i>	1001	1,30
P58775	<i>Tpm2</i>	<i>Tropomyosin beta chain</i>	714	1,30
Q7TMC7	<i>Tf</i>	<i>Ab2-417</i>	130	1,30
O88752	<i>Hbe1</i>	<i>Epsilon 1 globin</i>	1617	1,28
Q0V8T3	<i>Cntnap5d</i>	<i>Contactin-associated protein like 5-4</i>	88	1,28
E9PSI7	<i>Amy2a3</i>	<i>Alpha-amylase</i>	1021	1,26
Q64122	<i>Myl9</i>	<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	15847	1,25
E9PTU4	<i>Myh11</i>	<i>Myosin-11</i>	3740	1,21
Q64119	<i>Myl6</i>	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	3522	1,20
C0JPT7	<i>Flna</i>	<i>Filamin alpha</i>	1174	1,19
F1LNH3	<i>Col6a2</i>	<i>Procollagen, type VI, alpha 2, isoform CRA_a</i>	287	1,19
P63269	<i>Actg2</i>	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	20289	1,19

B0BMS8	<i>Myl9</i>	<i>Myl9 protein</i>	15847	1,16
P11517	<i>Non-identified</i>	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	1822	1,16
P68035	<i>Actc1</i>	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	21264	1,16
D4A111	<i>Col6a3</i>	<i>Protein Col6a3</i>	187	1,15
F7FK40	<i>Tpm1</i>	<i>Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c</i>	1448	1,15
P62738	<i>Acta2</i>	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	20387	1,15
Q66HS7	<i>Pdlim3</i>	<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	158	1,15
P68136	<i>Acta1</i>	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	17450	1,14
Q6P725	<i>Des</i>	<i>Desmin</i>	4542	1,14
F1LTQ2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	7523	1,13
G3V8C3	<i>Vim</i>	<i>Vimentin</i>	737	1,13
D3ZRN3	<i>Actbl2</i>	<i>Protein Actbl2</i>	7858	1,12
Q08290	<i>Cnn1</i>	<i>Calponin-1</i>	273	1,08
D4A3W5	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	928	0,84
E9PTV9	<i>RGD1562758</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	928	0,84
F1LP05	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	4805	0,84
F1M3U4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	844	0,83
F1M9J9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	928	0,83
M0R4D7	<i>LOC100910820</i>	<i>Submitted name: Protein LOC100910820</i>	3414	0,83
P15999	<i>Atp5a1</i>	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	4835	0,83
D3Z8U8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	928	0,82
F1M4G6	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	928	0,82
M0R451	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	985	0,82
M0R4B8	<i>Non-identified</i>	<i>Pyruvate kinase</i>	820	0,82
M0RD14	<i>Non-identified</i>	<i>Pyruvate kinase</i>	816	0,82
P10719	<i>Atp5b</i>	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	3966	0,82
D3ZIY0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	1044	0,81
F1M2N4	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	985	0,81
G3V6D3	<i>Atp5b</i>	<i>ATP synthase subunit beta</i>	3966	0,81
M0RBH6	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	928	0,81
D3ZGY4	<i>Gapdh-ps2</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1949	0,80
P15429	<i>Eno3</i>	<i>Beta-enolase</i>	873	0,80
E9PTN6	<i>RGD1564688</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1949	0,79
M0R590	<i>LOC685186</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1949	0,79
M0R660	<i>RGD1565368</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1949	0,79
P04797	<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1949	0,79
P46462	<i>Vcp</i>	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	308	0,79
Q5BJY9	<i>Krt18</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 18</i>	565	0,79
B1WBQ8	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1020	0,78

