UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JANETE GUALIUME VAZ MADUREIRA LOBO

Efeito da administração crônica de diferentes doses de fluoreto na glicemia, insulinemia e sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos *Wistar* diabéticos e não diabéticos

BAURU
2013

JANETE GUALIUME VAZ MADUREIRA LOBO

Efeito da administração crônica de diferentes doses de fluoreto na glicemia, insulinemia e sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos *Wistar* diabéticos e não diabéticos

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

Orientador: Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2013

L786e Lobo, Janete GVM
 Efeito da administração crônica de diferentes doses de fluoreto na glicemia, insulinemia e sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos *Wistar* diabéticos e não diabéticos / Janete Gualiume Vaz Madureira Lobo. – Bauru, 2013. 97 p. : il. ; 31cm.

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

 Orientador: Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: a versão original desta dissertação 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: 13/2010
Data: 19/02/2013

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos grandes homens da minha vida, meu marido e meu filho, Fernando R. Vaz Madureira Lobo e Antônio Augusto Gualiume Vaz Madureira Lobo (Antônio Lobo, como você gosta de ser chamado).

Fernando, inicialmente meu amigo, meu melhor amigo, que se tornou meu grande parceiro, namorado, e rapidamente marido!!! Há 13 anos juntos, que ao mesmo passo que parece ter sido ontem que nossa história começou, também parece que sempre existiu. Não conheço palavras, embora eu goste muito delas, que possam expressar o que você representa em minha vida, mas o que eu sei é que você é quem me confere alegria, paz, motivação e amor.

Você é meus olhos quando eu não consigo enxergar.

Eu amo você!

Obrigada pelo apoio, paciência, por entender minha ausência quase constante, sem você em minha vida, certamente esse trabalho não existiria, eu não teria conseguido caminhar para o êxito, então, essa dissertação também é sua!

Antônio Lobo, meu menino, meu pequeno grande homem. Digo pequeno grande homem, pois embora ainda seja um garoto, você foi capaz, como um adulto, de aceitar respeitosamente a minha escolha profissional, ainda que para isso você tivesse que me disponibilizar o seu tempo comigo, para que eu pudesse investir nessa minha escolha, escolha essa que eu fiz também pensando em você, para que você pudesse ter uma mãe que lhe fosse um bom referencial para sua vida adulta e profissional; mas que não seria possível de ser realizada não fosse a sua cooperação, o seu entendimento, o seu carinho, e a sua parceria. Por isso eu sempre digo que você é o meu grande parceiro, meu grande amigo, meu pequeno grande homem. Você é a razão da minha vida!

Muito obrigada por tudo, e tenha sempre em mente, que a mamãe tem muito orgulho de tê-lo como filho, e espero que um dia você sinta o mesmo ao meu respeito. (Meu *lattes* está longe de ficar parecido com o da Profa. Marília, eu sei, e você tem toda razão em dizer isso, mas eu estou me dedicando, tá? Continue acompanhando no site do Cnpq).

Beijos, Janete. 05/05/2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que ao longo da minha vida toda, contribuíram com minha formação, não unicamente, mas especialmente à:

✓ **Minha família:** minha mãe, minha primeira professora, quem me ensinou a ler, foi onde tudo começou; meu pai, por me ensinar valores, por me mostrar o quão importante são o respeito, a educação, a dedicação, a serenidade, persistência e a fé; minha irmã, única, querida e insubstituível; por todos seus exemplos os quais eu sempre me espelhei (especialmente o de gostar de estudar e ensinar); por toda sua atenção, por todo seu carinho e também pelo empenho; obrigada ainda, por ter “bancado” meus “pequenos gastos” em alguns momentos; você ter garantido que eu pudesse continuar no meu colégio de qualidade, nas minhas aulas de inglês, espanhol, piano, academia, pintura, entre tantas outras coisas, fez toda diferença na minha vida. Eu serei sempre sua fã nº1, e eternamente grata a você;

✓ **Minha sogra**, Rose, por todo seu apoio e colaboração.

✓ **Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo (SPTC)**, que me fez enxergar efetivamente o mundo acadêmico, através da sua busca, pela verdade dos fatos embasada em evidências científicas, verdade essa, que tem por objetivo essencial servir à sociedade; como nosso próprio *slogan* diz “a Ciência à serviço da Justiça”. A Ciência por sua vez só existe se houver pesquisa científica, formação e desenvolvimento de pessoas; agradeço ainda por, através de um de seus Institutos, o Instituto Médico Legal, representado pela minha unidade de trabalho (NPML Bauru), através do Dr. Alberto Briani, o então meu superior imediato, ter criado condições reais para que eu pudesse de alguma maneira me dedicar ao universo acadêmico. Dr. Briani, eu me recordo como se fosse hoje, do dia que você deferiu e assinou, com um imenso sorriso, meu pedido de alteração de escala e de atribuições. Muito obrigada pelo seu apoio, por sua colaboração e incentivo, sem os quais eu nem teria conseguido me matricular no mestrado. Aproveito ainda, para agradecer a todos meus colegas de trabalho: Legistas, Auxiliares, Atendentes, e demais colaboradores, pela imensa cooperação ao longo dessa minha etapa,

especialmente à Ms. Juliana Gonçalves Pelegrina e à Luana de Fátima pela grande parceria, pela equipe que somos (Ju, “sua doida”, você mudou a data do seu casamento pelo meu mestrado). Evidentemente que eu também não poderia, jamais, deixar de agradecer à Dirce Valentim e Yone Manduca, que me receberam, literalmente, de braços abertos nessa unidade da SPTC (NPML Bauru), no ano de 2002, logo após ter sido aprovada no concurso e ter concluído o curso de formação técnica (ACADEPOL, AxNP1-2002), quando eu então comecei a trabalhar, e a caminhar (ainda que um pouco sem saber o melhor caminho) no sentido de buscar a produção de conhecimento científico, e formação de pessoas; vocês duas foram constante fonte de incentivo para que eu concluísse minha Graduação em Ciências Biológicas, mesmo entre os tantos percalços que me deparei nesse período. Eu sinceramente espero algum dia, de alguma maneira, poder retribuir a SPTC, e/ou ao seu público alvo (a sociedade), por todo apoio que sempre tive para estudar, fosse ele pelos cursos institucionais, ou pelo que eu pude buscar nas Universidades, fora da SPTC, mas motivada pela SPTC, da qual eu tenho orgulho de fazer parte, e poder ver o quanto a instituição cresceu em todos os seus sentidos; afinal, quando eu ingressei, a SPTC ainda era uma “criança” de apenas 4 anos;

✓ **Professores e amigos da primeira Graduação (Ciências Biológicas UNESP-Bauru, 2004-2008).** Aos meus Professores, por terem me encaminhado e me instruído adequadamente ao longo da Graduação. Muito em especial ao Prof. Dr. Hugo Garrido Medeiros de Paula (*in memorian*), pelas fantásticas aulas de Fisiologia Comparada, que me constituíram uma base intelectual relevante para o desenvolvimento de trabalhos acadêmicos em áreas correlatas e, inclusive esse trabalho. Prof. Hugo foi o professor universitário que, ainda que de uma maneira tão triste e lamentável, me fez notar o quanto um Docente pode influenciar na formação, e também na vida de seus alunos, e o quanto uma atitude sua pode ecoar na mente dos mesmos, durante anos, talvez por uma vida toda. Já se passaram praticamente 5 anos que você escolheu partir, e deixar seus alunos “órfãos”, e eu, ainda hoje, não me esqueci nem da sua atitude, nem tão pouco da última forma que o vi; apesar de tudo que aprendi academicamente com você, o que ecoa até hoje é aquela imagem, resultado da sua escolha, de sua atitude..... Espero que agora você esteja em paz. Esse triste registro é uma tentativa de apagar isso de minha mente, fazendo do “eco” um mero registro formal, e desta forma ficando apenas com o aprendizado

acadêmico o qual você muito bem me proporcionou (sobre a Fisiologia, como estudar, como buscar artigos, como apresentar uma boa aula, observar a perfeição e os detalhes da vida).

Aos amigos dessa turma querida pela constante parceria, desde 2004. Muito em especial ao Alexandre Garcia Simões; Bruno Viscelli; Heloísa Aparecida Barbosa Pereira; Vanessa Gusmon; Vagner Gulmini; Anuska M. Alvares;

✓ **“Minha Família Bioquímica”:** Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães, Prof. Dr. Rodrigo Cardoso, pelos ensinamentos, exemplos, incentivo e apoio. As funcionárias do laboratório pelo empenho, muito em especial Aline de Lima Leite e Larissa Grizzo, vocês foram, cada uma ao seu modo, absurdamente importantes para o meu “deslanchar técnico”, muito obrigada mesmo, de todo meu coração! À Dra. Camila Peres, por todos os seus conselhos, toda sua atenção; aproveito para expressar todo meu o respeito e admiração por você através dessas poucas palavras. Às doutorandas Mileni Fernandes e Heloísa Aparecida Barbosa Pereira por todas as dicas, apoio, protocolos; só eu sei dizer o quanto vocês foram importantes nesses 2 anos. À todos do laboratório, que direta ou indiretamente colaboraram com a execução desse trabalho muito em especial à Mestranda Isabella Sabino, que de prontidão me auxiliou nos experimentos realizados no mês de junho de 2012, e ao aluno de iniciação científica Lucas Ferreira, que em diversos momentos ao longo do meu mestrado “arregaçou” as mangas e me ajudou, mesmo não sendo aluno diretamente vinculado a esse trabalho, assim como a aluna de iniciação científica Aline Dionízio, que em uma das diversas etapas da experimentação com animais também colaborou no monitoramento deles. Às mestrandas Melina Bellini, Taísa Delecrode e Priscila Munro pela colaboração nos primeiros “pilotos” de indução do diabetes do ano de 2011. À mestranda Priscila Salomão, que nem sem importou em colocar caixas do biotério no seu carro novo, pois estava chovendo, eu estava a pé, e não havia outra forma de levar todo o material para o laboratório, senão no carro. À Priscila Munro, nem sei o que escrever, temos tantas histórias sobre biotério, tanto da minha quanto da sua pesquisa, que daria para escrever um livro!!!! Eu nunca irei me esquecer do Natal que passamos no biotério, você se lembra? À Senda Charone, Fernanda Zucki Mattias, Aline Castilho, Lívia Comar, Alessandra Cury, Flávia Levy, Flávia Iano, Melissa Thiemi, Chintia, Bruno L. Zarella, Sr. Ovídio, Adriana Arruda,

Carina Melo, Cristiane Baldini, Flávia Amadeu, Flavia Zaidan, Juliana Castro, Luiza Cassiano, Thelma Silva, pelo harmonioso convívio que vocês me proporcionaram enquanto estive executando todas essas etapas do Mestrado aqui no Laboratório de Bioquímica – FOB/USP. Espero não ter cometido nenhuma injustiça no sentido de ter me esquecido de citar alguém do laboratório, mas se esqueci, perdoe-me desde já;

✓ **Profa. Dra. Dóris H. Sumida**, FOA/UNESP, quem me ensinou, PESSOALMENTE, os “experimentos de fosforilação” e o ITT; que diversas vezes, gentilmente, recebeu-me em seu laboratório de Endocrinologia; que veio até aqui, na FOB/USP, tendo que se deslocar cerca de 400Km por dia, só para me auxiliar em experimentos, pois eu não tinha segurança em executá-los sozinha. Sua participação foi fundamental para a consolidação desta minha etapa acadêmica. Muito obrigada!!! Muito obrigada ainda aos seus alunos Rafael Dias Astholphi, Fernando Chiba e Aline Yamamoto (FOA-UNESP), pela atenção e pela amizade que ficou;

✓ **Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e à Devani Mariano Pinheiro** (Laboratório de Endocrinologia Animal, FMVA-UNESP) que auxiliaram com a dosagem de insulina;

✓ **Profa Dra. Sandra Lia do Amaral e Lidiane Souza** (LEFEX - UNESP-Bauru) Lidi, você que nem me conhecia, mas se prontificou, em pleno final de semana (com direito à chuva e queda de energia) a me ajudar, pois meu prazo para entregar o relatório estava se esgotando!!! Sem contar que ainda teve de ouvir umas “300” músicas da minha banda favorita, pois fosse talvez, a única forma de eu ficar mais calma naquele momento. Muito obrigada!

