UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIA APARECIDA PEREIRA NUNES MALVEZZI

**Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados à
resistência à insulina e na expressão de proteínas hepáticas e
musculares em camundongos NOD**

BAURU
2018

MARIA APARECIDA PEREIRA NUNES MALVEZZI

**Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados à
resistência à insulina e na expressão de proteínas hepáticas e
musculares em camundongos NOD**

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

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU

2018

M299e Malvezzi, Maria Aparecida Pereira Nunes
Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros
relacionados à resistência à insulina e na expressão
de proteínas hepáticas e musculares em
camundongos NOD / Maria Aparecida Pereira
Nunes Malvezzi. – Bauru, 2018.
85 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: a versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de 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 em Animais da FOB-USP
Protocolo nº: 021/2014
Data: 30/09/2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família,

Aos meus pais **Geraldo** (in memorian) e **Valdice**, que me deram sempre exemplos de honestidade, humildade e fé em Deus. Me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus objetivos com muita dedicação, perseverança e amor.

Ao meu esposo e companheiro André Luiz, por seu apoio, paciência, amizade, carinho e amor, sempre me incentivando e auxiliando na conquista dos meus objetivos.

A minha querida e amada filha Ariel, que mudou a minha vida com sua chegada. Hoje sou a mãe da Ariel. Filha, desejo que um dia este trabalho feito com esforço e dedicação possa ser para você motivo de orgulho e inspiração.

Aos meus irmãos, Zirlene, Jussara e Davi, sempre companheiros e amigos, acreditando e torcendo por mim, assim como eu por eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Jesus e Nossa Senhora, que me concederam força nesta jornada, saúde, luz e paciência, me permitindo mais essa conquista.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço as amigas e companheiras de laboratório Heloísa Pereira e Aline Dionísio, pela ajuda durante a pesquisa, para que eu pudesse finalizar este estudo. Aprendi muito com vocês. Estarei sempre disponível para ajudar em tudo que precisarem. Muito obrigada.

Agradeço a Universidade de São Paulo FOB/USP, aos docentes do Programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, em especial os professores de Bioquímica Dra. Marília, Dra. Ana Carolina e Dr. Rodrigo. Obrigada por todo ensinamento e incentivo.

À família Bioquímica, aos colegas e amigos de laboratório, pelas dicas, ensinamentos e sempre oportunas palavras de conforto. Todo dia é dia de aprender. Heloísa Pereira, Aline Dionísio, Isabela, Talita, Luiza, Senda, Cintia Silva, Flávia Amadeu, Juliana Pires, Tatiana, Aline Braga, Vinícius, Tamara, Juliana Trevisol, Even, João Paulo, Beatriz, Daniele Komatsu, Cintia, Daiana, Mari, Carlos, Mileni, Flávia Iano, Larissa, Thelma, Aline Leite, Flávia Levy, Poliana, Priscila Salomão, agradeço pela amizade e convívio por todos estes anos no trabalho e nos momentos de lazer. Que Deus abençoe a todos.

A toda equipe técnica do Laboratório de Bioquímica, Larissa e Aline Leite, por seu sempre muito importante auxílio no desenvolvimento deste trabalho. A técnica Thelma que sempre esteve pronta a nos auxiliar.

Aos funcionários da Biblioteca da FOB/USP, que sempre procuraram atender aos meus pedidos, especialmente o bibliotecário Roberto Amadei que sempre amavelmente sanou minhas dúvidas quando precisei.

Aos funcionários do Biotério: Luiz, Erasmo, Elias e Richard. Muito obrigada pela dedicação e zelo que têm pelos animais.

Agradeço às secretárias do departamento de Ciências Biológicas (FOB/USP), Vera Lúcia Rufino e Dalva Ribeiro de Oliveira, por me atenderem prontamente quando precisei. Obrigada Dalva por me socorrer e ter sempre uma palavra de conforto quando precisei.

Agradeço a toda equipe da secretaria de pós-graduação, que sempre me atenderam nos momentos que precisei.

A Maristela Petenuci (Comissões FOB/USP), por me atender prontamente quando precisei.

Meu agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à Prof^a.Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, a quem muito admiro por seu profissionalismo e seriedade. Muito obrigado pela orientação segura, paciência, confiança e liberdade de trabalho que me deu, pelo apoio nos momentos difíceis desta caminhada, pela amizade e contribuição à minha formação científica.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ONTEM e o outro se chama AMANHÃ, portanto HOJE é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Enquanto alguns trabalhos relatam que a administração crônica de F causa resistência à insulina, estudo recente do nosso grupo revelou que em animais com diabetes previamente induzido por estreptozotocina, a administração crônica de baixas doses de F aumenta a sensibilidade à insulina, por interferir em vias metabólicas musculares e hepáticas. Entretanto, o diabetes induzido por estreptozotocina causa alterações metabólicas diferentes do diabetes tipo 1. Desta forma, seria interessante verificar se o aumento da sensibilidade à insulina induzido por baixas doses de F também ocorreria utilizando um modelo de diabetes que mimetiza melhor o diabetes tipo 1 (camundongos NOD – non-obese diabetic). Com base no exposto, o presente estudo investigou, em camundongos NOD recém-desmamados e expostos cronicamente a doses de F na água de beber que simulam a ingestão de F pela água artificial ou naturalmente fluoretada, se ocorrem alterações relacionadas à resistência à insulina, bem como na expressão de proteínas hepáticas e musculares. Para tanto, 24 camundongos NOD (não obesos diabéticos), obtidos imediatamente após o desmame, foram divididos em 3 grupos, de acordo com a concentração de F presente na água de beber (0, 10 ou 50 ppm), que foi administrada por um período de 21 dias. Decorrido o período experimental, os animais foram eutanasiados, sendo coletado o sangue para análise de F (eletrodo íon específico), glicose (método da glicose-oxidase) e insulina (ELISA), bem como o fígado e músculo gastrocnêmio, para análise proteômica quantitativa livre de marcadores (*software Protein Linc Global Service*). Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($p < 0,05$). Apenas o grupo tratado com 50 ppm F apresentou concentração plasmática de F significativamente maior que o controle. Os animais tratados com 10 ppm F tiveram glicemia significativamente menor que o grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos em relação à insulinemia. A % de função das células β pancreáticas foi significativamente maior no grupo tratado com 10 ppm F, quando comparado aos demais. A análise proteômica revelou alterações no perfil proteômico tanto do tecido muscular quanto do hepático. No tecido muscular, o grupo de 10 ppmF apresentou, em relação ao

controle, expressão aumentada de proteínas envolvidas no metabolismo energético. Já o grupo de 50 ppm F, em relação ao controle, apresentou expressão aumentada de proteínas relacionadas à contração muscular, diferenciação do tecido adiposo marrom e apoptose. Para o tecido hepático, também foi observada expressão aumentada no grupo submetido a 10 ppm F em relação ao controle de proteínas envolvidas no metabolismo energético e síntese proteica, com destaque ainda para o aumento de isoformas de *Glutathione S transferase*, bem como de Heat shock-related 70 kDa protein 2. No grupo submetido a 50 ppmF foi observada alteração de proteínas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio e metabolismo energético. O aumento na expressão de proteínas antioxidantes, mediante tratamento com a baixa concentração de F, pode ajudar a explicar a proteção contra o desenvolvimento do diabetes, o que deve ser comprovado em estudos mecanísticos futuros.

Palavras-chave: Fluoreto. Resistência à insulina. Diabetes. Análise Proteômica.