O88989	<i>Mdh1</i>	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	1020	0,78
Q9ESV6	<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific</i>	1029	0,78
F1LU69	<i>Rps27l3</i>	<i>Protein Rps27l3</i>	590	0,77
D3ZWE0	<i>Hist2h2ab</i>	<i>Histone H2A</i>	984	0,76
F1LML2	<i>Ubc</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	590	0,76
P0CG51	<i>Ubb</i>	<i>Polyubiquitin-B</i>	590	0,76
Q63279	<i>Krt19</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 19</i>	2791	0,76
Q63429	<i>Ubc</i>	<i>Polyubiquitin-C</i>	590	0,76
Q6IFV1	<i>Krt14</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>	505	0,76
P16617	<i>Pgk1</i>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	852	0,75
Q63716	<i>Prdx1</i>	<i>Peroxiredoxin-1</i>	410	0,75
Q6IFU8	<i>Krt17</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	576	0,75
M0RBL5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	131	0,74
P62982	<i>Rps27a</i>	<i>Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i>	590	0,74
P62986	<i>Uba52</i>	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	590	0,74
A9UMV8	<i>H2afj</i>	<i>Histone H2A.J</i>	1228	0,73
G3V9Z2	<i>LOC100360645</i>	<i>Protein LOC100360645</i>	590	0,73
Q6IFU7	<i>Krt42</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 42</i>	576	0,73
F1M1E8	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	530	0,72
A0A0A0MXW3	<i>H2afz</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,72
D3ZVK7	<i>Hist1h2ak</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,72
M0RDM4	<i>LOC680322</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,72
P02262	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 1</i>	1228	0,72
P0C0S7	<i>H2afz</i>	<i>Histone H2A.Z</i>	1228	0,72
Q00728	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 4</i>	1228	0,72
D3ZXP3	<i>H2afx</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,71
D4AEC0	<i>H2afv</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,71
G3V9C0	<i>Hist1h2ac</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,71
M0RCL5	<i>LOC100910554</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,71
P0C169	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 1-C</i>	1228	0,71
P0CC09	<i>Hist2h2aa3</i>	<i>Histone H2A type 2-A</i>	1228	0,71
Q4FZT6	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 3</i>	1228	0,71
D4ACV3	<i>Hist2h2ac</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,70
P0C170	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 1-E</i>	1228	0,70
P11884	<i>Aldh2</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	306	0,70
Q10758	<i>Krt8</i>	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	4321	0,70
Q64598	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A type 1-F</i>	1228	0,70
Q6I8Q6	<i>Hist1h2af</i>	<i>Histone H2A</i>	1228	0,70

P04636	<i>Mdh2</i>	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	4955	0,67
Q6IFV4	<i>Krt13</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 13</i>	427	0,67
P04642	<i>Ldha</i>	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1591	0,66
Q00729	<i>Hist1h2ba</i>	<i>Histone H2B type 1-A</i>	574	0,63
D3ZQN4	<i>LOC100359421</i>	<i>Histone H3</i>	247	0,62
M0R537	<i>LOC686736</i>	<i>Histone H3</i>	247	0,62
Q6LED0	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H3.1</i>	247	0,62
D3ZJ08	<i>Hist2h3c2</i>	<i>Histone H3</i>	247	0,61
M0R5X6	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H3</i>	247	0,61
D3ZK97	<i>H3f3c</i>	<i>Histone H3</i>	247	0,60
D4A0P4	<i>Hist3h3</i>	<i>Histone H3</i>	100	0,59
P84245	<i>H3f3b</i>	<i>Histone H3.3</i>	247	0,59
P38552	<i>Lgals4</i>	<i>Galectin-4</i>	470	0,57
P06685	<i>Atp1a1</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	416	0,56
P38918	<i>Akr7a3</i>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3</i>	493	0,56
M0RBY5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	904	0,55
Q5BJT9	<i>Ckmt1b</i>	<i>Creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous</i>	343	0,55
D3Z7Y6	<i>Krt20</i>	<i>Submitted name: Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	1006	0,53
P41562	<i>Idh1</i>	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	226	0,52
B5DFA0	<i>Vil1</i>	<i>Protein Vill</i>	374	0,49
B5DFH4	<i>Papss2</i>	<i>Papss2 protein</i>	1213	0,49
P25030	<i>Krt20</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 20</i>	808	0,47
P25809	<i>Ckmt1</i>	<i>Creatine kinase U-type, mitochondrial</i>	214	0,47
Q66HT1	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	2415	0,39
P00884	<i>Aldob</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	2221	0,38

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor da razão entre a expressão da proteína no Grupo de 25 mg F/Kg : Grupo Controle. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 40. Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo controle da exposição aguda (gavagem gástrica com água deionizada).