✓ **Departamento de Radiologia FOB/USP**, por ceder instalações para revelar os RXs;

✓ **Docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP**, por todas as disciplinas que cursei e por todos seus ensinamentos;

- ✓ **Funcionários do Biotério** (FOB/USP): Luis, Erasmo, Elias, Richarde, que sempre foram muito prestativos enquanto estive na etapa de experimentação com os animais, que foi longa e trabalhosa;
- ✓ **Secretárias** Vera Lucia Rufino Rosa (BAB, FOB/USP), Dalva Ribeiro de Oliveira (BAB, FOB/USP), Maristela Petenuci Ferrari (Comissões, FOB/USP) pelo excelente serviço prestado, sempre que precisei de vocês, vocês sempre estiveram prontas para me atender, tirar minhas dúvidas e me ajudar;
- ✓ **FAPESP**, pelo auxílio financeiro, sem o qual teria sido impossível a execução desse trabalho (Processo nº10/17736-1).

CONGRATULAÇÃO

À Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf,

Quando iniciei meu Mestrado, eu pensava no dia em que eu fosse escrever a página de agradecimento à orientadora, pois isso significaria a feliz conclusão de uma etapa até então somente sonhada; motivada inicialmente por isso, eu observei, senti, percebi e aprendi tudo o que pude ao longo desses 2 anos;

Nas primeiras dificuldades encontradas ao longo dessa importante etapa da minha Carreira, quando eu pensava nisso, eu pensava em citar as muitas vezes que observei e senti que realmente eu tinha uma grande orientadora me acompanhando, me ensinando, me guiando;

Ao longo do curso, dos experimentos, dos fatos, dos acontecimentos, eu comecei a perceber que eu não tinha apenas uma grande orientadora, percebi que eu estava sendo acompanhada intelectual ética e emocionalmente por uma pessoa simplesmente brilhante, que foi tudo o que precisou ser, na medida correta, ao tempo correto e, a tal página de agradecimentos que eu pensava em escrever, nos pré-textuais da minha dissertação, tornou-se algo que eu preferi lhe dizer toda vez que sentia vontade, já que foram muitos os momentos que eu julguei necessário lhe agradecer, e assim fiz, muitas vezes, pessoalmente, por telefone, por sms, ou mesmo entre os mais de 800 e-mails trocados nesses anos, e eu percebi há pouco tempo, que a tradicional “rasgação de seda” das dissertações, simplesmente não caberia aqui, afinal você soube, como e quando incorporar, ao longo do mestrado, um pouco de todas as pessoas importantes que tive na vida;

Percebi ainda, que tudo o que você proporcionou à minha formação do ponto de vista técnico, científico, acadêmico e pessoal foi embasado em uma filosofia sua, tão sua que essa admiração que eu tenho por você e pelo seu trabalho é minha e de toda a sua Equipe e rede de colaboradores; pois você sabe melhor que qualquer outra pessoa que eu já tenha conhecido na minha vida ser inteligente emocionalmente, e inteligentemente emocional; que você é extremamente eficiente e eficaz em estimular o crescimento profissional e pessoal; em encorajar o aprendizado contínuo de seus alunos e colaboradores (o que não é nada simples, nem fácil); em criar ambiente estimulante, desafiador e dependente

de criatividade; em inspirar imenso entusiasmo em sua Equipe; em saber lidar com os seus sentimentos e principalmente com o nosso (meu e de seus muitos alunos); em ser altamente capacitada do ponto de vista intelectual; em ser flexível; em ser adorável; em ser orientadora-irmã; em ser orientadora-mãe; em ser tudo o que você nos representa. Por todos esses motivos eu não escrevi para você uma página de agradecimentos, e sim de congratulação, pois hoje, eu tenho certeza que se existe alguém que se realiza quando alguém da Equipe se sente vencedor, essa pessoa é você, pois isso significa que você cumpriu com Excelência o seu papel, seu objetivo, sua meta profissional e pessoal. Parabéns por ser o sucesso de profissional que você é. Parabéns por nos fazer querer ser como você!!!! Meu maior orgulho profissional é poder dizer que sou sua aluna, que você é minha orientadora! Sabe por quê? Porque tenho a oportunidade de aprender na prática como é formar pessoas, formar profissionais e gerar conhecimento, com a profissional que, hoje, eu mais admiro nesse mundo! Seja perto ou longe, eu sempre levarei comigo e disseminarei tudo o que aprendi com você! Como eu sempre digo: você mora no meu coração, Profa!

Beijo grande,

Janete

04/05/2013

*“Ensinar é um exercício de imortalidade.
De alguma forma, continuamos a viver
naqueles cujos olhos aprenderam a ver o
mundo pela magia de nossas palavras.”*

Rubem Alves

RESUMO

O fluoreto (F) é amplamente empregado na Odontologia para o controle da cárie dentária. Entretanto apesar de suas propriedades terapêuticas, também pode oferecer riscos ao organismo se aplicado ou consumido de maneira indiscriminada ou inadequada. São encontrados estudos em humanos associando o consumo excessivo de F com intolerância à glicose. Estudos com animais submetidos a doses agudas ou crônicas altas de F revelam alterações na cascata de sinalização insulínica. Entretanto, seu efeito quando administrado em doses crônicas associadas àquelas equivalentes em humanos que recebam níveis ótimos de F através da água artificialmente fluoretada ou níveis aumentados através da água naturalmente fluoretada, ou ainda quando administrado a animais com diabetes já instalada, nunca foi testado. O presente trabalho teve por objetivo avaliar, em ratos normais ou com diabetes já instalada, expostos cronicamente a doses de F na água de beber que simulam a ingestão de F pela água natural e artificialmente fluoretada, parâmetros relacionados à interferência do F na resistência à insulina. Para tanto, foram utilizados inicialmente 214 ratos *Wistar*, com 60 dias de idade. Dentre estes, foi induzido diabetes em 133 animais por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (50 mg/Kg peso corporal), sendo que 111 animais tiveram diabetes confirmado e foram aleatoriamente alocados a 3 grupos, diferindo em relação à concentração de F na água de beber (0, 10 ou 50 ppm), com a qual foram tratados por 22 dias. Oitenta e um animais não diabéticos foram também aleatoriamente alocados a estes 3 grupos. Decorrido o período experimental, os animais foram eutanasiados e foram avaliados: fluoremia, glicemia, insulinemia, concentração de F no fígado, a velocidade de desaparecimento da glicose sanguínea após estímulo insulínico (K_{ITT}), a resistência à insulina (HOMA2-IR), sensibilidade à insulina (%S) e função das células β pancreáticas (%B) e grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina – pp185 (IRS-1/IRS-2) após estímulo insulínico, em tecidos muscular e hepático (*Western blotting*). As análises laboratoriais revelaram que: 1) houve dose-resposta para as concentrações de F no plasma e no fígado, sendo as concentrações maiores nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos; 2) a glicemia não foi alterada mediante exposição ao F, tanto para animais não diabéticos quanto para animais diabéticos, embora estes tenham apresentado glicemias significativamente mais altas que aqueles; 3) os animais diabéticos

apresentaram uma insulinemia significativamente menor quando comparados aos não diabéticos e o tratamento com F não afetou a insulinemia nos animais não diabéticos, mas a reduziu nos diabéticos, sem efeito dose-resposta; 4) a K_{ITT} foi significativamente menor nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos (controle e tratados com 10 ppm F); 5) independentemente do tratamento com F, a %B nos animais diabéticos foi significativamente menor que aquela observada para os não diabéticos; 6) o índice HOMA2-IR e a %S não apresentaram diferenças significativas nem para os tratamentos com F nem para os animais diabéticos e não diabéticos, sendo que para aqueles foi observada uma tendência de aumento nos grupos tratados com F, especialmente para o grupo de 10 ppm F; 7) não houve alteração significativa no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em função do tratamento com F.

Palavras-chave: Flúor. Diabetes. Resistência periférica.

ABSTRACT

Effect of chronic administration of different doses of fluoride on glucose, insulin and insulin signal in muscle and liver of diabetic and nondiabetic *Wistar* rats

Fluoride (F) is broadly used in Dentistry for caries control. However, despite its therapeutic properties, when used in excess, toxic signs and symptoms may occur. Studies conducted with humans have reported association between excessive F intake and glucose intolerance. Studies conducted with animals submitted to acute or high chronic doses of F have revealed alterations in the insulin signaling pathway. However, its effect when administered in chronic doses that simulate those present in the artificially or naturally fluoridated water ingested by humans, or when ingested by diabetic animals, was not evaluated before. The present study aimed to evaluate in normoglycemic or diabetic rats chronically exposed to water containing F levels that simulate those present in the artificially or naturally fluoridated water, parameters related to the interference of F in the insulin resistance. For this purpose, 214 60-day-old *Wistar* rats were initially employed. Among these, diabetes was induced in 133 animals through intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/Kg body weight). From these, 111 diabetic animals were randomly allocated to 3 groups that differed according to the F concentration on the water (0, 10 or 50 ppm) that was drunk for 22 days. Eighty-one non-diabetic animals were allocated to the same groups. After the experimental period, animals were euthanized and the following parameters were evaluated: fluoremia, glucemia, insulinemia, F concentration in the liver, velocity of disappearance of blood glucose (K_{ITT}), insulin resistance (HOMA2-IR), insulin sensitivity (%S), function of β pancreatic cells (%B), degree of insulin receptor substrate tyrosine phosphorylation state (pp 185, IRS-1/IRS-2) - after insulin stimulus in liver and muscle (Western blotting). Laboratory analyses revealed: 1) dose-response for plasma and liver F concentrations that were higher in the diabetic animals compared to those non-diabetic; 2) glucemia was not altered upon exposure to F, both for non-diabetic and diabetic animals, despite the latter presented higher values compared to the first; 3) diabetic animals had significantly lower insulinemia when compared to non-diabetic animals; treatment with F did not affect insulinemia in non-diabetic animals, but reduced this parameter in diabetic animals, without dose-response; 4) K_{ITT} was significantly lower in diabetic animals compared

to non-diabetic animals (control and treated with water containing 10 ppm F); 5) Regardless treatment with F, %B in diabetic animals was significantly lower than the same parameter in non-diabetic animals; 6) HOMA2-IR and %S did not present significant differences in function of treatment with F or condition (diabetes or not); for the diabetic animals these parameters were slightly increased in the groups treated with F (specially 10 ppm F); 7) the status of phosphorylation of pp185 did not change upon treatment with F.

Key words: Fluoride. Diabetes. Periferic resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - **As vias de sinalização insulínica.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares com as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário 34
- Figura 2 - Caixa de manutenção dos animais, evidenciando o piso aramado ao fundo. Nesta imagem, os animais foram colocados na caixa, com grade, porém sem a maravalha, a fim de se demonstrar o grande débito urinário dos mesmos 43
- Figura 3 – Fluxograma do experimento, destacando a alocação dos animais para os diferentes grupos, bem como para as análises realizadas 46
- Figura 4 - Animal diabético, com 22 dias de tratamento com água *ad libitum* contendo 50 ppm F e ração sólida com baixa quantidade de F. 47
- Figura 5 - Medição da glicemia através de uma microsecção da cauda dos animais para o ITT 49
- Figura 6 - Colocação de 3 gotas de NaOH 0,05 M na tampa das placas de Petri. 52
- Figura 7 - União das gotas de NaOH contendo o fluoreto, após difusão facilitada por HMDS 52
- Figura 8 - Análise de fluoreto com o eletrodo 9409, acoplado ao eletrodo de referência calomelano 52

Figura 9 -	Homogeinização do fígado para análise de fluoreto	54
Figura 10	Homogenização de tecidos para <i>Western Blotting</i>	55
Figura 11	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford previamente ao <i>western blotting</i>	56
Figura 12	Montagem do gel para corrida eletroforética (<i>Western Blotting</i>). 1) Suporte para montagem do gel; 2) Aparador das placas de vidro (espaçador e placa); 3) Espaçador de 1,5 mm e placa de vidro; 4) colocação das placas de vidros no aparador; 5) aparador com as placas após terem sido travadas com os dispositivos laterais de trava do aparador; 6) aparador contendo as placas para montagem do gel, posicionado no suporte de montagem; 7 e 8) aplicação do gel no interior das placas de vidro; 9) aplicação do gel de <i>stacking</i> para posterior inserção dos pentes para delimitação dos poços onde foram aplicadas as amostras	57
Figura 13	Equipamento para mini gel (Tetra) Biorad	59
Figura 14	Coloração por Ponceau. A imagem demonstra uma região da membrana de nitrocelulose após transferência, na região onde usualmente se encontra a proteína constitutiva β -actina	60
Figura 15	Equipamento utilizado para incubação dos anticorpos (SNAP)	60
Figura 16	Animais antes (A) e depois (B) do diabetes induzido por estreptozotocina	67
Figura 17	Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) no fígado de animais não diabéticos e diabéticos, tratados com 0, 10 ou 50 ppm de fluoreto administrado na água de beber por 22 dias. Em A, autorradiografia típica; quantidades iguais de proteínas (185 μ g) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em B e C, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EP de 4	76

experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (teste t pareado) Insulina (-) VS. Insulina (+).