ABSTRACT

Dose-response effect of fluoride on parameters related to insulin resistance and on the expression of liver and muscle proteins in NOD mice

While some studies report that chronic administration of fluoride (F) causes insulin resistance, a recent study in our group found that in animals with diabetes previously induced by streptozotocin diabetes, chronic low-dose F administration increases insulin sensitivity by interfering with metabolic pathways in muscle and liver. However, streptozotocin-induced diabetes causes different metabolic changes from type 1 diabetes. Thus, it would be interesting to see whether increased insulin sensitivity induced by low doses of F would also occur using a diabetes model that better mimics type 1 diabetes (NOD mice - non-obese diabetic). Based on the foregoing, the present study investigated in NOD mice chronically exposed to doses of F in drinking water that simulate the ingestion of F by artificial or naturally fluoridated water, if there are changes related to insulin resistance as well as in the expression of liver and muscle proteins. Twenty-four NOD mice, obtained immediately after weaning, were divided into three groups, according to the concentration of F present in the drinking water (0, 10 or 50 ppm), which was administered by a period of 21 days. After the experimental period, the animals were euthanized and the blood was collected for analysis of F (ion-specific electrode), glucose (glucose oxidase method) and insulin (ELISA), as well as the liver and gastrocnemius muscle, for quantitative proteomic analysis (Protein Linc Global Service software). Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test, or Kruskal-Wallis and Dunn's test ($p < 0.05$). Only the group treated with 50 ppm F had plasma F concentration significantly higher than the control group. Animals treated with 10 ppm F had significantly lower glycemia than the control group, but there was no significant difference between the groups in relation to insulinemia. The % of pancreatic β -cell function was significantly higher in the group treated with 10 ppm F compared to the others. Proteomic analysis revealed changes in the proteomic profile of both muscle and hepatic tissue. In the muscle tissue, the group of 10 ppm presented, in relation to the control, increased expression of proteins involved in energy metabolism. The group of 50 ppm F, in relation to control, presented increased expression of proteins related

to muscle contraction, differentiation of brown adipose tissue and apoptosis. For hepatic tissue, increased expression was also observed in the group of 10 ppm F in relation to the control of proteins involved in energetic metabolism and protein synthesis, with emphasis also on the increase of Glutathione S transferase isoforms as well as Heat shock-related 70 kDa protein 2. In the group treated with 50 ppm F proteins related to ROS metabolism and energetic metabolism were altered. Increased expression of antioxidant proteins by treatment with low F concentration may help explain protection against the development of diabetes, which should be demonstrated in future mechanistic studies.

Keywords: Fluoride. Insulin resistance. Diabetes. Proteomic analysis.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

% β	Função das células beta pancreáticas (% B)
% S	Sensibilidade à insulina
°C	Grau Celsius
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
μ mol/L	Micromol por litro
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Da	Dalton
kDa	Quilo Dalton
dL	Decilitro
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
F	Fluoreto
g	Grama
GLUT-4	Proteína transportadora de glicose 4
HMDS	Hexametil-disiloxano
H ₂ O ₂	Hidróxido de hidrogênio
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase-Resistência à Insulina
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
Kg	Quilograma
Kitt	velocidade de desaparecimento da glicose
L	Litro
M	Molar
mg	miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimole

MFP	Monofluorfosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
NaF	Fluoreto de sódio
NOD	Non-obese diabetic
ppm	Parte por milhão
pc	Peso corporeo
rpm	Rotação por minuto
β	Beta
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de Venn mostrando as proteínas presentes no músculo de gastrocnêmio de camundongos NOD dos grupos controle, tratado com 10 ppm F e 50 ppm F. 42
- Figura 2.** Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle..... 46
- Figura 3.** Subnetworks criadas pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no músculo do grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. 48
- Figura 4.** Diagrama de Venn mostrando as proteínas presentes no fígado de camundongos NOD dos grupos controle, tratado com 10 ppm F e 50 ppm F. 59
- Figura 5.** Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no fígado do grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle..... 61
- Figura 6.** Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no fígado do grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle..... 63
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média ($\pm$ DP) da concentração plasmática de fluoreto, glicemia, insulinemia, índice HOMA2-IR, sensibilidade à insulina (%S) e função das células β (%B) em camundongos NOD tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto ou não por 21 dias.....	41
Tabela 2.	Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD exclusivas do grupo Controle	43
Tabela 3.	Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD exclusivas do grupo 10 ppm F.....	43
Tabela 4.	Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de Camundongos NOD exclusivas do grupo 50 ppm F.....	44
Tabela 5.	Proteína identificada com alteração de expressão no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD do grupo 10 ppm F vs. Controle.....	44
Tabela 6.	Proteínas identificadas com alteração de expressão no musculo de camundongos NOD do grupo 50 ppm F vs. Controle.....	45
Tabela 7.	Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo controle.	51
Tabela 8.	Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo tratado com grupo 10 ppm F.	53
Tabela 9.	Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo tratado com 50 ppm F.	55

Tabela 10. Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos NOD do grupo tratado com 10 ppm F em comparação ao controle.....	57
--	----

Tabela 11. Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos NOD do grupo tratado com 50 ppm F em comparação ao controle.....	58
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2	PROPOSIÇÃO	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Obtenção e tratamento dos animais.....	31
3.2	Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	31
3.3	Análises e dosagens	32
3.3.1	Dosagem de glicose	32
3.3.2	Dosagem de insulina	33
3.3.3	Cálculo do índice HOMA2-IR.....	34
3.3.4	Análise de F no plasma	34
3.3.5	Análise proteômica do tecido hepático e muscular.....	35
3.3.5.1	Preparo da amostra	35
3.3.5.2	Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas.....	35
3.3.5.3	Análise dos dados através da bioinformática	36
3.4	Análise estatística.....	37
4	RESULTADOS.....	41
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO.....	85

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O fluoreto (F) é um íon que está presente como componente natural da crosta terrestre e pode ser encontrado em diferentes fontes, tais como na água de abastecimento público, estando desta forma disponível para o consumo humano e tendo efeito sistêmico. O F é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, com pico de concentração plasmática entre 20 a 60 minutos após sua ingestão. O F que não é absorvido é excretado pelas fezes e a parte absorvida pelo organismo é distribuída para os tecidos moles e duros e armazenado principalmente nos tecidos calcificados (dentes e ossos), sendo a parte não utilizada pelo organismo excretada pela urina (MAGALHÃES et al., 2017; WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2011).

A fluoretação artificial da água de abastecimento, considerada uma das dez melhores medidas de saúde pública do século XX, tem colaborado com a diminuição da ocorrência de cárie dentária em todo o mundo (CDC, 1999). Entretanto, a ingestão excessiva de F afeta o metabolismo ósseo (causando a fluorose esquelética), bem como o desenvolvimento do esmalte dentário, causando a fluorose dentária (BUZALAF, 2011). Além disso, diversos trabalhos sugerem que o F pode interferir em muitas vias metabólicas, inibindo a ação de diversas enzimas e ainda atuando sobre a via glicolítica (DE LA SOTA et al., 1997; WHITFORD, 1996). Estudos realizados com animais experimentais, em laboratório, demonstraram que a ingestão aguda ou crônica de F pode alterar a expressão proteica em tecidos ósseo, hepático, renal, intestinal e dentário, bem como na urina de ratos ou camundongos (LEITE, 2010; KOBAYASHI et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2011; KOBAYASHI, 2012; CARVALHO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; CHARONE et al., 2016; MELO et al., 2017; DIONIZIO et al., 2018). A maioria das proteínas afetadas estavam relacionadas ao metabolismo, tendo sido o metabolismo energético afetado de maneira pontual e sendo encontradas alterações, principalmente, em proteínas mitocondriais. Em adição, outros trabalhos também vêm indicando a atuação do F no estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2016; IANO et al., 2014). Estas alterações, em conjunto, poderiam estar relacionadas a mudanças no metabolismo energético, estando relacionadas ao diabetes.