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score
Q5M9I5	<i>Uqcrh</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial</i>	1722
Q3KRD8	<i>Eif6</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>	578
G3V6G1	<i>Igj</i>	<i>Immunoglobulin joining chain</i>	573
Q5XHZ0	<i>Trap1</i>	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	546
Q9Z144	<i>Lgals2</i>	<i>Galectin-2</i>	523
D3ZEV0	<i>LOC100912427</i>	<i>Protein LOC100912427</i>	440
F1LPL7	<i>LOC100912427</i>	<i>Protein LOC100912427</i>	440
P62961	<i>Ybx1</i>	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	440
Q3ZAV2	<i>Ybx1</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	440
Q4KLZ6	<i>Dak</i>	<i>Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)</i>	414
P06768	<i>Rbp2</i>	<i>Retinol-binding protein 2</i>	413
F1M0E9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	400
Q5M7T5	<i>Serpinc1</i>	<i>Protein Serpinc1</i>	390
A0A096MIW4	<i>Serpinc1</i>	<i>Protein Serpinc1</i>	366
P36972	<i>Aprt</i>	<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	339
F7F2H5	<i>Gsta2</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	317
M0RDI1	<i>LOC102550391</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	317
P00502	<i>Gsta1</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-1</i>	317
P04903	<i>Gsta2</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-2</i>	317
P04904	<i>Gsta3</i>	<i>Glutathione S-transferase alpha-3</i>	317
Q4FZZ3	<i>Gsta5</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	317
G3V8L1	<i>Pycard</i>	<i>PYD and CARD domain containing</i>	316
D3ZP59	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	302
D3ZXI2	<i>Gm5611</i>	<i>Protein Gm5611</i>	302
G3V9U2	<i>Acaa2</i>	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	283
P13437	<i>Acaa2</i>	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	283
P00406	<i>Mtco2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	278

Q8SEZ5	<i>Mt-co2</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	278
M0R6X5	<i>Non-identified</i>	<i>Histone H2A</i>	276
P07340	<i>Atp1b1</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1</i>	262
G3V6C4	<i>Ugdh</i>	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	262
Q9Z0V5	<i>Prdx4</i>	<i>Peroxiredoxin-4</i>	262
P06686	<i>Atp1a2</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2</i>	247
P06687	<i>Atp1a3</i>	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3</i>	247
P25409	<i>Gpt</i>	<i>Alanine aminotransferase 1</i>	240
Q9Z1N4	<i>Bpnt1</i>	<i>3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1</i>	236
P28073	<i>Psmb6</i>	<i>Proteasome subunit beta type-6</i>	236
M0R4B6	<i>Rpl12</i>	<i>RCG64424</i>	230
P06757	<i>Adh1</i>	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	214
F1LSR9	<i>Adh1</i>	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	214
Q71RJ2	<i>Cacng2</i>	<i>Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit</i>	213
G3V6L4	<i>Kif5c</i>	<i>Kinesin-like protein</i>	209
B2RYV8	<i>Mrpl52</i>	<i>Mitochondrial ribosomal protein L52</i>	208
O70199	<i>Ugdh</i>	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	203
A0A096MJL6	<i>Pgk1</i>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	202
Q7M0E3	<i>Dstn</i>	<i>Destrin</i>	200
Q498E3	<i>LOC290876</i>	<i>Protein LOC290876</i>	199
P09605	<i>Ckmt2</i>	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	198
Q499V1	<i>Upp1</i>	<i>Uridine phosphorylase</i>	197
G3V913	<i>Hspb1</i>	<i>Heat shock 27kDa protein 1</i>	196
P42930	<i>Hspb1</i>	<i>Heat shock protein beta-1</i>	196
P51635	<i>Akr1a1</i>	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	194
D4A4D5	<i>LOC498555</i>	<i>Protein LOC100362751</i>	194
P02401	<i>Rplp2</i>	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	194
P32551	<i>Uqcrc2</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial</i>	192
D3ZSM0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	190
D3ZJF8	<i>Fcgbp</i>	<i>Protein Fcgbp</i>	184