- Figura 18 Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em 77
tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio) de animais não diabéticos e diabéticos, tratados com 0, 10 ou 50 ppm de fluoreto administrado na água de beber por 22 dias. Em A, autorradiografia típica; quantidades iguais de proteínas (185 µg) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em B e C, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EP de 4 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (teste t pareado) Insulina (-) VS. Insulina (+).
- Figura 19 Efeito do tratamento com fluoreto (0, 10 ou 50 ppm) na água de 78
beber (22 dias) sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) após estímulo insulínico (+) no tecido hepático de animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Os valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p > 0,05$).
- Figura 20 Efeito do tratamento com fluoreto (0, 10 ou 50 ppm) na água de 78
beber (22 dias) sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) após estímulo insulínico (+) no tecido muscular (gastrocnêmio) de animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Os valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p > 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais diabéticos no início do tratamento	45
Tabela 2 - Massa média no início do tratamento (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	66
Tabela 3 - Massa média ao fim do tratamento (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	66
Tabela 4 - Ganho médio de massa (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	66
Tabela 5 - Glicemia média (mmol/L, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	69
Tabela 6 - Insulinemia média (pmol/L, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	69
Tabela 7 - Concentração plasmática média de fluoreto (μ g/mL, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	71
Tabela 8 - Concentração média de fluoreto em fígado (μ g/g, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	71
Tabela 9 - Velocidade média ($\pm$ DP) de desaparecimento da glicose (K_{itt} , % por minuto) sanguínea em função da administração de insulina (0,75 U/Kg peso corporal) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	74
Tabela 10 - Índice HOMA2-IR médio ($\pm$ DP) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias	74
Tabela 11 - Porcentagem média ($\pm$ DP) de função das células β pancreáticas (%B) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água	75

contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Tabela 12 Porcentagem média ($\pm$ DP) de função de sensibilidade à insulina 75
(%S) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água
contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APKCs	Atypical protein kinase C
BSA	Albumina soro bovino
β	Beta
% β	Função das células beta pancreáticas
CEEPA	Comissão de Ética e Pesquisa e Ensino com Animais
°C	Grau Celsius
D	Diabético
Da	Dalton
DP	Desvio padrão
DM1	Diabetes Melito 1
DM2	Diabetes Melito 2
F	Fluoreto
g	Grama
G	Glicemia
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
HF	Ácido fluorídrico
HMSD	Hexametildisiloxano
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance
i.p.	Intraperitoneal
IR	Resistência à insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina (1)
IRS2	Substrato do receptor de insulina (2)
ITT	Teste endovenoso de tolerância a insulina curto
Kg	Quilograma
Kitt	Velocidade de desaparecimento da glicose
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
MFP	Monofluorofostato
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não diabético

NaF	Fluoreto de sódio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
RIA	Radioimunoensaio
SB	Solução basal
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate – Polyacrylamide
STZ	Streptozotocin (Estreptozotocina)
RNA _m	Ácido ribunocléico mensageiro
RPM	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE DE LITERATURA	27
2	PROPOSIÇÃO	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	44
3.2	TRATAMENTO DOS ANIMAIS	45
3.3	EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	47
3.4	ITT	48
3.5	DOSAGEM DA GLICEMIA	49
3.6	ANÁLISE DE FLUORETO NO PLASMA	50
3.7	INSULINEMIA E CÁLCULO DO ÍNDICE HOMA-IR	53
3.8	ANÁLISE DO FLUORETO EM FÍGADO	54
3.9	AVALIAÇÃO DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO EM TIROSINA DA pp185	54
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	95

1 Introdução e Síntese de Literatura

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE DE LITERATURA

Sabe-se que os fluoretos são naturalmente encontrados na água e no solo, sendo importantes nos fenômenos de mineralização óssea e dentária, com grande importância para a saúde bucal (RAMIRES, BUZALAF, 2008).

Estudos feitos na década de 30 e 40, liderados pelo dentista e epidemiologista H. Trendley Dean demonstraram que o fluoreto (F) tem relação com ocorrência dos “dentes mosqueados”, alterações posteriormente descritas como fluorose dentária. Posteriormente, verificou-se tratar de elemento eficiente na prevenção de cárie dentária, por interferir no seu processo de formação da cárie, reduzindo, portanto, sua ocorrência. (FEJERSKOV, 1994; FEJERSKOV, AOBA, 2002; BUZALAF, RAMIRES, 2005). Assim, a partir da segunda metade do século XX tornou-se muito rotineiro o uso de compostos fluoretados na área da Saúde Pública, especialmente na Odontologia, tendo-se em vista a prevenção de cárie dentária. Uma das medidas mais utilizadas é a fluoretação da água de abastecimento público, que é reconhecida entre as 10 melhores medidas de Saúde Pública do século XX (CDC, 1999). Entretanto, o F, apesar de suas propriedades terapêuticas, já bastante descritas na literatura, também pode oferecer riscos ao organismo de quem faz uso do mesmo, se aplicado ou consumido de maneira indiscriminada ou inadequada, tanto de forma aguda quanto crônica (WHITFORD, 1996).

É sugerido que o F interfere em várias vias metabólicas, atuando como inibidor de muitas enzimas. Neste sentido, tem sido utilizado como ferramenta para definir determinados passos na via glicolítica, como a inibição da enzima enolase, que atua tardiamente nessa via (WHITFORD, 1996).

Uma vez em contato com a mucosa do trato digestivo, que pode ocorrer tanto pelo uso de detritícios como pela ingestão de água fluoretada ou ainda através dos alimentos, o F é rapidamente absorvido. Entretanto a absorção é influenciada pelo gradiente de pH dos diferentes tecidos e adjacentes, o que explica a absorção diferencial nos diferentes órgãos e tecidos (WHITFORD, 1990). Por se tratar de um íon que se une de forma reversível com íon hidrogênio, formando portanto um ácido fraco (HF), sua absorção ocorre em maior eficiência em soluções ácidas, com pH em torno de 3,4, ou seja, pode ocorrer de forma muito facilitada na região estomacal, seguindo seu trajeto ao sistema circulatório e subsequentes órgãos, até que seja excretado via renal (WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2011).

Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de analisar os prejuízos que podem ser causados por esse elemento durante e após sua ingestão e absorção nos sistemas digestivo, excretor, muscular, nervoso central, bem como sua ação em eventos metabólicos tais como glicólise e resistência à insulina (WHITFORD, 1989; RIGALLI et al, 2008, 2010; CHIBA et al., 2010, 2012).

A insulina é um hormônio de natureza proteica, que apresenta um baixo peso molecular (5808 Da), sendo constituída por duas cadeias de aminoácidos conectadas por ligações de dissulfeto que quando se rompem a inativam. É sintetizada nas células beta pancreáticas com a tradução do RNAm da insulina através de ribossomos ligados ao retículo endoplasmático formando um pré-pro-hormônio insulínico com peso molecular inicial de 11500 Da, sendo posteriormente clivado para formar uma pro-insulina de peso molecular de cerca de 9000 Da, a qual posteriormente sofre nova clivagem no aparelho de Golgi, formando então a insulina ativa (6000 Da) e peptídeo C. Aproximadamente um sexto do produto final secretado pelas ilhotas de Langerhans encontra-se sob a forma inativa da insulina, a pró-insulina (GUYTON & HALL, 2006).

A homeostasia da glicose, armazenamento de substratos no tecido adiposo, hepático e muscular, estímulo da lipogênese, síntese de glicogênio e proteínas, inibição da lipólise, glicogenólise, degradação de proteínas, crescimento e diferenciação celular são eventos insulino-dependentes (NELSON & COX, 2002). Em circunstâncias em que ocorre ingestão de carboidratos, há também um aumento na secreção de insulina, a qual vai atuar armazenando o excesso de energia gerado sob forma de glicogênio no fígado e músculos que pode, após estímulo insulínico, ser armazenado na forma de gordura no tecido adiposo. A insulina exerce ainda um efeito direto na captação de aminoácidos, convertendo-os em proteínas (GUYTON & HALL, 2006).

Diferentemente do que se acreditava a princípio, a secreção de insulina não está condicionada apenas ao aumento de glicose no sangue, mas além deste sofre influência do aumento de ácidos graxos livres, aumento de aminoácidos no sangue, presença de hormônios gastrointestinais (gastrina, colecistocinina, secretina), glucagon, hormônio do crescimento, cortisol, estimulação beta-adrenérgica, resistência à insulina, obesidade e medicamentos do grupo sulfoniluréia. Por outro lado, pode ocorrer a diminuição na secreção quando ocorre diminuição da glicose sanguínea, jejum, presença de somatostatina, atividade alfa-

adrenérgica e presença de leptina. Existe um mecanismo de *feedback* entre a concentração de glicose e a taxa de secreção de insulina. Com o aumento da concentração sérica da glicose sérica acima de 100 mg/dL de sangue, a taxa de secreção da insulina aumenta rapidamente de forma a atingir o pico entre 10 e 25 vezes o nível basal, com concentrações de glicose entre 400 e 600 mg/dL, sendo que a parada na secreção de insulina ocorre muito rapidamente após a redução da glicose sérica em indivíduos saudáveis (GUYTON & HALL, 2006).

O diabetes é um estado patológico resultante da deficiência na produção (tipo 1, DM1) ou na ação da insulina (tipo 2, DM2). O diabetes mellitus é considerado um problema de Saúde Pública, crescente e oneroso do ponto de vista social e econômico, e com potencial reconhecido para prevenção (GEORG et al., 2005). Cerca de 6-7% da população dos Estados Unidos mostra alguma anormalidade no metabolismo da glicose (NELSON & COX et al., 2011; CDC 2011). No Brasil, já em 1992, o diabetes tipo 2 acometia aproximadamente 7,6% da população (MALERBI, 1992) e hoje em termos de porcentagem esse valor prevalece, mas vale ressaltar que houve aumento da população brasileira nos últimos anos, assim em números brutos pode-se dizer que houve aumento do número de indivíduos diabéticos no Brasil também (SBD, 2013). Trata-se de um dos mais importantes problemas de Saúde Pública mundial, situando-se entre as dez principais causas de óbito no mundo. Apresenta crescente incidência, principalmente em países em desenvolvimento. É estimado um aumento de prevalência da doença de 4,9 milhões para aproximadamente 11,6 milhões de casos até o ano de 2025 na população adulta (PASSOS et al., 2005). Já para a Organização Mundial da Saúde, a previsão é de um aumento de 114% de casos confirmados da doença entre os anos de 2000 e 2030. Cerca de 47 milhões de indivíduos possuem a doença diagnosticada e, em 2004, estimou-se que aproximadamente 3,4 milhões de pessoas tenham morrido por alguma consequência do aumento repentino da glicemia plasmática (WHO, 2013)

Além de afetar os rins, olhos, vasos sanguíneos, coração, o diabetes pode propiciar a ocorrência de periodontites, infecções crônicas que afetam a gengiva e os ossos que suportam os dentes (NEGRATO, 2010. WHO, 2013).

A resistência à insulina no tecido e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum, parecem ser os primeiros sinais para o desenvolvimento do DM2, sendo que provavelmente existe relação do aumento da prevalência de

obesidade infantil e hiperinsulinemia com o desenvolvimento desta doença (OLIVEIRA et al., 2004; SINHA et al., 2002).

São encontrados estudos em humanos associando o consumo excessivo de F com intolerância à glicose. Um estudo realizado em 25 pacientes com fluorose endêmica mostrou que 40% tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém tal anomalia foi revertida com a remoção do excesso de F na água consumida (TRIVEDI et al. 1993). Em adição, foi observada em testes de tolerância à glicose em argentinos residentes em área de fluorose endêmica, a existência de uma relação inversa entre fluoremia e concentração de insulina em função do tempo de ingestão de água (DE LA SOTA et. al. 1997).