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que pode ser causada por uma deficiência nas células β do pâncreas na produção de insulina (diabetes mellitus tipo 1; DM1) ou pela incapacidade da insulina em exercer suas funções adequadamente (diabetes mellitus tipo 2; DM2). O diabetes mellitus é considerado um problema de saúde pública, bastante oneroso do ponto de vista social e econômico (GEORG et al., 2005). O custo anual do diabetes, em todo o mundo, é estimado ser superior a 827 bilhões de dólares (Seuring et al., 2015), incluindo despesas com medidas preventivas e terapêuticas. Um estudo recente estimou que as perdas no PIB (Produto Interno Bruto) em todo o mundo, entre 2011 e 2030, incluindo tanto os custos diretos quanto indiretos do diabetes, chegarão a 1,7 trilhões de dólares, sendo 900 bilhões de dólares para países de alta renda e 800 bilhões de dólares para os países de baixa e média renda (BLOOM et al., 2011).

O DM está em acelerado crescimento em todo o mundo, sendo este crescimento ainda maior nos países de baixa e média renda. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde, 2016), em 2014 havia 422 milhões de diabéticos no mundo, comparado com 108 milhões em 1980, ou seja, no referido período houve um aumento na prevalência de 4,7% para 8,5% na população adulta, sendo que o diabetes causou 1,5 milhão de mortes em 2012, sendo a maioria delas (43%) de indivíduos abaixo dos 70 anos de idade. Ainda, a OMS (Organização Mundial de Saúde, 2016) estimou que o diabetes mellitus (DM) será a sétima causa de morte em 2030, devido as suas graves complicações. Assim, nos últimos anos, esta patologia tem sido considerada uma pandemia, trazendo encargos sociais e econômicos e desafiando os sistemas de saúde em todo o mundo (DE GROOT et al., 2001; PIYA et al., 2010; MATTHEWS et al., 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Em suma, o crescimento do DM é impulsionado por efeitos que combinam níveis crescentes de obesidade, sedentarismo e envelhecimento populacional (VAN DIEREN et al., 2010; OMS, 2016).

Muitos estudos realizados *in vitro* vêm mostrando uma relação do diabetes com a ingestão de F. Administrado em elevadas concentrações, o F pode provocar muitas alterações metabólicas, decorrentes da inibição da autofosforilação dos receptores de insulina, da sua atividade tirosina quinase, da inibição da via glicolítica e indução de apoptose, causando alterações no balanço energético (VIÑALS et al., 1993; OTSUKI

et al., 2005; ELLIOT et al., 2002; GOH et al., 2003; GUTIÉRREZ-SALINAS et al., 2010).

A literatura mostra diversos trabalhos que se utilizaram de animais (ratos e camundongos) como modelos experimentais para investigar a relação entre ingestão de F e a resistência à insulina. Rigalli et al. (1990) observaram que depois da aplicação de uma dose única de 40 μmol de NaF/100 g de peso corporal, por via oral, em ratas *Sprague dawley*, em jejum, os níveis plasmáticos de F variaram entre 5 e 15 μM , resultando numa queda súbita dos níveis de insulina plasmática, com consequente aumento de glicose no plasma. A insulina e a glicemia voltaram aos níveis basais normais em 4-5 horas, coincidindo com a remoção do F do plasma e dos tecidos moles. A secreção de insulina das células β das ilhotas de Langerhans isoladas e 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 (fluoreto de sódio, aproximadamente 95 ppm F) produziu uma súbita alteração da tolerância à glicose, a qual se manifestou quando os níveis de F no plasma e tecidos moles estavam elevados, isso durante o período de aumento da massa óssea. A tolerância à glicose normalizou-se quando a máxima massa óssea foi atingida e os níveis de F no plasma e tecidos moles regressaram aos níveis normais (RIGALLI et al., 1992). Também Rigalli et al. (1995) avaliaram os resultados da exposição aguda e crônica ao NaF ou ao monofluorofosfato de sódio (MFP) na homeostase da glicose em ratas *Sprague dawley*. Em seu estudo, os autores observaram que a administração oral de uma única dose de 40 μmol /100 g peso corporal de cada composto provocou aumento semelhante de glicose no plasma (até 1,8 g/l) e F difusível (até 130 $\mu\text{mol/l}$). Por outro lado, o tratamento com NaF (5 mM) por 3 meses produziu testes de tolerância à glicose anormais e aumento dos níveis de F no plasma (média de 2-12 μM), mas o tratamento com MFP não alterou a homeostase da glicose, e a dosagem de F no plasma foi sempre inferior a 2 μM . Foi constatado que a homeostase da glicose é afetada quando a concentração de F difundido em plasma excede 5 μM . Em consequência dos resultados encontrados pela observação feita no tecido pancreático, o mesmo grupo de autores sugere que o F também pode causar alterações das células β do pâncreas, produzindo uma secreção ineficiente de insulina

(RIGALLI et al. 2008). Outro estudo, um pouco mais atual, comparou o efeito da ingestão de água fluoretada no metabolismo da glicose em ratos *Sprague dawley* normais e com deficiência renal cirurgicamente produzida, que 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. Contudo, os níveis de insulina plasmática aumentaram por conta da concentração de F na água, mostrando resistência à ação da insulina (LUPO et al., 2011). Em outro estudo, os autores notaram que a aplicação de água contendo 15 ppm F (como NaF) a ratas *Sprague dawley* por 30 dias provocou resistência à insulina, mas o exercício físico (corridas diárias em esteira durante 60 minutos na velocidade de 2,25 m/min) reverteu este efeito (LOMBARTE et al., 2013). A partir destes relatos e possíveis relações entre ingestão de F e resistência à insulina, trabalhos com outros modelos experimentais vêm sendo realizados.

Leite et al. (2014) determinaram o perfil de expressão de proteínas no músculo de ratos *Wistar* machos, com 60 dias de idade, portadores de diabetes induzida por estreptozotocina e expostos a diferentes concentrações de F (0 ppm, 10 ppm ou 50 ppm) como NaF, administrado na água de beber. Observou-se que proteínas que interagem com GLUT4, como MDH (Malate dehydrogenase-cytoplasmic) e as proteínas de *stress* HSPB8 (Heat shock cognate protein) e GRP78 (Glucose-regulated protein), exibiram expressão diminuída quando os animais diabéticos foram expostos ao F. A redução dessas duas proteínas de estresse (HSPB8 e GRP78) pode indicar um aumento na resistência à insulina, o que poderia agravar o diabetes. Desta forma, os autores sugeriram que estudos futuros deveriam avaliar se os animais diabéticos tratados com F teriam um aumento na resistência à insulina, bem como quais mecanismos moleculares estariam envolvidos, uma vez que o modelo animal utilizado e a indução do diabetes pela estreptozotocina é diferente do diabetes tipo 1 em seres humanos. Corroborando esses dados, outro estudo recente (PEREIRA et al., 2016) estabeleceu uma relação entre a administração de F e o estresse oxidativo. Observou-se que o efeito do F parece ser dependente da duração, da concentração e também da idade dos animais devido à sua adaptação ao F. Os resultados sugerem que o F pode alterar a homeostase lipídica do fígado e que a maior parte das alterações dos níveis de lipídios foram observados num período anterior a 20 dias. Em síntese, as

reduções no metabolismo lipídico, induzidas pelo F, parecem estar ligadas ao estresse do retículo endoplasmático, fenômeno que é mais evidente no consumo de dieta hipercalórica. Estes dados fornecem nova compreensão sobre o mecanismo de pelo qual o F induz esteatose e dislipidemia.