P13221	<i>Got1</i>	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	181
G3V7P6	<i>Nudt16</i>	<i>Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16</i>	181
M0RA08	<i>Plin3</i>	<i>Perilipin</i>	173
P61980	<i>Hnrnpk</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	171
Q5D059	<i>LOC100363335</i>	<i>Hnrpk protein</i>	171
D3ZD11	<i>Spes2</i>	<i>Protein Spes2</i>	169
D3ZTB7	<i>Non-identified</i>	<i>Protein Gm17190</i>	166
Q8VHF5	<i>Cs</i>	<i>Citrate synthase, mitochondrial</i>	165
M0R964	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	164
D4ADT4	<i>Tmem44</i>	<i>Protein Tmem44</i>	163
Q3KR86	<i>Immt</i>	<i>MICOS complex subunit Mic60</i>	163
Q4V8H5	<i>Dnpep</i>	<i>Aspartyl aminopeptidase</i>	161
M0R6J6	<i>Ckmt2</i>	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	161
P56536	<i>Kif5c</i>	<i>Kinesin heavy chain isoform 5C</i>	155
Q6MG75	<i>Nelfe</i>	<i>Protein Nelfe</i>	155
Q62667	<i>Mvp</i>	<i>Major vault protein</i>	154
A0A096MJX9	<i>Nelfe</i>	<i>Protein Nelfe</i>	152
Q4QQU6	<i>Smndc1</i>	<i>Survival of motor neuron-related-splicing factor 30</i>	150
I6L9G6	<i>Tardbp</i>	<i>Protein Tardbp</i>	149
P19234	<i>Ndufv2</i>	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial</i>	147
M0RCB8	<i>Hist1h3e</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	147
Q68FR6	<i>Eef1g</i>	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	146
P63144	<i>Kcnab1</i>	<i>Voltage-gated potassium channel subunit beta-1</i>	146
Q6AYI1	<i>Ddx5</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5</i>	145
Q8CHM8	<i>Rgs12h</i>	<i>Protein Rgs12h</i>	143
D3ZG94	<i>Slc25a43</i>	<i>Protein Slc25a43</i>	141
D3ZCJ0	<i>Pitpnm3</i>	<i>Protein Pitpnm3</i>	139
F1M6U3	<i>Pitpnm3</i>	<i>Protein Pitpnm3</i>	139
M0RDK4	<i>Pitpnm3</i>	<i>Protein Pitpnm3</i>	139
F1M9D0	<i>Map3k2</i>	<i>Protein Map3k2</i>	139

F1LQS6	<i>Xdh</i>	<i>RCG61833</i>	138
F1LUM5	<i>Tubal3</i>	<i>Protein Tubal3</i>	136
Q78ZR5	<i>Hopx</i>	<i>Homeodomain-only protein</i>	135
B0BMY7	<i>Twf2</i>	<i>Protein Twf2</i>	134
P55281	<i>Cdh17</i>	<i>Cadherin-17</i>	133
M0RC65	<i>Cfl2</i>	<i>Cofilin 2, muscle (Predicted), isoform CRA_b</i>	132
Q9EPI8	<i>Mterf1</i>	<i>Transcription termination factor 1, mitochondrial</i>	131
P31044	<i>Pebp1</i>	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	131
O35567	<i>Atic</i>	<i>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</i>	129
D3ZE29	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	128
Q99P63	<i>Micu2</i>	<i>Calcium uptake protein 2, mitochondrial</i>	128
Q9JJ19	<i>Slc9a3r1</i>	<i>Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1</i>	126
D3ZB81	<i>Slc25a31</i>	<i>Protein Slc25a31</i>	123
G3V9D8	<i>Ces2c</i>	<i>Protein Ces2c</i>	122
O70177	<i>LOC100365112</i>	<i>Carboxylesterase</i>	122
D3Z8K1	<i>Ccdc113</i>	<i>Protein Ccdc113</i>	119
M0RCF2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	119
P19629	<i>Ldhc</i>	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	119
Q6AYX2	<i>Ldhc</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	119
P97604	<i>Interleukin-15</i>	<i>Interleukin-15</i>	118
G3V6Z9	<i>Mterf</i>	<i>Mitochondrial transcription termination factor 1</i>	116
Q91ZW6	<i>Tmlhe</i>	<i>Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial</i>	114
Q2Q0I9	<i>Fndc1</i>	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 1</i>	114
Q32Q55	<i>Ces2h</i>	<i>Protein Ces2h</i>	113
P07756	<i>Cps1</i>	<i>Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial</i>	111
Q0D2L2	<i>Mrps22</i>	<i>Protein Mrps22</i>	110
Q7TNY1	<i>Tnfaip1</i>	<i>BTB/POZ domain-containing adapter for CUL3-mediated RhoA degradation protein 2</i>	109
A2VD11	<i>Ccdc94</i>	<i>Ccdc94 protein</i>	109
D3ZGE8	<i>RGD1563937</i>	<i>Protein Ccdc94</i>	109
E9PU75	<i>RGD1559848</i>	<i>Protein RGD1560857</i>	109