Esta relação entre ingestão de F e resistência à insulina vem sendo estudada de longa data em animais. Em 1990, Rigalli et al. observaram que após a administração oral de uma única dose de 40 μmol de NaF/100 g de peso corporal a ratos em jejum, houve uma queda imediata nos níveis plasmáticos de insulina, com consequente aumento da glicemia. Estes fenômenos foram observados com níveis plasmáticos de F entre 5 e 15 μM . A insulina e a glicemia retornaram aos níveis normais em 4-5 horas, juntamente com a remoção do F do plasma e tecidos moles. A secreção de insulina de ilhotas de Langerhans isoladas, perfundidas com soluções contendo 5, 10 ou 20 μM F, foi significativamente inibida em função dos níveis aumentados de F, tanto com concentrações basais quanto com concentrações estimulatórias de glicose. O mesmo grupo de pesquisa observou que o tratamento de ratas recém-desmamadas por 100 dias com água contendo 5 mM de NaF (aproximadamente 95 ppm F) levou a um súbito distúrbio da tolerância à glicose, que se manifestou quando os níveis de F no plasma e tecidos moles estavam elevados, durante o período de aumento da massa óssea. A tolerância à glicose foi normalizada quando a máxima massa óssea foi atingida e os níveis de F no plasma e tecidos moles retornaram aos níveis normais (RIGALLI et al., 1992). Em doses bem maiores de exposição ao F (10 mM NaF ou cerca de 4,5 mM F) foi observada inibição da autofosforilação dos receptores de insulina na sua atividade tirosina quinase no músculo estriado de ratos e da placenta humana (VIÑALS et. al., 1993). Rigalli et al. 1995 compararam os efeitos agudo e crônico da exposição ao fluoreto de sódio (NaF) ou monofluorofosfato de sódio (MFP) na homeostase da glicose em ratos. A administração oral de uma única dose de 40 μmol /100 g peso corporal de cada composto produziu aumento similar de glicose plasmática (até 1,8 g/l) e F

difusível (até 130 $\mu\text{mol/l}$). Em experimentos de longa duração (3 meses), o tratamento com NaF (5 mM) resultou em testes de tolerância à glicose anormais e aumento dos níveis de F no plasma (média de 2-12 μM). Por outro lado, o tratamento com MFP não alterou a homeostase da glicose, e a dosagem de F no plasma foi sempre inferior a 2 μM . A secreção basal de insulina e a secreção estimulada por glicose em ilhotas de Langerhans de ratos foram significativamente inibidas após incubação em soluções contendo 2, 5, 10 e 20 μM NaF. Os resultados deste experimento indicam que a homeostase da glicose é afetada quando a concentração de F difundido em plasma excede 5 μM .

Em razão dos resultados obtidos pela análise do tecido pancreático, o mesmo grupo de autores sugere que o F também causa disfunção das células beta do tecido pancreático, gerando uma secreção ineficiente de insulina (RIGALLI et al., 2008). Um estudo recente comparou o efeito da ingestão de água fluoretada no metabolismo da glicose em ratos normais e com deficiência renal cirurgicamente produzida. Os animais receberam água contendo 0, 1, 5 e 15 ppm F (como NaF) por 60 dias. Não houve diferenças na concentração de glicose plasmática após teste de tolerância à glicose entre ratos normais e com deficiência renal, nem entre ratos com diferentes níveis de ingestão de F. Entretanto, os níveis de insulina plasmáticos aumentaram em função da concentração de F na água, demonstrando resistência à ação da insulina (RIGALLI et al., 2010). Tem sido relatado que esta resistência induzida pelo F pode ser revertida mediante exercício físico (LOMBARTE et al., 2013).

O mecanismo de transdução de sinal da insulina ocorre através da ligação do hormônio a receptores enzimáticos transmembrânicos. Nesta ocasião, ocorre a ativação da proteína tirosina quinase na porção citosólica do receptor, havendo então autofosforilação de resíduos de tirosina na mesma região, os quais, uma vez fosforilados, recrutam e fosforilam diversas moléculas (substratos) como IRS1 e IRS2, que são as principais responsáveis pelo acoplamento de PI3K-PKB (fosfatidil inositol 3 quinase – proteína quinase B) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (NELSON & COX, 2011). A Figura 1 ilustra as vias de sinalização insulínica.

Figura 1. As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares com as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário. (Adaptado de CARVALHEIRA et al., 2002)

Defeitos no processo de ativação das proteínas sinalizadoras de insulina, como IRS1/2, PI3K e na sequência da cascata (PDK, PKB e seus alvos GSK-3, AS160, aPKCs, e família proteína MAPK quinase), bem como no receptor de insulina, têm sido descritos nos estudos em músculo e tecido adiposo, bem como nos quadros clínicos de obesidade e diabetes tipo 2 (DM2), como responsáveis pela resistência periférica à insulina (FRÖJDÖ et al, 2008).

Em face ao observado por Vináls et al. (1993), Sumida et al. (2008), conduziram estudo no sentido de se verificar se era plausível a hipótese de que em animais tratados de forma aguda com NaF poderia haver alteração na cascata de sinalização insulínica, em especial a pp185. Os autores observaram que após

tratamento agudo com F (1 mg/Kg peso corporal) 30 minutos antes do sacrifício dos animais, apesar do NaF induzir a hiperglicemia, indicando portanto que houve interferência na homeostase da glicose, não houve alteração na sensibilidade à insulina. Entretanto, os autores relatam que deve ser considerado que outros substratos insulínicos podem estar envolvidos na homeostase da glicemia.

Uma vez que os resultados do tratamento agudo por NaF não alteraram a fosforilação em tirosina da pp185, Chiba (2010) procedeu ao tratamento crônico por NaF, em ratos Wistar machos, durante 42 dias, submetendo os animais à dose diária de 4,0 mg F/Kg peso corporal, a fim de se caracterizar o efeito do NaF sobre a sensibilidade à insulina, grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185, IRS1/IRS2), fluoremia, glicemia e insulinemia. Foi constatado que houve aumento significativo na fluoremia plasmática, diminuição na sensibilidade à insulina, redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em tecido muscular após estímulo insulínico, sendo que não houve alteração em relação à glicemia e insulinemia e, fosforilação em tirosina da pp185 em tecido hepático. Entretanto, a dose diária de exposição ao F no estudo de Chiba (2010) foi alta e seria interessante verificar se a administração de doses crônicas de F associadas àquelas equivalentes em humanos que recebam níveis ótimos de F através da água artificialmente fluoretada ou níveis aumentados através da água naturalmente fluoretada (em torno de 5 ppm) também seria capaz de alterar estes parâmetros.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo geral avaliar, em ratos normais ou com diabetes já instalada, expostos cronicamente a doses de F na água de beber que simulam a ingestão de F pela água natural e artificialmente fluoretada, parâmetros relacionados à interferência do F no diabetes. Especificamente objetivou-se:

- ✓ Avaliar a fluoremia, glicemia e insulinemia, bem como as concentrações de F no fígado;
- ✓ Avaliar a velocidade de desaparecimento da glicose sanguínea após estímulo insulínico (K_{ITT});
- ✓ Avaliar a resistência à insulina (IR), sensibilidade à insulina (%S) e função das células β pancreáticas (%B);
- ✓ Avaliar o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina – pp185 (IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico, em tecidos muscular e hepático.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Após o projeto de pesquisa ter sido submetido à avaliação inicial da Comissão de Ética e Pesquisa e Ensino com Animais (CEEPA), da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, foram obtidos 214 *Rattus norvegicus* (Wistar), machos, com peso inicial semelhante, recém-desmamados, junto ao Biotério Central da FOB-USP, os quais foram tratados e eutanasiados conforme descrito a seguir. Ao término da pesquisa, o relatório do trabalho executado foi novamente avaliado pela CEEPA e aprovado (Protocolo 13/2010; ANEXO A).

Os animais foram mantidos em número de 3 a 5 por caixa, sendo que nos grupos diabéticos foram instalados pisos aramados no interior da caixa (Figura 2), a fim de evitar o contato dos animais com a maravalha umedecida pelo grande volume de urina excretada por esses animais.

Figura 2 – Caixa de manutenção dos animais, evidenciando o piso aramado ao fundo. Nesta imagem, os animais foram colocados na caixa, com grade, porém sem a maravalha, a fim de se demonstrar o grande débito urinário dos mesmos.

3.1 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Quando os animais estavam com 60 dias de vida, foi induzido o diabetes experimental em 133 dos 214 animais, através da aplicação intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), na dose de 50 mg/Kg p.c. para obtenção de animais diabéticos, a fim de se iniciar o tratamento com NaF. Foram selecionados para tratamento somente os animais cuja glicemia plasmática superou 200 mg/dL. Os demais animais (n=81) foram utilizados como controles não diabéticos.

A STZ foi preparada em solução 0,9% de NaCl gelada (4°C), pH 4,5 e à proporção de 50 mg/mL, em ambiente escuro, sob temperatura ambiente controlada (16°C) e imediatamente injetada intraperitonealmente nos animais, os quais estavam em jejum de dieta sólida por 12 horas (a dieta só foi novamente oferecida uma hora após a aplicação). A escolha do pH e temperatura foi feita considerando-se a maior estabilidade do medicamento nessas condições, o que garantiu melhores resultados na indução do diabetes experimental.

Todos os 133 animais diabéticos tiveram suas glicemias medidas (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) antes da aplicação do medicamento, bem como 24, 48, e 72 h após. De maneira geral, foram observados aumento de ingestão hídrica, aumento da diurese e glicosúria, aspectos fisiológicos que, combinados à hiperglicemia plasmática, serviram como dados confirmatórios do estado diabético dos animais que foram posteriormente utilizados no tratamento. Destes 133 animais, 22 não puderam ser utilizados, pois ou entraram em óbito em aproximadamente 30 horas após a aplicação da STZ, ou suas glicemias não atingiram o valor mínimo estabelecido como referência neste trabalho.

Para alocação dos animais aos grupos de tratamento com NaF, novamente avaliaram-se suas glicemias e os mesmos foram separados em 3 grupos, o mais homogeneamente possível, 5 por caixa, de forma que a glicemia média dos diferentes grupos fosse semelhante, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais diabéticos no início do tratamento

DISTRIBUIÇÃO INICIAL DE TRATAMENTO (n)			
Glicemia (mg/dL)	0 ppm F	10 ppm F	50 ppm F
>600	18	18	18
400<G<600	12	12	12
250<G<400	6	6	6
200<G<250	1	1	1
TOTAL	37	37	37
Média*	419	419	419
DP*	111	103	100

*Valores acima de 600 mg/dL não foram computados.

3.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Cento e noventa e dois animais, entre diabéticos (n=111) e não diabéticos (n=81), receberam durante 22 dias, *ad libitum*, água contendo fluoreto (como NaF) em diferentes concentrações, ou água deionizada, de acordo com os grupos experimentais, a saber:

- ND (Não diabéticos) 0 ppm F: n=27
- ND 10 ppm F: n=27
- ND 50 ppm F: n=27
- D (Diabéticos) 0 ppm F: n= 37
- D 10 ppm F: n=37
- D 50 ppm F: n=37

A Figura 3 ilustra a alocação dos animais para os diferentes grupos experimentais, bem como para os diferentes tipos de análises feitas no estudo. O número de animais alocados aos grupos de animais diabéticos foi maior (n=37), considerando-se que poderia haver perdas. Assim, dos 37 animais alocados a cada um dos grupos D, 6 foram destinados à análise de ITT, 7 ao *western blotting* e 24 às análises plasmáticas (F, glicemia e insulinemia) e F no fígado. Os números correspondentes para os animais ND foram 6, 7 e 14, respectivamente.

Figura 3 - Fluxograma do experimento, destacando a alocação dos animais para os diferentes grupos, bem como para as análises realizadas.

A dieta sólida dos animais foi constituída por ração da marca “Presence” (7883), lote 41EX120024680, sendo que foi previamente medida a concentração de F em diversas amostras, e estas demonstraram concentração média (DP) de 1,01 (0,24) ppm F, valores portanto baixos e incapazes de interferir no tratamento com F. Optou-se por essa ração em virtude de resultados de outros experimentos utilizando a AIN-93 terem causado esteatose hepática, possivelmente por ser uma dieta hipercalórica (MOURA et al., 2012).

Optou-se por 22 dias de tratamento tem virtude dos resultados obtidos em estudo piloto, quando se observou não ser possível tratar os ratos diabéticos por um período maior que este, uma vez que os animais diabéticos tratados com 50 ppm F ficaram extremamente debilitados e com massa corpórea bastante reduzida (Figura 4), o que prejudicaria as análises posteriores, em razão do possível estado de caquexia.

Figura 4 – Animal diabético, com 22 dias de tratamento com água *ad libitum* contendo 50 ppm F e ração sólida com baixa quantidade de F.

3.3 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais utilizados no experimento foram eutanasiados à medida em que se realizaram cada uma das etapas sendo que, para todas as fases, foram previamente anestesiados por Tiopental Sódico (THIOPENTAX, 3%), à dose inicial mínima de 1,6 mL/Kg p.c.,i.p, sendo adicionadas ligeiras doses extra nos casos em

que os animais ainda demonstraram alguma sensibilidade à palpação das patas e cauda, para evitar qualquer tipo de dor durante os procedimentos técnicos e cirúrgicos. Foram coletadas amostras de sangue, fígado, rim e músculo gastrocnêmio para posterior análise.