Surpreendentemente, um estudo recente realizado por membros do nosso grupo (LOBO et al., 2015) revelou que, em ratos da linhagem Wistar com diabetes previamente induzido pela administração de estreptozotocina, houve um aumento da sensibilidade à insulina quando os animais foram expostos a água contendo 10 ppm F, o que equivale a concentrações encontradas na água de beber para humanos (DUNIPACE et al. 1995). A exposição dos ratos diabéticos ao F diminuiu significativamente a insulinemia, sem alteração da glicemia. A análise proteômica revelou um aumento na expressão da proteína ERpJ3 no fígado dos animais diabéticos tratados com 10 ppm F. Essa proteína está relacionada com uma melhora dos efeitos metabólicos (LOBO et al., 2015). Se estes dados forem confirmados, abrirão nova perspectiva para o tratamento de diabetes tipo 1 mediante a administração de baixas doses de F. Porém, o diabetes induzido por estreptozotocina causa alterações diferentes das observadas no diabetes tipo 1, em humanos. Logo, sugeriu-se a utilização de modelos experimentais de diabetes em roedores que simulam melhor o diabetes em humanos. Dentre estes, uso de camundongos NOD (Non-Obese diabetic) é uma boa opção, pois constitui o modelo mais estudado e utilizado para pesquisa de doença espontânea, no mundo. Estes camundongos exibem autoimunidade espontânea, que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos. A destruição autoimune é caracterizada por insulite, infiltrado leucocitário nas ilhotas pancreáticas. Os animais dessa linhagem apresentam o desenvolvimento de uma síndrome autoimune, o que causa, em poucas semanas de vida, infiltração linfomononuclear progressiva das ilhotas de Langerhans (insulite), iniciada na quinta semana de vida e provocando o desenvolvimento do quadro clínico de diabetes dependente de insulina (KIKUTANI et al., 1992).

Com base nos dados relatados principalmente nos dois estudos descritos acima, podemos observar que o F tem efeito tanto na redução do triglicerídeos no fígado (PEREIRA et al., 2016) quanto no aumento da sensibilidade a insulina, quando consumido cronicamente por animais diabéticos (LOBO et al., 2015). Sendo o

diabetes uma doença relacionada ao metabolismo de lipídios e carboidratos, este efeito benéfico do F, se confirmados os dados observados em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, abrirá uma nova perspectiva para o tratamento do diabetes, o que deve ser melhor estudado, utilizando-se um modelo animal apropriado (camundongos NOD).

Diante do que já foi relatado pela literatura, trata-se de um estudo extremamente relevante do ponto de vista de Saúde Pública, uma vez que correlaciona medidas de prevenção em Odontologia com uma doença de incidência crescente e de grande impacto sócio-econômico mundial, como é o diabetes mellitus, além da resistência periférica, obesidade, dislipidemias bem como doenças associadas, tais como insuficiência renal, pancreatite, cegueira, doença do pé diabético e outros distúrbios metabólicos (SINHA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; NEGRATO; TARZIA, 2010; CHIBA et al., 2012; LOBO, 2013; PEREIRA et al., 2016).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo geral avaliar, em camundongos NOD recém-desmamados e expostos cronicamente a doses de F na água de beber, que simulam a ingestão de F pela água artificial ou naturalmente fluoretada, se ocorrem alterações relacionadas à resistência à insulina, bem como na expressão de proteínas hepáticas e musculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e tratamento dos animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em animais da FOB (CEEPA-Proc. 021/2014, Anexo 1). Os camundongos NOD, machos, foram obtidos com 35 a 60 dias de vida, junto ao CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP. Os mesmos foram alojados no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; foram adaptados por 7 dias e tratados por um período de 21 dias mediante condição de luz, temperatura e umidade controladas. Foi fornecida a ração normocalórica (Presence), com baixo teor de F.

Foram utilizados 24 animais, divididos em 3 grupos (n=8) de acordo com o tratamento com F pela água de beber, a saber: grupo A (0 ppm de F), grupo B (10 ppm F) e grupo C (50 ppm de F).

Estas doses de F na água, que foi administrada *ad libitum*, foram selecionadas por corresponderem, em humanos, a doses de 1 ppm (concentração de F comumente encontrada em área com fluoretação artificial da água de abastecimento) e 10 ppm de F na água (concentração de F presente naturalmente na água de algumas regiões onde ocorre fluorose endêmica), respectivamente (DUNIPACE et al.,1995). Os animais de cada grupo foram mantidos em grupos de 3 por caixa.

3.2. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Para os procedimentos de eutanásia e obtenção das amostras foi utilizado Tiopental sódico (Thiopentax 3%, 5mg/100mg p.c.). Optou-se pelo uso do Thiopentax e não do Dopalen combinado com Anasedan, em razão da ação farmacodinâmica deste último que, segundo o fabricante, já promove redução dos níveis plasmáticos de insulina, bem como reduz sua secreção pelo tecido pancreático, portanto,

prejudicaria as análises, tendo em vista que no presente trabalho foi feita a dosagem de insulina (CHIBA, 2010).

Os animais (n=8 por grupo) foram anestesiados e, sob anestesia, foi exposta a cavidade peritoneal para realização da punção cardíaca que visava à coleta de sangue. As amostras de sangue foram transferidas para tubos plásticos heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 3500 rpm (4°C, 5 min). O plasma obtido foi armazenado a -20°C até o dia da quantificação da glicemia, insulinemia e fluoremia.

Em seguida à retirada de sangue, foram retiradas amostras de tecidos muscular esquelético (gastrocnêmio) e hepático, para análise proteômica (amostras armazenadas a -80°C).

3.3 Análises e dosagens

3.3.1 Dosagem de glicose

Foi realizada pelo método de glicose-oxidase. Trata-se de um método enzimático para quantificação de glicose (Katal Biotecnologia Ind. Com. Ltda. Belo Horizonte, Brasil).

Neste método a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada. O H₂O₂, em presença de peroxidase, produzirá a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, que dará origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda.

Para a dosagem de glicemia foram utilizadas microplacas de 96 poços. Foram pipetados 2,5 µL da amostra ou de padrão em cada poço (100 mg/dL) e adicionados 250 µL de reagente enzimático fornecido pelo kit. Essa solução foi bem homogeneizada e a placa colocada em banho-maria a 37°C, durante 15 minutos. Então foi feita a leitura das absorbâncias do teste e do padrão no comprimento de onda de 505 nm.

Cálculos realizados:

Glicose (mg/dL) = abs do teste / abs do padrão X 100

Fator de calibração = 100 / abs do padrão

Glicose (mg/dL) = abs do teste x fator

Glicose (mmol/L) = mg/dl x 0,0556

3.3.2 Dosagem de insulina

Foi realizada utilizando-se o kit Mouse Insulin ELISA (ALPCO- Diagnostics, Salem, NH, EUA, catalog #80- INSMS- E01, E10, version October 4, 2012), seguindo-se as instruções do fabricante.

Trata-se de uma reação imunoensaio tipo sanduíche. A microplaca foi recoberta com anticorpo monoclonal específico para insulina. Os padrões, controles e amostras foram adicionados aos poços da microplaca, com o anticorpo conjugado. A microplaca foi então incubada à temperatura ambiente, num agitador de microplaca na velocidade entre 700-900 rpm, por 2 horas. Após o término da primeira incubação, os poços foram lavados várias vezes com tampão específico de lavagem e, em seguida, secos. O substrato TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionado aos poços e a microplaca foi incubada novamente à temperatura ambiente num agitador de microplaca, na velocidade entre 700-900 rpm, por 15 minutos. Após a incubação foi adicionada a solução de *stop* e a densidade óptica foi obtida no leitor de microplacas (Synergy Mx Monochromator- Based Mult-Made, Bio-Tek Instruments, EUA) a 450 nm. A intensidade da cor gerada é diretamente proporcional à quantidade de insulina presente na amostra.