F6PUS4	<i>Sh3d21</i>	<i>Protein Sh3d21</i>	109
G3V8I8	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	108
M0RBL0	<i>Akp3</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	108
Q4V890	<i>Fem1a</i>	<i>Protein fem-1 homolog A</i>	108
F1LRP3	<i>Pias2</i>	<i>E3 SUMO-protein ligase PIAS2</i>	108
Q6AZ28	<i>Pias2</i>	<i>E3 SUMO-protein ligase PIAS2</i>	108
D3ZF34	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	107
D3ZME6	<i>Syncrip</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	107
E9PSS1	<i>Dclk2</i>	<i>Serine/threonine-protein kinase DCLK2</i>	107
Q5MPA9	<i>Dclk2</i>	<i>Serine/threonine-protein kinase DCLK2</i>	107
P22985	<i>Xdh</i>	<i>Xanthine dehydrogenase/oxidase</i>	107
M0R3R3	<i>Tmem44</i>	<i>Protein Tmem44</i>	107
M0RBK7	<i>Tmem44</i>	<i>Protein Tmem44</i>	107
B0BN65	<i>Fam49a</i>	<i>Family with sequence similarity 49, member A</i>	104
P63086	<i>Mapk1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	103
Q9JLJ3	<i>Aldh9a1</i>	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>	102
O09175	<i>Rnpep</i>	<i>Aminopeptidase B</i>	101
M0R9K1	<i>LOC10035991</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	101
M0R9W7	<i>LOC679149</i>	<i>Carboxylic ester hydrolase</i>	101
Q6AXV2	<i>Tekt4</i>	<i>Tektin-4</i>	101
F1LSJ2	<i>Plin3</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	100
F1M6P0	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	100
D3ZTM2	<i>Ino80d</i>	<i>Protein Ino80d</i>	98
G3V7Y3	<i>Atp5d</i>	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	97
P35434	<i>Atp5d</i>	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	97
B0BNH6	<i>Dgcr6</i>	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 6</i>	96
D3ZHB3	<i>LOC100360573</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	96
M0R9I8	<i>LOC100364427</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	96
P63324	<i>Rps12</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	96
Q6PDW1	<i>LOC100359593</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	96

Q60587	<i>Hadhb</i>	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial</i>	95
Q561S0	<i>Ndufa10</i>	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	94
P70579	<i>Grm8</i>	<i>Metabotropic glutamate receptor 8</i>	94
M0RBY2	<i>Grm8</i>	<i>Metabotropic glutamate receptor 8</i>	92
Q3T1K5	<i>Capza2</i>	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>	91
P09626	<i>Atp4a</i>	<i>Potassium-transporting ATPase alpha chain 1</i>	89
Q8CG45	<i>Akr7a2</i>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>	89
D4ADL5	<i>Adat1</i>	<i>Protein Adat1</i>	88
D4A1Z7	<i>Ttf1</i>	<i>Homeobox protein Nkx-2.1</i>	88
D3ZJ07	<i>Tbx15</i>	<i>Protein Tbx15</i>	88
D3ZXT0	<i>Olr496</i>	<i>Olfactory receptor</i>	87
F1LRK1	<i>Atp4a</i>	<i>Potassium-transporting ATPase alpha chain 1</i>	86
O35783	<i>Calu</i>	<i>Calumenin</i>	85
F1M4D1	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	71
P10687	<i>Plcb1</i>	<i>1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1</i>	41
F1LS82	<i>Ncor1</i>	<i>Nuclear receptor corepressor 1</i>	25
F1LSA0	<i>Ncor1</i>	<i>Nuclear receptor corepressor 1</i>	25

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor do *score*. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

ANEXO 41. Proteínas identificadas unicamente no duodeno dos animais do grupo da exposição aguda (gavagem gástrica de 25 mg F/Kg).