De parte dos animais destinados às análises plasmáticas, obtiveram-se cerca de 4 mL de sangue coletados em tubos heparinizados, que foram imediatamente centrifugados a 8000 rpm, a 4°C, para obtenção do plasma (cerca de 1,8 mL), o qual foi separado em 3 alíquotas, destinadas às análises de glicemia (n=5-7), fluoremia (n=9-13) e insulinemia (n=5-7).

3.4 TESTE ENDOVENOSO DE TOLERÂNCIA À INSULINA CURTO (ITT)

Para o ITT, foram utilizados 36 animais, sendo 6 por grupo, que foram mantidos durante 14 horas em jejum. Pela manhã foram devidamente anestesiados, e então foi ministrada uma única dose de insulina humana (Humulin R, Eli Lilly Co., Indianápolis, EUA; 0,75 U/Kg p.c.) endovenosamente através da veia peniana. Foi medida a glicemia antes da administração da insulina, e em tempos variáveis, após a administração, a saber: 4 min; 8 min; 12 min e 16 min.

A quantificação da glicemia foi realizada utilizando um monitor glicêmico (Accu-Check Performa, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), sendo que a amostra foi obtida da região caudal dos animais (Figura 5).

Os resultados foram analisados por comparação da constante de proporção de desaparecimento da glicose (K_{itt}) dos tempos entre 0 e 16 min. A K_{itt} foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima das concentrações plasmáticas de glicose durante o decaimento linear (BONORA et al., 1989; CHIBA, 2010).

Figura 5 - Medição da glicemia através de uma microsecção da cauda dos animais para o ITT.

3.5 DOSAGEM DA GLICEMIA

3.5.1 PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A dosagem foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, que se baseia na determinação da glicose pelo princípio de que a amostra (plasma) sofre ação da glicose oxidase na presença de oxigênio, produzindo peróxido de hidrogênio. Este, em presença de fenol e de 4-amonoantipirina, sofre ação da peroxidase, produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em comprimento de onda de 505 nm.

3.5.2 MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se kit enzimático para glicose marca KATAL (Katal Biotecnologia Indústria e Comercio Ltda, São Paulo, Brasil), espectrofotômetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) com leitura ajustada para 505 nm e cubetas marca Kartell³.

As amostras, após coletadas em tubos heparinizados, foram imediatamente centrifugadas a 4°C (Centrifuge 5804R, Eppendorf), sendo então coletado o plasma (cerca de 600 µL por amostra), o qual foi congelado a -20°C até o momento da dosagem.

No dia em que se realizaram as dosagens, as amostras, então congeladas, foram submetidas a uma série de centrifugações até que se apresentassem líquidas e translúcidas novamente (5 min a 3300 rpm + 10 min a 3300 rpm + 5 min a 3300 rpm + 10 min a 3300 rpm, todas a 4°C). Então foi realizado o seguinte procedimento:

- ✓ Nos tubos destinados aos padrões, foram adicionados 20 µL do padrão e 2 mL do reagente enzimático fornecido pelo KIT; nos tubos “brancos” foram adicionados 2 mL do reagente e nos tubos “amostra” foram adicionados 2 mL do reagente enzimático e 20 µL da amostra. Foram então homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C durante 15 min. A determinação das absorbâncias do teste e padrão foi realizada em 505 nm.
- ✓ Para obtenção dos resultados, foram adotados os seguintes cálculos:

1. Glicose (mg/dL) = Absorbância do Teste / Absorbância do Padrão x 100
2. Fator de calibração = 100 / Absorbância do Padrão
3. Glicose (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator
4. Glicose (mmol/L) = mg/dL X 0,0556

Para amostras cuja leitura inicial resultou em valores superiores a 300 mg/dL a amostra foi diluída em solução NaCl 0,85% e repetida leitura, sendo então o resultado obtido multiplicado pelo fator de diluição.

3.6 ANÁLISE DE FLUORETO NO PLASMA

Para análise do F no plasma, seguiu-se protocolo padrão empregado no Laboratório de Bioquímica da FOB. Para tanto, foram utilizados 200 µL do mesmo, que foram submetidos a uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, contém CO₂, que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra plasmática foi colocada na placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado com hexametildisiloxano (HMDS, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) num volume que correspondia a 15% do volume da amostra de plasma. O HMDS tinha sido

previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido à metade (agora chamado de ácido aquecido), a fim de se eliminar qualquer F residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a evaporação do CO₂, o volume das mesmas então foi completado para 2 mL com água deionizada e a difusão seguiu normalmente como descrito por TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996).

Para a difusão, 50 µL de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas (Figura 6). As placas foram fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício, previamente feito na tampa, foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH combinadas numa única gota (Figura 7). O NaOH foi tamponado pela adição de 25 µL de ácido acético 0,2 M, e o volume total foi ajustado para 75 µL com água deionizada, usando uma pipeta automática Gilson (10-100 µL). A gota, contendo todo o F, foi então analisada com eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catalogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940, sendo estes mantidos unidos através de bandas de borracha durante a leitura, e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figura 8). Foram utilizados padrões com concentração conhecida de F (0,25 a 10 nm), difundidos em triplicata concomitantemente às amostras. Apenas curvas padrão com coeficiente de correlação > 0,99 foram aceitas.

Figura 6 – Colocação de 3 gotas de NaOH 0,05 M na tampa das placas de Petri.

Figura 7 – União das gotas de NaOH contendo o fluoreto, após difusão facilitada por HMDS.

Figura 8 – Análise de fluoreto com o eletrodo 9409, acoplado ao eletrodo de referência calomelano.

3.7 INSULINEMIA E CÁLCULO DO ÍNDICE HOMA2-IR

A dosagem de insulina foi realizada pelo método radioimunológico – RIA KIT (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA), no Departamento de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP-Araçatuba.

O experimento foi realizado em 3 etapas (em 3 dias consecutivos).

No primeiro dia, prepararam-se os tampões e padrões, pipetaram-se as amostras em volumes iguais de 100 µL das amostras e dos anticorpos. No segundo dia, acrescentou-se a insulina marcada e no terceiro, realizou-se a leitura da insulina marcada em contador gama durante 1 minuto (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em ng/mL e foram depois convertidos em pmol/L, para que pudesse ser feita a análise de resistência à insulina utilizando o índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*).

O índice HOMA2-IR (Levy et al., 1998) foi calculado a partir dos dados de glicemia de jejum (mmol/L) e insulinemia de jejum (pmol/L), utilizando o *software* HOMA Calculator v.2.2 (Diabetes Trials Unit, University of Oxford, disponível em <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/index.php>). Este modelo é baseado no modelo original (MATTHEWS et al., 1985), mas foi resolvido por computação, levando em consideração variações na resistência à glicose hepática e periférica (ou seja, a redução na supressão na saída de glicose do fígado [por hiperglicemia] e redução na incorporação de glicose periférica estimulada pela glicose) (Rudenski et al., 1991). O *software* fornece os cálculos de resistência à insulina (IR), sensibilidade à insulina (%S) e função das células β pancreáticas (%B).

3.8 ANÁLISE DE FLUORETO EM FÍGADO

Para a dosagem de F em fígado, as amostras foram previamente homogenizadas (15000 rpm, 2 min) com água deionizada, na proporção de 200 mg/0,5 mL (Figura 9).

Utilizou-se para dosagem do fluoreto 1,0 mL do homogenato de cada uma das amostras obtidas, e as leituras foram feitas da mesma maneira descrita para o plasma, exceto pela pré-difusão, que não foi realizada.

Foram utilizados padrões com concentração conhecida de F (0,25 a 50 nm), difundidos em triplicata concomitantemente às amostras. Apenas curvas padrão com coeficiente de correlação $> 0,99$ foram aceitas.

Figura 9 – Homogeneização do fígado para análise de fluoreto.

3.9 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO EM TIROSINA DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DE INSULINA (PP185)

Os animais foram anestesiados conforme já descrito e imediatamente abriu-se a cavidade abdominal, ampliando a incisão e também expondo a musculatura das patas traseiras, assim como a veia porta hepática.

Então foi removido um fragmento de fígado medindo aproximadamente 0,6 cm de diâmetro, que foi preparado conforme será descrito em “extração”. Em

seguida, o mesmo procedimento foi feito para uma porção de músculo estriado esquelético (m. gastrocnemius).

Injetou-se então insulina regular (Humulin-R, Eli Lilly Co., Indianápolis, EUA) diluída em soro gelado (4 UI/mL) através da veia porta e 30 seg após a aplicação total da insulina coletou-se outro fragmento de fígado e procedeu-se à extração. Após 90 segundos da aplicação da insulina, coletou-se outro fragmento de músculo estriado esquelético, que também foi submetido ao procedimento de extração para obtenção do extrato total, o qual foi aplicado no gel para realização do *Western Blotting*. Os tempos escolhidos para coletar o fígado e músculo, 30 e 90 segundos após estímulo, respectivamente, consideraram que estes tempos correspondem aos picos de fosforilação em tirosina da pp185 após a administração da insulina através da veia porta hepática (CARVALHO et al.,1996).

EXTRAÇÃO

Os tecidos muscular e hepático foram homogenizados em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM), mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 min, transferidos para gelo e então centrifugados a 16.000 g durante 40 min. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação proteica pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA), e para estoque em tampão de Laemmli (azul bromofenol 0,1%; SDS 10%; fosfato de sódio 1 M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%) (Figura 10).

Figura 10 – Homogenização de tecidos para *Western Blotting*

Após a quantificação de proteínas (Figura 11) foi feita a técnica *Western blotting*. Inicialmente as amostras foram submetidas a SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis), para separação das proteínas por peso molecular, tendo sido aplicado um volume correspondente a 185 µg de proteína. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos: o gel de “stacking” (Acrilamida 30%; Tris 1M; SDS 10%; APS 10%; TEMED, água deionizada) e o gel de resolução, ou corrida, (Glicerol; EDTA; SDS; Tris; Acrilamida; APS; TEMED, água deionizada). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM) (Figura 12).

Figura 11 – Quantificação de proteínas pelo método de Bradford previamente ao *western blotting*.

Figura 12 – Montagem do gel para corrida eletroforética (*Western Blotting*). 1) Suporte para montagem do gel; 2) Aparador das placas de vidro (espaçador e placa); 3) Espaçador de 1,5 mm e placa de vidro; 4) colocação das placas de vidros no aparador; 5) aparador com as placas após terem sido travadas com os dispositivos laterais de trava do aparador; 6) aparador contendo as placas para montagem do gel, posicionado no suporte de montagem; 7 e 8) aplicação do gel no interior das placas de vidro; 9) aplicação do gel de *stacking* para posterior inserção dos pentes para delimitação dos poços onde foram aplicadas as amostras.

Nos géis, as amostras tanto para fígado quanto para músculo foram dispostas da seguinte maneira:

- ✓ Poço 1: padrão de peso molecular (Amersham Full-Range Rainbow – GE Healthcare);
- ✓ Poço 2: ND 0 ppm F (-);
- ✓ Poço 3: ND 0 ppm F (+);
- ✓ Poço 4: ND 10 ppm F (-);
- ✓ Poço 5: ND 10 ppm F (+);
- ✓ Poço 6: ND 50 ppm F (-);
- ✓ Poço 7: ND 50 ppm F (+);

-
- ✓ Poço 8: D 0 ppm F (-);
 - ✓ Poço 9: D 0 ppm F (+);
 - ✓ Poço 10: D 10 ppm F (-);
 - ✓ Poço 11: D 10 ppm F (+);
 - ✓ Poço 12: D 50 ppm F (-);
 - ✓ Poço 13: D 50 ppm F (+).

A eletroforese foi realizada em equipamento para mini gel (BIORAD) (Figura 13). Durante o empacotamento da amostra, ou seja, quando passa do poço de aplicação pelo gel de *stacking* (Acrilamida 30%; Tris 1M; SDS 10%; APS 10%; TEMED, água deionizada), utilizaram-se 30 V, durante 100 min. Em seguida, utilizaram-se 100 V durante 90 min para a corrida de resolução 6,5% ou 10% (Glicerol; EDTA; SDS; Tris; Acrilamida; APS; TEMED, água deionizada).