A curva de calibração foi construída com padrões contendo 0,188, 0,5, 1,25, 3,75 e 6,9 ng/mL ($R^2 = 0,987$). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

3.3.3 Cálculo do índice HOMA2-IR

A resistência à insulina (IR) foi avaliada por meio de um modelo computacional (Levy et al., 1998) utilizando o *software* HOMA Calculator v.2.2 (Diabetes Trials Unit, University of Oxford, disponível em <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/download.php>). Este modelo é baseado no modelo original (MATTHEWS et al., 1985). O *software* permite o cálculo do índice HOMA2-IR (*homeostasis model assessment 2 of insulin resistance*), bem como da sensibilidade à insulina (%S) e função das células β (%B) a partir de dados pareados de glicemia e insulinemia de jejum.

3.3.4 Análise de F no plasma

Para análise do F no plasma, foram utilizados 500 μ L do mesmo, 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 (HMDS), num volume correspondente a 15% do volume da amostra de plasma. O HMDS fora previamente aquecido até que o seu volume tivesse se 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 minutos para a evaporação do CO₂, e o volume das mesmas então foi completado para 2 mL com água deionizada, a difusão seguiu normalmente como descrita por Taves (1968), modificado por Whitford (1996).

Para a difusão, 50 μ L de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina e, por um orifício previamente feito na tampa, foi adicionado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2M, e o volume total foi ajustado para 75 μ L com água deionizada, usando-se uma pipeta automática

Gilson (10-100 μ L). 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.

3.3.5 Análise proteômica do tecido hepático e muscular

3.3.5.1 Preparo da amostra

Para extração das proteínas hepáticas e musculares, 50 mg do tecido foi transferido para um microtubo, onde foram adicionados 100 μ L de tampão de extração contendo uréia 5 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2% e ditioneína (DTT) 1%. Após 1 h de incubação em gelo, com agitação em vórtex a cada 10 min, o homogenato foi submetido à centrifugação a 8000 g, por 30 min e a 4 °C, o sobrenadante foi em seguida coletado. Após a extração, as proteínas foram quantificadas com auxílio do Kit *Quick Start Bradford* (Bio-Rad) que está baseado no método de Bradford (1976). As amostras de proteína (50 μ g) foram então transferidas para um microtubo e a estas foram adicionados 10 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e 25 μ L de RapiGest® 0,2% (Waters). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com DTT 100 mM e, então, adicionou-se iodoacetamida (IAA) 300 mM por 30 min em temperatura ambiente, para a devida alquilação das amostras. Após a alquilação, foi realizada a digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) e incubação a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, a ação da enzima foi paralisada pela adição de 5 μ L de ácido fórmico 3%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 10 min. O sobrenadante, contendo os peptídeos, foi então destinado à análise por UPLC -MS.

3.3.5.2 Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas

Todos os experimentos foram realizados no sistema nano ACQUITY UPLC (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo QTof G2 (Waters). Inicialmente foi realizada uma separação em nanoescala com o sistema UPLC nanoACQUITY equipado com uma coluna C₁₈ do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 2,1

mm×50 mm; 1,8 µm, Waters). Inicialmente a coluna foi pré-equilibrada com a fase móvel B (Acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1%) e em seguida os peptídeos foram separados por gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B, durante 70 min, com fluxo de 0,4 µL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. A análise de peptídeos trípticos foi realizada no espectrômetro de massas Xevo G2 QTof, operando no modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados através do *software ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 3.0 (Waters). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*, que foi buscado no banco de dados da espécie *Mus musculus*, obtido do catálogo do *UniProt* (Universal Protein Resource). As alterações quantitativas em níveis proteicos foram analisadas utilizando-se o *software* PLGS Expression E, de acordo com as intensidades de pico dos íons peptídicos medidos.

3.3.5.3. Análise dos dados através da bioinformática

Com o objetivo de compreender o significado biológico dos resultados quantitativos da análise proteômica, as listas de proteínas diferencialmente expressas ou exclusivas nas comparações entre os diferentes grupos experimentais foram submetidas à análise de classificação funcional. Para cada uma das comparações relevantes (10 ppm F vs. Controle e 50 ppm F vs. Controle), foi feita a anotação de Processos Biológicos Amplos do Gene Ontology (GO; 23/02/2017), utilizando o Cluego v2.2.5 + Clupedia v1.2.5 (BINDEA et al., 2009; BINDEA et al., 2013), *plugins* do Cytoscape (Version 3.5.0) (BAUER-MEHREN, 2013; MILLAN, 2013). Resumidamente, as identidades do *Uniprot* foram obtidas a partir das Tabelas de 2 a 6 e analisadas com parâmetros padrão, compreendendo um método de correção do Enriquecimento (teste hipergeométrico *right-sided*), usando-se Bonferroni, modo de análise “Função” e lista de *cluster* de genes para *Mus musculus* (10090), Códigos de Evidência “All”, especificidade de *networking* “medium” (GO levels 3 to 8), *Use GO Term Fusion*, *GO Term/Pathway Selection Cluster #1* (“2 Min #Genes; 5% Genes”) e *Kappa Score Threshold* 0.4. As *networkings* de interação proteína-proteína foram baixadas do ClusterMarker 2, versão 1.1.0, um *plugin* do Cytoscape e construídas como proposto por (MILLAN 2013) para cada uma das comparações acima descritas.

3.4 Análise estatística

Foram utilizados os *softwares* GraphPad InStat versão 3 para *Windows* e GraphPad Prism versão 4 para *Windows*. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente os dados foram verificados em relação à normalidade e homogeneidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente, para a posterior seleção do teste de análise apropriado. O nível de significância foi estabelecido em 5% em todos os casos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os dados da concentração plasmática de F, insulinemia e glicemia encontrados nos camundongos. Para a concentração plasmática de F, o teste de Kruskal Wallis encontrou diferença significativa entre os grupos (KW = 15, 806, $p = 0,004$). Embora a concentração plasmática média de F tenha sido cerca de 50% mais alta no grupo tratado com 10 ppm F, em comparação ao controle, e cerca de 100% mais alta no grupo tratado com 50 ppm F, em relação ao tratado com 10 ppm F, a única diferença significativa foi entre o grupo tratado com 50 ppm F e o controle ($p < 0,001$).

Em relação à glicemia, o teste de Kruskal-wallis revelou diferença significativa entre os grupos (KW = 8,028, $p = 0,0099$). Houve uma redução significativa na glicemia no grupo tratado com 10 ppm F em relação ao controle ($p < 0,05$), sendo que para as demais comparações não foram encontradas diferenças significativas.

Quanto à insulinemia, índice HOMA2-IR e %S não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (KW = 1,411, $p = 0,494$; KW = 1,890, $p = 0,389$ e KW = 1,856, $p = 0,395$, respectivamente). A %B foi significativamente maior no grupo tratado com 10 ppm F, quando comparado aos demais, que não diferiram significativamente entre si ($F = 6,847$, $p = 0,0093$).

Tabela 1. Média ($\pm$ DP) da concentração plasmática de fluoreto, glicemia, insulinemia, índice HOMA2-IR, sensibilidade à insulina (%S) e função das células β (%B) em camundongos NOD tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto ou não por 21 dias.