Nº de acesso da proteína	Gene	Nome da proteína	Score
Q8CJD3	<i>Zg16</i>	<i>Zymogen granule membrane protein 16</i>	395
Q62658	<i>Fkbp1a</i>	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A</i>	273
D3ZXB3	<i>Mesp2</i>	<i>Mesoderm posterior 2</i>	267
Q9JMJ4	<i>Prpf19</i>	<i>Pre-mRNA-processing factor 19</i>	260
M0R8Q9	<i>LOC100359993</i>	<i>Protein LOC100359993</i>	240
P14668	<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	232
D3ZKR3	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	217
D4A9C8	<i>LOC689821</i>	<i>40S ribosomal protein S12</i>	210
D3ZE00	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	206
F1LYU3	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	206
M0R3Y8	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	206
M0RBL2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	206
F1LTU2	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	201
G3V8A9	<i>Pnliprp1</i>	<i>Inactive pancreatic lipase-related protein 1</i>	200
P54316	<i>Pnliprp1</i>	<i>Inactive pancreatic lipase-related protein 1</i>	200
Q00438	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	187
F1LYA5	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	180
M0R413	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	180
Q8VHV7	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	176
Q5RKI0	<i>Wdr1</i>	<i>WD repeat-containing protein 1</i>	176
G3V8Y1	<i>Gba3</i>	<i>Glucosidase, beta, acid 3</i>	171
B5DEN5	<i>Eef1b2</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 beta2</i>	168
F1M0U2	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	168
P23965	<i>Eci1</i>	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial</i>	167
Q68G41	<i>Eci1</i>	<i>Dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)</i>	167
Q6IFV6	<i>Krt35</i>	<i>Protein Krt35</i>	164
D3ZYW2	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	159
G3V9Q3	<i>Hnrnph1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	159
D3ZAV9	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	158
P20788	<i>Uqcrrf1</i>	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	157

D3ZB30	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c</i>	146
F1LM18	<i>Ptbp1</i>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	146
D3ZCQ4	<i>Fam78b</i>	<i>Protein Fam78b</i>	143
P48037	<i>Anxa6</i>	<i>Annexin A6</i>	139
D3ZB61	<i>Rec114</i>	<i>Hypothetical LOC300751</i>	138
Q66HH8	<i>Anxa5</i>	<i>Annexin</i>	137
P00773	<i>Cela1</i>	<i>Chymotrypsin-like elastase family member 1</i>	135
Q63737	<i>Pdcl</i>	<i>Phosducin-like protein</i>	134
P85834	<i>Tufm</i>	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	133
Q5PPL3	<i>Nsdhl</i>	<i>Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating</i>	125
P02680	<i>Fgg</i>	<i>Fibrinogen gamma chain</i>	125
D3ZLP4	<i>Tuba1b</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	125
D4ABR6	<i>Anxa6</i>	<i>Annexin</i>	121
D3ZVB7	<i>Ogn</i>	<i>Osteoglycin</i>	120
M0R9D0	<i>Anp32a</i>	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	118
P49911	<i>Anp32a</i>	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	118
P55091	<i>Ctrc</i>	<i>Chymotrypsin-C</i>	115
G3V8Y2	<i>Lrig3</i>	<i>Lrig3 protein</i>	114
F1M4I5	<i>RGD1563293</i>	<i>Protein RGD1563293</i>	111
Q561R0	<i>Mzb1</i>	<i>Marginal zone B- and B1-cell-specific protein SV=1</i>	111
Q06000	<i>Lpl</i>	<i>Lipoprotein lipase</i>	111
F8WFH8	<i>Wars</i>	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	110
Q6P7B0	<i>Wars</i>	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	110
F1LV61	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	110
D3ZLC1	<i>Lmnb2</i>	<i>Protein Lmnb2</i>	109
M0RCR1	<i>Lmnb2</i>	<i>Protein Lmnb2</i>	109
Q6AXV8	<i>LOC497899</i>	<i>Protein LOC497899</i>	109
E9PTK9	<i>Ankhd1</i>	<i>Protein Ankhd1</i>	108
D4A0F5	<i>Sept7</i>	<i>Protein LOC100910754</i>	107
F1LMC7	<i>Sept7</i>	<i>Protein LOC100910754</i>	107
Q9WVC0	<i>Sept7</i>	<i>Septin-7</i>	107
Q6AYF2	<i>Lmcd1</i>	<i>LIM and cysteine-rich domains 1</i>	106
P05544	<i>Serpina3l</i>	<i>Serine protease inhibitor A3L</i>	105
D4A8G5	<i>Tgfbi</i>	<i>Protein Tgfbi</i>	104