Na sequência, desmontou-se o suporte, retiraram-se os géis e montou-se o cassete de transferência (BIORAD) para transferir as frações proteicas do gel para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham Bioscience, Bucknghashire, England). Nesse procedimento, utilizou-se voltagem constante de 100 V, durante 1 h a 4°C, e em seguida 120 V durante 15 minutos, com uso de tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 2%, água deionizada). Para fins de confirmação da eficácia do processo de transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, realizou-se uma prévia coloração com Ponceau (Figura 14). Trata-se de uma coloração reversível, compatível tanto com membranas de nitrocelulose quanto PVDF, constituindo-se num método rápido de se visualizar as proteínas transferidas para a membrana. Esse corante é facilmente removido com água, e não interfere nos passos seguintes do *immunoblotting* (GE HEALTHCARE).

Após a transferência proteica do gel para a membrana de nitrocelulose, realizou-se a etapa de *immunoblotting*, ou seja, a detecção específica da proteína tirosina fosforilada em pp185. Para tanto, a membrana de nitrocelulose foi incubada na presença de solução bloqueadora [solução basal (SB) (NaCl; Tris; “Tween” 20; água deionizada) acrescida de 5% de leite desnatado – 0% de gordura] durante 2 h à temperatura ambiente, e posteriormente lavada com solução basal por 3 sessões de 10 minutos.

No momento do preparo das membranas de nitrocelulose para o *immunoblotting*, que foi realizado com o equipamento “SNAPi.d. Protein Detection System” (Millipore) (Figura 15), as membranas foram novamente lavadas em solução basal por 3 vezes, então foram novamente bloqueadas em solução contendo BSA 3% durante 48 segundos e incubadas durante 10 minutos com o anticorpo primário. Na sequência, foram feitas novas lavagens com solução basal (3 vezes) e aplicado o anticorpo secundário que ficou em contato com a membrana durante 10 minutos. Após cada uma das etapas, as soluções foram removidas à vácuo pelo sistema SNAP.

Para o procedimento de quimioluminescência, acrescentou-se a peroxidase *horseradisch* (kit quimioluminescência – ECL – Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Foi adicionado 1 mL de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit ECL), e incubado por 1,5 minuto. Foi retirado o excesso de reagente por capilaridade e a membrana de nitrocelulose foi exposta ao filme de Raio-X (Hyperfilm ECL – Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), durante 10 minutos à temperatura ambiente para fígado e durante 15 minutos para músculo. Os filmes foram revelados e fixados manualmente.

Os filmes radiográficos obtidos foram escaneados em resolução de 600 dpi (HP Scan) e os *blots* obtidos foram avaliados utilizando-se o programa ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.)

Figura 13 – Equipamento para mini gel (Tetra) Biorad.

Figura 14 – Coloração por Ponceau. A imagem demonstra uma região da membrana de nitrocelulose após transferência, na região onde usualmente se encontra a proteína constitutiva β -actina.

Figura 15 – Equipamento utilizado para incubação dos anticorpos (SNAP).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os softwares GraphPad InStat versão 3,0 para Windows, Prism versão 4,0 para Windows (GraphPad Software Inc., LA Jolla, CA, EUA) e Statistica 64 (Stat Soft. Inc., Tulsa, OK, 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. Os dados de K_{ITT} tiveram distribuição normal e homogênea, sendo analisados por ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni para comparações individuais. Os dados de massa inicial, massa final, ganho de massa, glicemia, insulinemia, HOMA2-IR, %B, %S e concentração plasmática de F tiveram distribuição normal, mas não apresentaram homogeneidade. Foram então analisados por ANOVA a 2 critérios, após transformação logarítmica, e pelo teste de Bonferroni para comparações individuais. A comparação do grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina antes e

após estímulo com insulina foi feita pelo teste t pareado para cada grupo em separado, enquanto que a comparação do grau de fosforilação do receptor de insulina entre os diferentes tratamentos, para os animais diabéticos e não diabéticos em separado, foi feita por ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais. Também foi checada a relação entre a concentração plasmática de fluoreto e a glicemia, utilizando regressão linear. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

4 Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliou-se se a administração de doses crônicas de F associadas àquelas equivalentes em humanos que recebam níveis ótimos de F através da água artificialmente fluoretada ou níveis aumentados através da água naturalmente fluoretada (em torno de 5 ppm) seria capaz de alterar parâmetros relacionados à resistência à insulina em ratos.

Quanto ao peso inicial dos animais (Tabela 2), a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=60,93$, $p<0,0001$), mas não entre os tratamentos ($F=0,615$, $p=0,542$), não tendo havido interação entre ambos ($F=0,181$, $p=0,834$). Os animais diabéticos apresentaram uma massa inicial significativamente menor que a dos não diabéticos, independentemente do tratamento. Quando foi feita a análise estatística para a massa final, o padrão observado foi o mesmo daquele visto para a massa inicial, ou seja, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=239,4$, $p<0,0001$), mas não entre os tratamentos ($F=0,193$, $p=0,825$), embora tenha havido interação entre ambos ($F=6,578$, $p<0,05$) (Tabela 3).

Poder-se-ia pensar que esta diferença entre as condições (animais diabéticos X não diabéticos) para a massa final fosse simplesmente um reflexo da diferença já observada antes do tratamento. Por conta disto, foi também calculado e analisado o ganho de massa durante o tratamento. Para este parâmetro, houve, para os animais não diabéticos, um ganho de aproximadamente 20% em relação à massa inicial, ao final do tratamento (Tabela 4), sendo que os animais não diabéticos, independentemente do tratamento com F, tiveram ganho de massa semelhante ao final do tratamento. Este ganho era esperado, uma vez que os animais tinham 60 dias quando se iniciou o tratamento com F e nesta faixa etária ganho de massa ainda ocorre. Já para os animais diabéticos, o ganho de massa foi significativamente menor em relação aos não diabéticos ($F=60,76$, $p<0,0001$). Isto também era esperado, uma vez que o diabetes está associado à perda de massa corporal. A análise da Tabela 4 revela ainda que houve um ligeiro ganho de massa para os animais diabéticos não tratados com F, enquanto que aqueles tratados tiveram uma ligeira perda de massa, embora a ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica não tenha encontrado diferença significativa entre os tratamentos ($F=0,438$, $p=0,646$), nem interação entre os critérios condição-

tratamento ($F=1,666$, $p=0,193$). Estes dados sugerem que a ingestão de F por animais diabéticos parece agir de maneira sinérgica com o diabetes em si, de forma a levar a uma redução de massa corpórea.

Quando a massa final foi analisada apenas para os animais diabéticos (Figura 16 e Tabela 3), a ANOVA encontrou diferença significativa entre os grupos 0 e 50 ppm F ($F=3,58$, $p=0,0325$) sendo a massa menor nos animais tratados, embora para o ganho de massa a diferença não tenha sido significativa ($F=2,234$, $p=0,114$).

Tabela 2. Massa média no início do tratamento (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Massa inicial	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	246,2 $\pm$ 37,4	210,6 $\pm$ 30,8
10 ppm	250,0 $\pm$ 35,2	213,7 $\pm$ 24,8
50 ppm	257,1 $\pm$ 40,6	213,4 $\pm$ 26,5

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p<0,001$)). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas. $n=27-37$.

Tabela 3. Massa média ao fim do tratamento (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Massa final	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	290,6 $\pm$ 40,2	216,3 $\pm$ 34,8
10 ppm	292,1 $\pm$ 45,5	210,9 $\pm$ 28,4
50 ppm	317,6 $\pm$ 40,3	194,5 $\pm$ 30,1

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni ($p<0,001$)). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas. $n=21-27$.

Tabela 4. Ganho médio de massa (g, $\pm$ DP) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Massa final	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	50,3 $\pm$ 46,2	7,9 $\pm$ 45,5
10 ppm	43,6 $\pm$ 67,1	-4,6 $\pm$ 36,9
50 ppm	59,2 $\pm$ 42,0	-15,0 $\pm$ 33,8

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni ($p<0,01$)). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas. $n=21-27$

Figura 16 – Animais antes (A) e depois (B) do diabetes induzido por estreptozotocina.

Para a glicemia, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=122,9$, $p<0,0001$), mas não entre as concentrações de F ($F=0,401$, $p=0,673$) e nem para a interação em ambos ($F=2,445$, $p=0,103$). Independentemente da exposição ao F, a glicemia nos animais diabéticos foi significativamente maior que aquela observada para os animais não diabéticos ($p<0,001$; Tabela 5), confirmando que o tratamento com estreptozotocina foi efetivo.

Já os resultados para a insulinemia mostraram um perfil diferente daquele visto para a glicemia (Tabela 6). A ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=89,72$, $p<0,0001$), entre as concentrações de F ($F=5,48$, $p=0,0089$), tendo havido interação significativa entre estes critérios ($F=5,25$, $p=0,0105$). Os animais diabéticos apresentaram uma insulinemia significativamente menor quando comparados aos animais não diabéticos, novamente confirmando a eficácia do tratamento com estreptozotocina. O tratamento com F não afetou a

insulinemia nos animais não diabéticos, mas reduziu significativamente este parâmetro em animais diabéticos, não tendo sido observada dose-resposta, ou seja, a insulinemia apresentou valores bastante similares nos animais diabéticos tratados com 10 ou 50 ppm de F na água. Este resultado é bastante intrigante e remete-nos ao provável mecanismo envolvido no fenômeno, que foi parcialmente investigado no trabalho de (MENOYO et al., 2008). Os autores relataram que a concentração de glicose necessária para levar a 50% de secreção de insulina é mais alta em ratos que receberam F antes da carga de glicose, comparados aos animais controle (MENOYO et al., 2008). Sugeriram ainda que provavelmente o F leva a uma insensibilidade das células β ao estímulo com a glicose ou induz a secreção de espécies moleculares com atividade biológica inferior à da insulina. Foi observado ainda que o *clearance* plasmático da insulina não é afetado pelo tratamento com F, conforme revelado pelos experimentos realizados com injeção intravenosa de ^{125}I -insulina. Experimentos envolvendo a incorporação de ^3H -leucina nas células β pancreáticas revelaram uma maior incorporação nas células tratadas com F em relação às células controle, suportando a hipótese de que o F não interfere com a síntese de insulina, mas sim prejudica a sua secreção, afetando o processamento enzimático de seus precursores (MENOYO et al., 2008).

As doses de F na água empregadas no presente estudo foram selecionadas por corresponderem, em humanos, a doses de 0, 1 (concentração usualmente adicionada à água de abastecimento público) e 5 ppm de F na água (concentração de F presente naturalmente na água de algumas regiões onde ocorre fluorose endêmica), respectivamente (DUPANICE et al., 1995). Tem sido relatado que queda nos níveis plasmáticos de insulina com consequente aumento da glicemia são observados com níveis plasmáticos de F de 5 a 15 μM (0,095 a 0,285 $\mu\text{g/mL}$) que acontecem após a administração oral de uma única dose de 40 μmol de NaF/100 g de peso corporal (7,6 mg F/Kg peso corporal) sendo que a insulina e a glicemia retornaram aos níveis normais em 4-5 horas, juntamente com a remoção do F do plasma e tecidos moles (RIGALLI et al., 1990). No nosso estudo, entretanto, o F foi administrado cronicamente através da água de beber, sendo que os níveis plasmáticos de F encontrados variaram entre 0,008 e 0,048 $\mu\text{g/mL}$ para os animais não diabéticos e entre 0,009 e 0,136 $\mu\text{g/mL}$ para os animais diabéticos (Tabela 7). Apesar de ter havido uma correlação significativa entre a concentração plasmática de fluoreto e a insulinemia ($p=0,0019$), o coeficiente de correlação foi baixo

($r^2=0,156$) e apesar de a administração de F ter reduzido a insulinemia nos animais diabéticos, não foram observadas alterações na glicemia em função da administração de F. Achados semelhantes (ausência de alteração na glicemia e insulinemia para animais não diabéticos) foram relatados por Chiba (2010), que trataram ratos durante 100 dias com uma dose de F de 4,0 mg/Kg peso corporal/dia através da água de beber, que resultou numa concentração média de F no plasma de 0,121 $\mu\text{g/mL}$.

Não há relatos prévios na literatura sobre os efeitos da administração crônica de F a animais previamente diabéticos e são necessários mais estudos para se confirmarem os resultados da insulinemia encontrados no presente estudo. São também necessários estudos em humanos. Aparentemente a redução da insulinemia causada pela administração de F em animais diabéticos não é acompanhada por aumento na glicemia. Estes resultados sugerem que não haveria necessidade de indivíduos diabéticos adultos reduzirem o consumo de F, o que deve ser confirmado em estudos conduzidos em humanos.