Análise	Controle	10 ppm F	50 ppm F
Concentração plasmática de F (mg/L)	0,016 $\pm$ 0,005 ^a	0,025 $\pm$ 0,007 ^{ab}	0,056 $\pm$ 0,023 ^b
Glicemia (mg/dL)	191,4 $\pm$ 16,6 ^a	141,3 $\pm$ 20,6 ^b	169,8 $\pm$ 24,5 ^{ab}
Insulinemia (ng/mL)	0,84 $\pm$ 0,12 ^a	0,99 $\pm$ 0,29 ^a	0,83 $\pm$ 0,17 ^a
HOMA2-IR	3,12 $\pm$ 0,42 ^a	3,27 $\pm$ 0,75 ^a	2,86 $\pm$ 0,28 ^a
%S	32,53 $\pm$ 4,23 ^a	31,95 $\pm$ 5,84 ^a	35,22 $\pm$ 3,06 ^a
%B	48,48 $\pm$ 11,96 ^a	89,98 $\pm$ 29,02 ^b	57,64 $\pm$ 12,71 ^a

Para cada variável, letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn para todas as variáveis, exceto para %B, onde foram utilizados ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=8$.

Em relação à análise proteômica, para o músculo gastrocnêmio, as quantidades totais de proteínas identificadas foram 56, 56 e 65 proteínas, para os grupos controle, 10 ppm F e 50 ppm F, respectivamente (Fig. 1). Em relação à análise quantitativa, 7, 10 e 17 proteínas foram identificadas exclusivamente nos grupos controle, 10 e 50 ppm F (Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente). Na comparação entre o grupo tratado com 10 ppm F, em relação ao grupo controle, apenas 1 proteína (*Beta-actin-like protein 2*) foi identificada com expressão diminuída no primeiro (Tabela 5). Já para a comparação entre o grupo tratado com 50 ppm F e o controle, 8 proteínas foram identificadas com alteração de expressão, sendo 3 isoformas de miosina e 2 isoformas de actina citoplasmática aumentadas, além de outras 3 proteínas (*Beta-enolase*, *Alpha-enolase* e *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1*), diminuídas mediante tratamento com F (Tabela 6).

Figura 1. Diagrama de Venn mostrando as proteínas presentes no músculo de gastrocnêmio de camundongos NOD dos grupos controle, tratado com 10 ppm F e 50 ppm F.

Tabela 2. Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD exclusivas do grupo Controle

Número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score
P51881	ADP/ATP translocase 2	86,87
Q3THW5	Histone H2A.V	203,45
P0C0S6	Histone H2A.Z	161,62
P31313	Homeobox protein Hox-C11	92,87
Q9Z275	Retinaldehyde-binding protein 1	127,27
O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	100,49
Q6P926	Spermatogenesis-associated protein 24	114,86

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 3. Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD exclusivas do grupo 10 ppm F

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score
Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial	66,04
Q9QZA0	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	59,84
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	58,81
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	58,81
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	411,31
P00342	L-lactate dehydrogenase C chain	411,31
Q9JK37	Myozenin-1	106,01
Q9D032	Single-stranded DNA-binding protein 3	61,42
P17751	Triosephosphate isomerase	89,09
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	76,50

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 4. Proteínas identificadas no músculo gastrocnêmio de Camundongos NOD exclusivas do grupo 50 ppm F

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score
Q9JI91	Alpha-actinin-2	77,06
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	48,29
Q9JIQ3	Diablo homolog, mitochondrial	75,00
P37913	DNA ligase 1	44,69
Q6PFE3	DNA repair and recombination protein RAD54B	44,65
Q9DBD2	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH8	52,04
Q9CRD2	ER membrane protein complex subunit 2	81,36
Q8BMP6	Golgi resident protein GCP60	60,48
P50096	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	50,39
O35066	Kinesin-like protein KIF3C	130,55
Q9CQ92	Mitochondrial fission 1 protein	52,68
Q6URW6	Myosin-14	54,89
P32848	Parvalbumin alpha	318,64
Q925I7	Platelet-derived growth factor D	103,68
A2A935	PR domain zinc finger protein 16	63,26
Q8BGH2	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	65,37
Q99LG4	Tetratricopeptide repeat protein 5	51,64

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 5. Proteína identificada com alteração de expressão no músculo gastrocnêmio de camundongos NOD do grupo 10 ppm F vs. Controle

Número de acesso Uniprot	Descrição da proteína	Score	Ratio 10 ppm F: controle
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	784.68	0,71

A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 6. Proteínas identificadas com alteração de expressão no músculo de camundongos NOD do grupo 50 ppm F vs. Controle

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score	Ratio 50 ppm F: controle
Q61879	Myosin-10	87.79	1,92
Q8VDD5	Myosin-9	88.92	1,72
O08638	Myosin-11	82.98	1,65
P60710	Actin, cytoplasmic 1	2645.07	1,12
P63260	Actin, cytoplasmic 2	2645.07	1,11
P21550	Beta-enolase	271.22	0,66
P17182	Alpha-enolase	271.22	0,63
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	305.31	0,40

As proteínas identificadas estão organizadas de acordo com o *Ratio*. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Para as comparações dos grupos tratados com 10 ppm F e 50 ppm F em relação ao controle, a classificação funcional revelou que os processos biológicos afetados foram processo de biossíntese de lactato a partir do piruvato e regulação positiva da concentração de íons de cálcio do retículo endoplasmático, respectivamente.

A Figura 2 mostra a *subnetwork* gerada pelo ClusterMarker 2 para a comparação 10 ppm F vs. Controle no músculo. Dentre as proteínas presentes nesta *network*, destacam-se aquelas envolvidas em metabolismo energético, como *Triosephosphate isomerase* (P17751), *Aconitate hydratase, mitochondrial* (Q99KI0) e *L-lactate dehydrogenase B chain* (P16125), sendo todas estas identificadas exclusivamente no grupo tratado com 10 ppm F. Estes achados indicam uma possível alteração do metabolismo energético no músculo, causado pela exposição à baixa concentração de F, o que poderia estar relacionado à redução da glicemia observada para este grupo (Tabela 1). Também está presente na *network*, com expressão diminuída no grupo de 10 ppm F em relação ao controle, a *Beta-actin-like protein 2* (Q8BFZ3). Dentre as proteínas que interagem com as identificadas no presente estudo, destacam-se aquelas envolvidas em vias de sinalização relacionadas à regulação de canais de Ca^{+2} ou K^{+} , como várias isoformas de 14-3-3, além da *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1* (P11881), *Disks large homolog 4* (Q62108), *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* (Q01097) e *Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1* (Q08460). Também foi identificada nesta *network*, interagindo

com a *Triosephosphate isomerase*, a *Ras-related protein Rab-4B*, envolvida com a translocação do GLUT4.

Figura 2. Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle no musculo. Os nodos em vermelho e verde escuro indicam proteínas exclusivas dos grupos controle e 10 ppm F, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo Cytoscape, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os nodos em vermelho e verde claro indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo de 10 ppm F em relação ao controle. Os números de acesso dos nodos vermelho escuro: Q8BFZ3-Beta-actin-like protein 2. Os números de acesso dos nodos verde escuro correspondem à: Q99KI0- Aconitate hydratase, mitochondrial;P17761-Protein Vpr;P16125-L-lactate dehydrogenase B chain.Os números de acesso dos nodos cinza correspondem à:P11881- Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1;P63101- 14-3-3 protein zeta/delta; Q01097- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B; Q3TYB3- Submitted name: Uncharacterized protein; Q64339- Ubiquitin-like protein ISG15; Q6A078- Centrosomal protein of 290 kDa;Q61767-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4; Q08460- Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1; P62259- 14-3-3 protein épsilon; Q62108- Disks large homolog 4;G3X9H5- Submitted name: Huntingtin; Q9CPU7- F-box only protein 32; Q5S006- Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2; Q923J1- Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7; Q9CQJ4- E3 ubiquitin-protein ligase RING2; Q921E6-Polycomb protein EED; Q9CQV8- 14-3-3 protein beta/alpha; Q91ZR1- Ras-related protein Rab-4B; Q64364- Tumor suppressor ARF; A2AM57- Submitted name: Inversin; P68510-14-3-3 protein eta.