P14046	<i>Ali3</i>	<i>Alpha-1-inhibitor 3</i>	102
Q80X08	<i>Fam21</i>	<i>WASH complex subunit FAM21</i>	102
F1LZF4	<i>Col6a5</i>	<i>Protein Col6a5</i>	102
D3ZEN2	<i>Non-identified</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	101
D3ZVL1	<i>Ctage5</i>	<i>Protein LOC100912115</i>	101
F1LPG9	<i>Fam21c</i>	<i>Protein Fam21c</i>	100
P07895	<i>Sod2</i>	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	100
D3ZHI1	<i>Ctage5</i>	<i>Protein LOC100912115</i>	98
Q9WTT6	<i>Gda</i>	<i>Guanine deaminase</i>	98
F1MAF7	<i>Krt31</i>	<i>Protein Krt33b</i>	97
F6SF42	<i>Krt31</i>	<i>Protein Krt33b</i>	97
Q6IFV5	<i>Krt36</i>	<i>Protein Krt36</i>	97
Q6IFW7	<i>Krt28</i>	<i>Protein Krt28</i>	97
Q6IFX1	<i>Krt24</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 24</i>	97
D4A0T0	<i>Ndufb10</i>	<i>Protein Ndufb10</i>	96
Q5XI07	<i>Lpp</i>	<i>Lipoma-preferred partner homolog</i>	95
P17764	<i>Acat1</i>	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	95
F1LMM9	<i>Gfm1</i>	<i>Elongation factor G, mitochondrial</i>	95
Q07803	<i>Gfm1</i>	<i>Elongation factor G, mitochondrial</i>	95
F1M0B5	<i>Cd84</i>	<i>Protein Cd84</i>	95
F1LMS4	<i>Cntnap5c</i>	<i>Contactin-associated protein-like 5-3</i>	94
Q4V8E7	<i>Tex21</i>	<i>Protein Tex21</i>	94
F1M943	<i>Armc8</i>	<i>Protein Armc8</i>	92
D3ZBZ9	<i>Ttc33</i>	<i>Protein Ttc33</i>	91
P15651	<i>Acads</i>	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	91
Q6IMX3	<i>Acads</i>	<i>Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain, isoform CRA_a</i>	91
D3ZTR5	<i>Zbed5</i>	<i>Protein Zbed5</i>	90
Q66X93	<i>Snd1</i>	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>	90
G3V9P8	<i>Parp6</i>	<i>Protein Parp6</i>	89
Q675A5	<i>Pla2g15</i>	<i>Group XV phospholipase A2</i>	88
Q9JKB7	<i>Gda</i>	<i>Guanine deaminase</i>	88
Q4QQW4	<i>Hdac1</i>	<i>Histone deacetylase 1</i>	88
M0R4L9	<i>BC068281</i>	<i>Protein BC068281</i>	88
Q6P502	<i>Cct3</i>	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	85