Tabela 5. Glicemia média (mmol/L, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	7,126 $\pm$ 1,469	18,583 $\pm$ 4,998
10 ppm	8,988 $\pm$ 1,544	17,102 $\pm$ 4,569
50 ppm	7,017 $\pm$ 2,368	19,054 $\pm$ 3,119

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni; $p<0,001$). As diferenças entre os tratamentos com fluoreto não foram significativas. $n=5-7$.

Tabela 6. Insulinemia média (pmol/L, $\pm$ DP) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	105,9 $\pm$ 1,2 ^a	70,7 $\pm$ 15,7 ^a
10 ppm	106,4 $\pm$ 2,2 ^a	38,1 $\pm$ 15,5 ^b
50 ppm	103,7 $\pm$ 4,7 ^a	42,1 $\pm$ 15,0 ^b

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre as concentrações de fluoreto (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni; $p<0,001$). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas. $n=5-7$.

Para a concentração de fluoreto no plasma e no fígado, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=83,20$, $p<0,0001$ e $F=33,81$, $p<0,0001$ para plasma e fígado, respectivamente) e entre as concentrações de F na água ($F=276,20$, $p<0,0001$ e $F=83,48$, $p<0,0001$, para plasma e fígado, respectivamente), sendo a interação entre ambos significativa ($F=14,43$, $p<0,0001$ e $F=3,11$, $p<0,05$, para plasma e fígado, respectivamente). Foi observada uma dose-resposta para as concentrações plasmáticas de F, que foram significativamente maiores nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos, exceto para o grupo não tratado com F (Tabelas 7 e 8). As concentrações plasmáticas de F encontradas no presente trabalho para os animais não diabéticos são bastante parecidas com dados encontrados em outros trabalhos nos quais os animais receberam água contendo concentrações de F similares (KOBAYASHI et al., 2009; PEREIRA et al., 2013; IANO, 2012). Um dado que chama a atenção é que para os animais diabéticos, as concentrações plasmáticas de F foram significativamente maiores mediante exposição a este elemento através da água de beber (Tabela 7). A concentração plasmática de F é controlada basicamente por dois mecanismos: incorporação de F no esqueleto e excreção de F através da urina. Os rins representam a maior rota de eliminação do F do organismo. Consequentemente, o plasma e a excreção urinária refletem um balanço fisiológico determinado pela ingestão prévia de F, grau de incorporação e remoção de F do osso e eficiência com que os rins excretam o F (BUZALAF, 2011). Após entrar nos túbulos renais, uma quantidade variável de F é reabsorvida (de 10 a 90%) e retorna à circulação sistêmica, enquanto que o restante é excretado na urina. Este processo, juntamente com a taxa de filtração glomerular, é o maior determinante da quantidade de fluoreto excretada na urina. A redução na taxa de filtração glomerular que ocorre em casos de disfunção renal crônica resulta em excreção mais baixa e níveis plasmáticos de F mais elevados (SCHIFFL; BINSWANGER, 1980). A doença renal diabética (DKD) é uma complicação microvascular comum do diabetes, que está associada a uma perda progressiva da função renal (KOMOROWSKY et al., 2012). A hiperglicemia, ativa diversas vias de inflamação tanto diretamente quanto através de transcrição gênica, induzindo estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, TGF- β , sistema renina-angiotensina-aldosterona e produtos finais de glicação avançada, o que coletivamente leva à injúria dos podócitos, má função,

apoptose e deposição de proteínas na matriz extracelular dos néfrons, levando à perda de albumina (CHOUDHURY et al., 2010). A perda da função renal causada pelo diabetes poderia explicar o aumento significativo da concentração plasmática de F nos animais diabéticos, quando comparados aos não diabéticos. Este é o primeiro trabalho na literatura a relatar um aumento da concentração plasmática de F em animais diabéticos, quando comparados a animais não diabéticos. Este achado pode ter uma implicação importante para a prevenção da fluorose dentária em crianças diabéticas. A fluorose dentária é um distúrbio de desenvolvimento do esmalte que acontece quando há uma ingestão excessiva de F durante o período de formação dos dentes (DENBESTEN & LI, 2011). Assim, pode-se sugerir que para crianças diabéticas e que já apresentem algum comprometimento da função renal, deva haver um controle mais rigoroso das fontes de ingestão de F (BUZALAF, 2011), a fim de se prevenir a fluorose dentária, uma vez que níveis plasmáticos mais elevados de F podem ser esperados, mesmo com uma ingestão aparentemente ótima deste íon.

Tabela 7. Concentração plasmática média de fluoreto ($\mu\text{g/mL}$, $\pm\text{DP}$) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos	Diabéticos
0 ppm	0,008 $\pm$ 0,001 ^{Aa}	0,009 $\pm$ 0,001 ^{Aa}
10 ppm	0,015 $\pm$ 0,004 ^{Ab}	0,040 $\pm$ 0,017 ^{Bb}
50 ppm	0,048 $\pm$ 0,013 ^{Ac}	0,136 $\pm$ 0,053 ^{Bc}

* Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre animais diabéticos e não diabéticos. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p < 0,001$). $n=9-13$.

Tabela 8. Concentração média de fluoreto em fígado ($\mu\text{g/g}$, $\pm\text{DP}$) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto no fígado	Não diabéticos	Diabéticos
0 ppm	0,014 $\pm$ 0,003 ^{Aa}	0,020 $\pm$ 0,010 ^{Aa}
10 ppm	0,024 $\pm$ 0,009 ^{Ab}	0,033 $\pm$ 0,014 ^{Bb}
50 ppm	0,039 $\pm$ 0,009 ^{Ac}	0,086 $\pm$ 0,038 ^{Bc}

* Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre animais diabéticos e não diabéticos. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p < 0,001$). $n=11-13$.

No presente trabalho, a resistência à insulina em animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não cronicamente com fluoreto foi avaliada por 2 índices: a) constante de proporção de desaparecimento da glicose (K_{itt}) e b) HOMA2-IR (incluindo a % da função das células β [%B] e a sensibilidade à insulina [%S]) (LEVY et al., 1998).

Um padrão semelhante ao observado para a glicemia plasmática foi visto para a velocidade de desaparecimento da glicose sanguínea, ou seja, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=20,51$, $p<0,0001$), mas não entre as concentrações de F ($F=0,121$, $p=0,887$, sem interação significativa em ambos ($F=2,001$, $p=0,1555$). A velocidade de desaparecimento da glicose sanguínea foi menor nos animais diabéticos quando comparados aos não diabéticos, embora a diferença só tenha sido significativa para os grupos controle e tratado com 10 ppm F ($p<0,05$; Tabela 9), corroborando a efetividade do tratamento com estreptozotocina. Estes dados reforçam que, mesmo com uma insulinemia mais baixa, os animais diabéticos tratados com F são capazes de manter a glicemia dentro dos parâmetros observados para os animais diabéticos não expostos ao F.

A média do índice HOMA2-IR para os animais diabéticos não tratados com F foi aproximadamente o dobro daquele observado para os animais não diabéticos, embora a diferença não tenha sido significativa. O tratamento dos animais diabéticos com F restaurou o índice HOMA2-IR aos valores observados para os animais não diabéticos (Tabela 10), o que pode ser atribuído à redução da insulinemia em função do tratamento com F (Tabela 6), uma vez que as glicemias foram bastante semelhantes entre os animais diabéticos, independentemente da exposição ao F (Tabela 5). Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre as condições ($F=0,080$, $p=0,779$), nem entre as concentrações de F ($F=2,358$, $p=0,111$), sem interação entre ambos os critérios ($F=2,819$, $p=0,075$).

Quando se analisou a % da função das células β pancreáticas, o padrão encontrado foi similar àquele relatado para a glicemia e ITT, ou seja, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as condições ($F=175,4$, $p<0,0001$), mas não entre as concentrações de F ($F=2,514$, $p=0,097$, sem interação em ambos ($F=1,827$, $p=0,177$). Independentemente do tratamento com F, a %B nos animais diabéticos foi significativamente menor que aquela observada para os animais não diabéticos ($p<0,001$; Tabela 11), confirmando que o tratamento com estreptozotocina foi efetivo.

Quanto à % de sensibilidade à insulina (Tabela 12), A ANOVA a 2 critérios não encontrou diferença significativa entre as condições ($F=0,8708$, $p=0,358$), mas encontrou entre os tratamentos ($F=4,585$, $p=0,018$), tendo havido interação significativa entre ambos ($F=5,491$, $p=0,0091$). Pode-se observar que os valores foram bastante homogêneos para os animais não diabéticos, independentemente da exposição ao F, enquanto que para os animais diabéticos, foi observado um aumento significativo na %S nos grupos tratados com F, que não diferiram entre si, embora a %S tenha sido maior para o grupo que recebeu 10 ppm F, que apresentou a maior %S dentre todos os grupos. Para os animais diabéticos tratados com 10 ppm F, a %S foi significativamente maior que aquela observada para os animais não diabéticos, tratados com a mesma concentração de F.

Nos experimentos de *Western blotting* foi observado para o fígado um aumento significativo no grau de fosforilação da pp185 – IRS-1/IRS-2 após estímulo insulínico, quando comparado com o experimento realizado antes do estímulo insulínico (Figura 17). Já no músculo gastrocnêmio, embora tenha sido observado um aumento no grau de fosforilação da pp185 – IRS-1/IRS-2 mediante estímulo insulínico em todas as situações, a diferença só foi significativa para os animais não diabéticos (Figura 18).

Quando se comparou o grau de fosforilação da pp185 após estímulo insulínico em função do tratamento com F, tanto para o fígado (Figura 19) quanto para o músculo (Figura 20) não foram encontradas diferenças significativas para os animais não diabéticos nem para os diabéticos. No fígado, observa-se uma tendência para aumento do grau de fosforilação mediante tratamento com F, mais pronunciado para os animais não diabéticos (Figura 19). Os dados de aumento no grau de fosforilação da pp185 para os animais diabéticos de certa forma corroboram os dados obtidos para a %S. Já para o músculo gastrocnêmio (Figura 20), uma tendência oposta foi vista, ou seja redução no grau de fosforilação mediante tratamento com F, também mais pronunciada para os animais não diabéticos. Estes dados corroboram os achados de Chiba et al. (2012), onde foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado com F (animais não diabéticos), embora a dose de F empregada tenha sido maior que aquelas utilizadas no presente estudo. Estudos adicionais devem ser conduzidos na tentativa de se explicar o mecanismo que leva a este efeito, bem como avaliar o efeito do F em outros pontos da via de sinalização da insulina.

Tabela 9. Velocidade média ($\pm$ DP) de desaparecimento da glicose (K_{itt} , % por minuto) sanguínea em função da administração de insulina (0,75 U/Kg peso corporal) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos	Diabéticos
0 ppm	3,98 $\pm$ 2,00 ^A	2,05 $\pm$ 0,60 ^B
10 ppm	4,07 $\pm$ 0,67 ^A	1,55 $\pm$ 1,09 ^B
50 ppm	3,34 $\pm$ 0,49 ^A	2,66 $\pm$ 0,97 ^A

* Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre as condições. As diferenças entre os tratamentos com fluoreto não foram significativas (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p < 0,001$). $n=5-6$).

Tabela 10. Índice HOMA2-IR médio ($\pm$ DP) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos	Diabéticos
0 ppm	2,100 $\pm$ 0,089	4,417 $\pm$ 3,159
10 ppm	2,240 $\pm$ 0,114	1,757 $\pm$ 1,669
50 ppm	2,043 $\pm$ 0,190	1,986 $\pm$ 0,951

* Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica ($p > 0,05$). $n=5-7$. Cálculos feitos utilizando o *software* HOMA Calculator v.2.2.

Tabela 11. Porcentagem média ($\pm$ DP) de função das células β pancreáticas (%B) para ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos ^A	Diabéticos ^B
0 ppm	88,02 $\pm$ 30,77	12,52 $\pm$ 6,48
10 ppm	53,61 $\pm$ 16,67	9,16 $\pm$ 6,24
50 ppm	93,47 $\pm$ 35,11	6,96 $\pm$ 3,09

* Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as condições (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p < 0,001$). $n=5-7$. Cálculos feitos utilizando o *software* HOMA Calculator v.2.2.

Tabela 12. Porcentagem média ($\pm$ DP) de função de sensibilidade à insulina (%S) em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto por 22 dias

Concentração de fluoreto na água	Não diabéticos	Diabéticos
0 ppm	47,68 $\pm$ 2,15 ^{Aa}	39,03 $\pm$ 28,42 ^{Aa}
10 ppm	44,92 $\pm$ 2,50 ^{Aa}	83,02 $\pm$ 35,30 ^{Bb}
50 ppm	49,01 $\pm$ 4,51 ^{Aa}	65,61 $\pm$ 41,87 ^{Ab}

* Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre as condições. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos. (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni ($p < 0,001$). $n=5-7$. Cálculos feitos utilizando o *software* HOMA Calculator v.2.2.