A Figura 3 mostra as *subnetworks* geradas pelo ClusterMarker 2 para a comparação 50 ppm F vs. Controle no musculo. Dentre as proteínas presentes na *subnetwork A*, destacam-se proteínas estruturais, como 3 isoformas de miosina, sendo que duas delas se encontravam aumentadas e a outra foi exclusiva do grupo tratado com 50 ppm F (Fig. 3A). Ainda se encontravam aumentadas, mediante exposição ao F, duas isoformas de actina (Tabela 6), embora não estejam presentes na *subnetwork*. Em adição, uma isoforma de Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase foi reduzida, enquanto outra estava ausente mediante exposição ao F (Tabelas 6 e 2, respectivamente). Tratam-se de proteínas envolvidas na hidrólise de ATP acoplada ao transporte de Ca^{+2} do citosol para o lúmen do retículo sarcoplasmático, estando envolvidas na regulação do ciclo de contração/relaxamento muscular. Também foram identificadas, exclusivamente no grupo tratado com 50 ppm F, a *DNA ligase 1* (P37913), que sela os *Nicks* durante a duplicação do DNA, bem como a *ER membrane protein complex subunit 2* (Q9CRD2), envolvida com o dobramento de proteínas no retículo endoplasmático. Em adição, foram ainda identificadas proteínas mitocondriais, como a *Sorting and assembly machinery component 50 homolog* (Q8BGH2), exclusiva do grupo tratado com 50 ppm F, envolvida com a manutenção da estrutura das cristas mitocondriais e a montagem adequada dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e a *ADP/ATP translocase 2* (P51881), que catalisa a troca do ADP citoplasmático pelo ATP através da membrana mitocondrial interna. Chama a atenção ainda, a ativação de proteínas relacionadas à apoptose, como a *Diablo homolog, mitochondrial* (Q9JIQ3), a *Mitochondrial fission 1 protein* (Q9CQ92) e a *Tetratricopeptide repeat protein 5* (Q99LG4), todas elas identificadas exclusivamente no grupo tratado com 50 ppm F (Tabela 4). Na *subnetwork B*, destaca-se a presença da *PR domain zinc finger protein 16* (A2A935), que foi identificada exclusivamente no grupo tratado com 50 ppm F e está relacionada com a diferenciação do tecido adiposo marrom, que dissipa energia química em calor, em resposta ao excesso de frio ou de alimentação. Ainda foi identificada com exclusividade, no grupo tratado com 50 ppm F, a *Parvalbumin alpha* (P32848), que é uma proteína ligadora de Ca^{+2} , envolvida no relaxamento após a contração muscular, regulando o Ca^{+2} citosólico. Por outro lado, a *Beta-enolase* (P21550), que desempenha um papel no desenvolvimento e regeneração do músculo estriado, encontrava-se subregulada mediante exposição a 50 ppm F (Fig. 3B).

A

B

Figura 3. Subnetworks criadas pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no músculo do grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. Os nodos em vermelho e verde escuro indicam proteínas exclusivas dos grupos controle e 50 ppm F, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo Cytoscape, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os nodos em vermelho e verde claro indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo de 50 ppm F em relação ao controle. Figura 3A; Número de acesso dos nodos vermelho escuro corresponde à: P51881- ADP/ATP translocase 2. Os números de acesso nos nodos verdes escuro correspondem à: Q9CRD2- ER membrane protein complex subunit 2; Q6URW6- Myosin-14; Q8BGH2- Sorting and assembly machinery component 50 homolog; P37913- DNA ligase 1. Os números de acesso nos nodos verdes claro correspondem à: O08638- Myosin-11; Q61879- Myosin-10. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem à: Q7TNC6- Kinesin-like protein KIF26B; Q9Z2V5- Histone deacetylase 6; Q6ZWQ9- Submitted name: MCG5400; Q61767- 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4; Q9CRB9- MICOS complex subunit Mic19; Q9QWF0- Chromatin assembly factor 1 subunit A; Q921E6- Polycomb protein EED; Q9CQV8- 14-3-3 protein beta/alpha; Q9QVP4- Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform; P35438- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1; P63101- 14-3-3 protein zeta/delta; O55222- Integrin-linked protein kinase; Q01097- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B; Q9R1S0- B9 domain-containing protein 1; Q62108- Disks large homolog 4; P0CG50- Polyubiquitin-C; Q3U1F9- Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1; Q8K245- UV radiation resistance associated protein; Q925I1- Submitted name: Protocadherin-betaT; Q61625- Glutamate receptor ionotropic, delta-2; Q9QZH6- Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial; P22682- E3 ubiquitin-protein ligase CBL; Q9QXD6- Fructose-1,6-bisphosphatase 1. Figura 3B: Os números de acesso nos nodos vermelho claro correspondem à: P21550- Beta-enolase. Os números de acesso nos nodos verdes escuro correspondem à: P11087- Collagen alpha-1(I) chain; A2A935- PR domain zinc finger protein 16; P32848- Parvalbumin alpha. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem à: Q08460- Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1; G3X9H5- Submitted name: Huntingtin; Q91VL4- Submitted name: Col1a2 protein; P98063- Bone morphogenetic protein 1; P04202- Transforming growth factor beta-1; Q01149 - Collagen alpha-2(I) chain; O35253- Mothers against decapentaplegic homolog 7; P62259- 14-3-3 protein epsilon; P21274- Bone morphogenetic protein 2; Q9CPU7- F-box only protein 32; P97471- Mothers against decapentaplegic homolog 4; Q8BUN5- Mothers against decapentaplegic homolog 3; P62432- 50S ribosomal protein L11; Q00322- CCAAT/enhancer-binding protein delta; Q9Z148- Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2; P23204 - Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; O88712- C-terminal-binding protein 1; Q5DW34- Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1; P28033 - CCAAT/enhancer-binding protein beta; O70343 - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; P37238-1- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Q9D419-(this entry is obsolete, on march 1, 2003 this was deleted); Q8VHJ7- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta; P59279- Ras-related protein Rab-2B; P37238- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; P70340- Mothers against decapentaplegic homolog 1.

Quanto à análise proteômica do fígado, as quantidades totais de proteínas identificadas foram 293, 296 e 300 para os grupos controle, 10 ppm F e 50 ppm F, respectivamente. (Fig. 4). Em relação à análise quantitativa, 58, 54 e 57 proteínas foram identificadas exclusivamente nos grupos controle, 10 e 50 ppm F (Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente), com destaque para a *Glutathione S-transferase Mu 6* (O35660), identificada com exclusividade no grupo tratado com 10 ppm F. Na comparação entre o grupo tratado com 10 ppm F em relação ao grupo controle, 13 proteínas identificadas mostraram sua expressão aumentada [incluindo várias isoformas de actina e enzimas mitocondriais, e a *Glutathione S-transferase P 2* (P46425)], enquanto 7 proteínas foram identificadas com expressão reduzida (incluindo enzimas envolvidas no ciclo da uréia) no primeiro (Tabela 10). Já para a comparação entre o grupo tratado com 50 ppm F e o controle, 17 proteínas foram identificadas com aumento de expressão (incluindo enzimas antioxidantes e enzimas mitocondriais, enquanto 18 proteínas [incluindo enzimas envolvidas no ciclo da uréia e no metabolismo de lipídios, bem como a *Cytochrome P450 2 D9* (P11714)] encontravam-se diminuídas mediante o tratamento com F (Tabela 11).