P18508	<i>Gabrg2</i>	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2</i>	83
A0A096MK30	<i>Msn</i>	<i>Moesin</i>	83
F1LP60	<i>Msn</i>	<i>Moesin</i>	83
O35763	<i>Msn</i>	<i>Moesin</i>	83
F1LXT0	<i>Exph5</i>	<i>Protein Exph5</i>	82
D3ZIZ0	<i>Dmrta1</i>	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1</i>	82
P12847	<i>Myh3</i>	<i>Myosin-3</i>	81
B5DF80	<i>Pabpc6</i>	<i>Poly(A) binding protein, cytoplasmic 3</i>	81
D4A6E3	<i>LOC100911833</i>	<i>Protein LOC100911833</i>	81
M0R5V7	<i>Mug2</i>	<i>Murinoglobulin-2</i>	81
Q03626	<i>Mug1</i>	<i>Murinoglobulin-1</i>	81
Q6IE52	<i>Mug2</i>	<i>Murinoglobulin-2</i>	81
Q6P7A7	<i>Rpn1</i>	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1</i>	81
G3V6E1	<i>Myh2</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	81
F1M884	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	80
Q29YR5	<i>Sult2b1</i>	<i>Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1</i>	80
D3ZMR2	<i>Uhrf1bp1</i>	<i>Protein Uhrf1bp1</i>	79
M0R447	<i>LOC100909795</i>	<i>Protein LOC100909795</i>	79
M0R8U3	<i>LOC100909795</i>	<i>Protein LOC100909795</i>	79
M0RB43	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	79
F1MA92	<i>Pld5</i>	<i>Protein Pld5</i>	77
Q99NA5	<i>Idh3a</i>	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial</i>	77
D3Z956	<i>Rlbp1</i>	<i>Protein Rlbp1</i>	76
D4A935	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	76
D3ZVU7	<i>Hdac1l</i>	<i>Protein Hdac1l</i>	76
F7ENH8	<i>Hdac2</i>	<i>Histone deacetylase</i>	76
D4A332	<i>Ankle1</i>	<i>Protein Ankle1</i>	76
M0R606	<i>Non-identified</i>	<i>Uncharacterized protein</i>	76
D4A823	<i>Rdm1</i>	<i>Protein Rdm1</i>	75
F7F8I1	<i>Sh3bp5l</i>	<i>Protein Sh3bp5l</i>	75
D3ZG43	<i>Ndufs3</i>	<i>NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c</i>	73
P09812	<i>Pygm</i>	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	72
F1M446	<i>AI314180</i>	<i>Protein AI314180</i>	72
P15146	<i>Map2</i>	<i>Microtubule-associated protein 2</i>	70

P28480	<i>Tcp1</i>	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	70
G3V8V3	<i>Pygm</i>	<i>Alpha-1,4 glucan phosphorylase</i>	70
D3ZM08	<i>Pcdhb14</i>	<i>Protein Pcdhb14</i>	69
P33124	<i>Acsf6</i>	<i>Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6</i>	68
M0R785	<i>Chchd2</i>	<i>Protein LOC100910788</i>	68
Q5XI78	<i>Ogdh</i>	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial</i>	68
D3Z9K0	<i>LOC100909712</i>	<i>Cyclin-L1</i>	68
Q9R1Q2	<i>Ccnl1</i>	<i>Cyclin-L1</i>	68
Q68FP1	<i>Gsn</i>	<i>Gelsolin</i>	66
P00489	<i>PYGM</i>	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	64
D4A4U1	<i>Ece2</i>	<i>Protein Ece2</i>	60
E9PU52	<i>Ece2</i>	<i>Protein Ece2</i>	60
D4A437	<i>Ccdc27</i>	<i>Protein Ccdc27</i>	60
F1LNK0	<i>Map2</i>	<i>Microtubule-associated protein</i>	58
F1MAQ5	<i>Map2</i>	<i>Microtubule-associated protein</i>	58
Q5BK10	<i>Capn13</i>	<i>Calpain-13</i>	57
Q6P734	<i>Serping1</i>	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	57
Q68FR0	<i>Ttc12</i>	<i>Protein Ttc12</i>	57
F1M8G9	<i>Ncam2</i>	<i>Protein Ncam2</i>	57
D4A8D5	<i>Flnb</i>	<i>Filamin, beta</i>	51

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem decrescente do valor do *score*. A identificação foi realizada de acordo com o código fornecido pela base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).