Figura 17. Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) no fígado de animais não diabéticos e diabéticos, tratados com 0, 10 ou 50 ppm de fluoreto administrado na água de beber por 22 dias. Em **A**, autorradiografia típica; quantidades iguais de proteínas (185 µg) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em **B** e **C**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (teste *t* pareado) Insulina (-) VS. Insulina (+).

Figura 18 - Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio) de animais não diabéticos e diabéticos, tratados com 0, 10 ou 50 ppm de fluoreto administrado na água de beber por 22 dias. Em **A**, autorradiografia típica; quantidades iguais de proteínas (185 µg) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em **B** e **C**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (teste t pareado) Insulina (-) VS. Insulina (+).

Figura 19 - Efeito do tratamento com fluoreto (0, 10 ou 50 ppm) na água de beber (22 dias) sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) após estímulo insulínico (+) no tecido hepático de animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Os valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p>0,05$).

Figura 20 - Efeito do tratamento com fluoreto (0, 10 ou 50 ppm) na água de beber (22 dias) sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 – IRS-1/IRS-2) após estímulo insulínico (+) no tecido muscular (gastrocnêmio) de animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Os valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ DP de 5 experimentos para animais não diabéticos e diabéticos, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p>0,05$).

5 Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo têm grande impacto do ponto de vista epidemiológico, dando suporte adicional à fluoretação das águas de abastecimento público. Cabe ressaltar que as doses de F empregadas aqui correspondem àquelas adicionadas artificialmente à água de abastecimento (dose menor), bem como doses que podem ser encontradas em áreas de fluorose endêmica (dose maior). Em animais não diabéticos, estas doses não foram capazes de causar qualquer distúrbio em nenhum dos parâmetros avaliados. Trabalhos anteriores relataram alguns efeitos nestes parâmetros, mas as doses empregadas foram maiores (CHIBA et al., 2012) ou agudas (RIGALLI et al., 1990; MENOYO et al., 2008). Já nos animais diabéticos, a administração de F reduziu a insulinemia, mas não causou distúrbios na glicemia pela compensação trazida pelo aumento da sensibilidade à insulina [contrariamente ao que vinha sendo relatado anteriormente para animais não diabéticos submetidos a doses maiores de F (CHIBA et al., 2012; MENOYO et al., 2008)]. Assim, os resultados sugerem que as doses de F empregadas na água de abastecimento são seguras, mesmo para indivíduos adultos diabéticos. A única ressalva que se faz é em relação a crianças diabéticas em idade de risco para a ocorrência de fluorose dentária na dentição permanente (entre 1 e 7 anos de idade). Foi observado que as concentrações plasmáticas de F são significativamente maiores nos animais diabéticos que naqueles não diabéticos, devido às disfunções renais classicamente induzidas pelo diabetes. Assim, parece viável recomendar que crianças diabéticas reduzam a ingestão de F a partir da água para prevenir a fluorose dentária. Seria interessante realizar estudos onde se avaliasse a concentração de F nas unhas de crianças diabéticas e não diabéticas em idade de risco para fluorose dentária, já que as unhas são biomarcadores de exposição a este íon (BUZALAF et al., 2012) e ainda estudos de associação entre diabetes e fluorose dentária em crianças. Planejamos conduzir estes estudos num futuro próximo. Ainda pretendemos conduzir estudos na tentativa de melhor compreender o(s) mecanismo(s) que leva(m) à redução da insulinemia e aumento da sensibilidade à insulina em animais diabéticos tratados com F, avaliando o efeito deste íon em diferentes pontos da via de síntese, secreção e transdução de sinal da insulina. É possível que os estudos proteômicos que serão realizados na próxima etapa deste trabalho possam colaborar para a elucidação destes mecanismos. Pretendemos ainda, em etapas

futuras, complementar os estudos proteômicos com estudos fosfoproteômicos. Assim, os resultados obtidos no presente estudo abriram-nos um campo enorme para estudos futuros.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho constatou que:

- ✓ Foi observada uma dose-resposta para as concentrações de F no plasma e no fígado, que foram significativamente maiores nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos, exceto para o grupo não tratado com F;
- ✓ A glicemia não foi alterada mediante exposição ao F, tanto para animais não diabéticos quanto para animais diabéticos, embora estes tenham apresentado glicemias significativamente mais altas que aqueles;
- ✓ Os animais diabéticos apresentaram uma insulinemia significativamente menor quando comparados aos não diabéticos. O tratamento com F não afetou a insulinemia nos animais não diabéticos, mas reduziu significativamente este parâmetro em animais diabéticos, não tendo sido observada dose-resposta;
- ✓ A velocidade de desaparecimento da glicose após estímulo insulínico (K_{ITT}) foi significativamente menor nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos, embora a diferença só tenha sido significativa para os grupos controle e tratado com 10 ppm F;
- ✓ A resistência à insulina, avaliada pelo índice HOMA2-IR, não apresentou diferenças significativas nem para os tratamentos com F nem para os animais diabéticos e não diabéticos. Entretanto, para os animais diabéticos não tratados com F este índice foi aproximadamente o dobro daquele observado para os animais não diabéticos. O tratamento dos animais diabéticos com F restaurou o índice HOMA2-IR aos valores observados para os animais não diabéticos;
- ✓ Independentemente do tratamento com F, a % de função das células β pancreáticas nos animais diabéticos foi significativamente menor que aquela observada para os animais não diabéticos;
- ✓ Quanto à % de sensibilidade à insulina, assim como para o índice HOMA2-IR, não foram encontradas diferenças significativas entre

as condições nem entre os tratamentos. As porcentagens foram bastante homogêneas para os animais não diabéticos, independentemente da exposição ao F, enquanto que para os animais diabéticos, foi observada uma tendência para aumento da porcentagem nos grupos tratados com F, principalmente para aquele tratado com 10 ppm F;

- ✓ Nos experimentos de *Western blotting*, tanto para o fígado quanto para o músculo gastrocnêmio, não foram encontradas alterações significativas no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em função do tratamento com F.

Referências

REFERÊNCIAS

Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of *In Vivo* Insulin Action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. JCEM, 1989; (68) 374-378.

Buzalaf MA. Fluoride and the oral environment. Karger, Basel, 1st ed., 2011.

Buzalaf MAR, Ramires I. Manual: Flúor e fluoretação da água de abastecimento público. Bauru, 2005. Disponível em:
<<http://143.107.25.6/FOB/Portugues/detInstitucional.php?nomTbl=institucional&codDado=25&codCategoriaMenu=232&nomArea=&PHPSESSID=ba1035ab96f060e4acf52142ffcc6dd3>> Acesso em: 08/03/2010.

Buzalaf MA, Massaro CS, Rodrigues MH, Fukushima R, Pessan JP, Whitford GM, Sampaio FC. Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. Caries Res. 2012;46(4):394-400

Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad, Ac. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-Kinase in liver and muscle of rats. Endocrinology. 1996; 151-159.

CDC-USA - Centers of Disease Control, 1999.

CDC-USA - Centers of Disease Control, 2011.

Chehoud KA, Chiba FY, Sassaki KT, Garbin CAS, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride* 2008;(41) 270-275.

Chiba FY. Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF. Dissertação de Mestrado. Unesp, Araçatuba. 2010.

Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Silva VC, Moimaz SAS, Garbin CAS, Antoniali C, Sumida DH. NaF treatment increases TNF- α and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. *J Fluorine Chem* 2012;136:3-7.

Choudhury D, Tuncel M, Levi M. Diabetic nephropathy -- a multifaceted target of new therapies. *Discov Med*, 2010; (10) 406-415.

De La Sota M, Puche R, Rigalli A, Fernandez LM, Benassati S, Boland R. Modificaciones en La massa osea y em la homeostasis de la glucosa em residentes de la zona da Bahia Blanca com alta ingesta espontânea de flúor. *Medicina*. 1997; (57)417-420.

Denbesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci*. 2011; (22) 81-96.

Dupanice AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller L, Katz BP, Warrick JM, Stooney GK. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J. Dent. Res*. 1995; (74) 358-368.

Fejerskov O, Aoba T. Dental Fluorosis: Chemistry and Biology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; (13) 155. Disponível em:
<<http://cro.sagepub.com/cgi/content/abstract/13/2/155>> Acesso em: 08/03/2010.

Fejerskov O, Manji F, Baelum V. Fluorose dentária: um manual para profissionais da saúde. 1ªEd. São Paulo: Editora Santos, 1994. 11p.

Fröjdö S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans. *Bioch Biophys Acta.* 2009; (1792) 83-92.

Garfin DE. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1990; (182) 425-441.

Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 2013; (50) 3–5.

Guyton AC, Hall J. E. Tratado de Fisiologia médica. 2006. 11ed.

Iano FG. Efeito da ingestão crônica de flúor sobre o sistema oxidante/antioxidante de ratos. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2012.

Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, Palma MS, Domont GB, Buzalaf MAR. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact* 2009; (180) 305-11.

Komorowsky CV, Brosius FC, Pennathur S, Kretzler M. Perspectives on Systems Biology Applications in Diabetic Kidney Disease. *J Cardiovasc Trans Res*, 2012; (5) 491-508.

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program (Letter). *Diabetes Care* 1998; (21) 2191-2192.

Lombarte M, Fina BL, Lupo M, Buzalaf MA, Rigalli A. Physical exercise ameliorates the toxic effect of fluoride on the insulin-glucose system. *J Endocrinol*. 2013 Jun 1;218(1):99-103.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;(15)1509-1516.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; (28)412–419.

Menoyo I, Puche RC, Rigalli A. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. *Fluoride* 2008; (41) 260-269.

Moura LP, Figueredo GA, Bertolini NO, Ceccato M, Pereira, JR, Sponton AC, de Mello MA. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. *Lipids Health Dis* 2012; 11:12.

Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2010, 2:3.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica*. 2011. 4ed

Oliveira C L, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. *Ver. Nutr.* 2004; (17) 237-245.

Passos VMA, Barreto SM, Diniz LM, Lima-Costa MF. Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community - the Bambuí health and aging study. *Sao Paulo Med. J.* [online]. 2005, vol.123, n.2 [cited 2010-05-07], pp. 66-71 . Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802005000200007&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1516-3180. doi: 10.1590/S1516-31802005000200007

Pereira HABS. Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição crônica ao flúor. Dissertação. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.

Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride

Pereira HABS, Leite AL, Charone S, Lobo JGVM, Cestari TM, Peres-Buzalaf C, Buzalaf MAR. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. *PloSOne*. 2013. Aceito para publicação.

Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcif Tissue Int*, 1990; (46) 333-338.

Schiffli HH, Binswanger U. Human urinary fluoride excretion as influenced by renal functional impairment. *Nephron*, 1980; (26) 69-72.

Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Talsali S, Barbetta G, Sherwin RS, Caprio S. Prevalence of Impaired Glucose Tolerance among Children and Adolescents with Marked Obesity. *N. Engl J. Med.* 2002; (346) 802-810.

Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane -50. *Talanta*, 1968; (15) 969-74.

Trivedi N, Mithal A, Gupta SKMM. Godbole for the Fluoride Collaborative Study Group Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. *Diabetologia*, 1993; (36) 826-828.

Viñals F, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Effects of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor: inhibition by fluoride is magnesium dependent. *Mol Cell Biochem* 1997;171:69-73,

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* Basel, Karger, 1996, 2nd ed.

Whitford GM, Biles ED, Birdsong-Whitford NL. Comparative Study of Fluoride Pharmacokinetics in Five Species. *J Dent Res*, 1991; (70) 948-951.

Whitford GM. Acute and Chronic Fluoride Toxicity. *J Dent Res*, 1992. (71) 1249-1254.

World Health Organization. 2013. Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

Anexos

ANEXO A – Carta de Aprovação Final CEEPA

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais** **CEEPA-Proc. Nº 013/2010**

Bauru, 19 de fevereiro de 2013.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que, após análise por um Relator desta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, esta Comissão, reunida no dia 18 de fevereiro de 2013 aprovou o Relatório Final, bem como a alteração do título, anteriormente denominado, "**Avaliação do Sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos, diabéticos e não diabéticos, tratados cronicamente com NaF**", para EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE DIFERENTES DOSES DE FLUORETO NA GLICEMIA, INSULINEMIA E SINAL INSULÍNICO EM TECIDO MUSCULAR E HEPÁTICO EM RATOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS, de autoria de Janete Gualiume Vaz Madureira Lobo, sob sua orientação considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>