Tabela 7. Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo controle.

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score
Q9CQV8	14-3-3 protein beta/alpha	181,16
P68254	14-3-3 protein theta	117,53
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	117,53
Q9DCU9	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial	172,31
P35979	60S ribosomal protein L12	271,70
P62889	60S ribosomal protein L30	219,87
Q99K10	Aconitate hydratase, mitochondrial	157,82
P97714	Alpha-1D adrenergic receptor	184,60
Q61337	Bcl2-associated agonist of cell death	163,21
Q8VC97	Beta-ureidopropionase	117,30
P48758	Carbonyl reductase [NADPH] 1	91,00
P52825	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	136,80
Q8R344	Coiled-coil domain-containing protein 12	266,54
P50172	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	166,62
Q8CIM7	Cytochrome P450 2D26	86,54
P97872	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	81,98
Q99PQ2	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM11	112,08
Q3TLP5	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 2, mitochondrial	343,94
Q6X7S9	EP300-interacting inhibitor of differentiation 2	123,87
P35413	G-protein coupled receptor 3	172,70
Q9WTP7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	68,83
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	421,82
P97328	Ketohexokinase	139,08
P11588	Major urinary protein 1	283,35
B5X0G2	Major urinary protein 17	172,94
P11591	Major urinary protein 5	283,35
P02762	Major urinary protein 6	172,94
P04938	Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	172,94
Q5SWZ9	Mitochondrial cardiolipin hydrolase	155,00
P62077	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B	292,59
Q8BPT6	Mitochondrial inner membrane protease subunit 2	200,85
Q61532	Mitogen-activated protein kinase 6	75,42
O35678	Monoglyceride lipase	100,82
E9Q5R7	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12	105,72
Q99LC3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	260,83
Q60817	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	202,45
P70670	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	208,63
Q02819	Nucleobindin-1	83,68
P97346	Nucleoredoxin	70,77
P36552	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	85,77

Q9D198	Pre-mRNA-splicing factor SYF2	160,79
Q8QZR3	Pyrethroid hydrolase Ces2a	198,65
Q6VN19	Ran-binding protein 10	113,94
Q78PY7	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	141,04
Q8VHQ2	Suppressor of cytokine signaling 7	150,90
Q6PDZ2	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C	83,72
Q9JHX2	Transcription factor Sp5	117,98
Q7TT00	Transcription factor SPT20 homolog	229,72
P68369	Tubulin alpha-1A chain	276,91
P05213	Tubulin alpha-1B chain	276,91
P68373	Tubulin alpha-1C chain	276,91
P68368	Tubulin alpha-4A chain	158,47
P35235	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	129,87
O70475	UDP-glucose 6-dehydrogenase	92,56
E9QMW4	Uncharacterized protein C16orf96 homolog	127,08
Q8BP01	Vimentin-type intermediate filament-associated coiled-coil protein	213,24
Q6P1B1	Xaa-Pro aminopeptidase 1	165,51
Q91VY9	Zinc finger protein 622	108,36

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 8. Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo tratado com grupo 10 ppm F.

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score
Q8JZV9	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	392,89
Q9JLJ2	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	123,27
Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase	485,25
Q8BWN8	Acyl-coenzyme A thioesterase 4	172,48
P46656	Adrenodoxin, mitochondrial	480,77
Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	109,86
Q9R045	Angiopoietin-related protein 2	98,28
Q9Z1P8	Angiopoietin-related protein 4	123,77
P03930	ATP synthase protein 8	386,66
P62204	Calmodulin	201,71
Q8R4H4	Carboxypeptidase A5	128,05
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	116,71
Q08024	Core-binding factor subunit beta	115,65
P07310	Creatine kinase M-type	1039,11
Q04735	Cyclin-dependent kinase 16	133,27
Q04899	Cyclin-dependent kinase 18	133,27
P30285	Cyclin-dependent kinase 4	133,27
Q9CR68	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	217,08
Q64459	Cytochrome P450 3A11	104,35
P10630	Eukaryotic initiation factor 4A-II	143,63
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	164,72
P81069	GA-binding protein subunit beta-2	191,71
O35660	Glutathione S-transferase Mu 6	127,54
Q8VCB3	Glycogen [starch] synthase, liver	226,06
Q9CYW4	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	159,09
Q99JY6	HIG1 domain family member 1B	283,8
Q9QYN3	Kallikrein-11	143,14
O70624	Myocilin	147,57
P05977	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	635,87
P09542	Myosin light chain 3	140,33
P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	2013,17
Q5SX40	Myosin-1	464,13
Q5SX39	Myosin-4	247,77
P13542	Myosin-8	317,63
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	205,48
Q91VD9	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	116,42
Q9CPP0	Nucleoplasmin-3	146,31
Q9D0W5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	73,28
Q9DBA6	Peroxisomal leader peptide-processing protease	113,98
Q9D826	Peroxisomal sarcosine oxidase	99,27

Q8VC48	Peroxisome assembly protein 12	131,75
Q99JB7	Protein amnionless	199,32
Q923M0	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 16A	222,71
Q91XF0	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	129,24
P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	81,43
Q8VCZ8	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 1	110,90
Q9EP97	Sentrin-specific protease 3	106,23
Q571E5	Serine protease 53	183,06
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	156,17
P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	427,14
P58774	Tropomyosin beta chain	445,69
Q9DAS2	UPF0573 protein C2orf70 homolog	216,77
P25688	Uricase	181,64
Q8VC12	Urocanate hydratase	116,97

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 9. Proteínas identificadas no fígado de camundongos NOD exclusivas do grupo tratado com 50 ppm F.

Número de acesso do Uniprot	Descrição de Proteínas	Score
Q9R092	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	89,85
Q9CRB3	5-hydroxyisourate hydrolase	164,72
P14115	60S ribosomal protein L27a	345,75
P07758	Alpha-1-antitrypsin 1-1	455,67
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	445,03
Q00896	Alpha-1-antitrypsin 1-3	455,67
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4	445,03
Q8C8B0	ALX homeobox protein 1	109,49
Q497K5	Arrestin domain-containing protein 5	150,47
P55096	ATP-binding cassette sub-family D member 3	114,29
Q9JJF3	Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66	131,09
Q8R015	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 5	403,77
P23589	Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial	114,66
Q9D4V3	Coiled-coil domain-containing protein 83	107,28
Q99J78	Differentially expressed in FDCP 8	123,59
Q9JIC3	DNA cross-link repair 1A protein	102,59
P20067	DNA-binding protein inhibitor ID-1	175,24
Q8CJC5	E3 ubiquitin-protein ligase NEURL3	92,44
P57776	Elongation factor 1-delta	211,77
Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	97,69
Q9D379	Epoxide hydrolase 1	106,09
P19096	Fatty acid synthase	132,87
P29391	Ferritin light chain 1	231,41
P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	130,27
Q8BW56	Glycosyltransferase-like domain-containing protein 1	215,42
Q8BY71	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	164,79
P68433	Histone H3.1	584,58
P84228	Histone H3.2	584,58
P84244	Histone H3.3	584,58
P02301	Histone H3.3C	584,58
Q8BLR9	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	218,24
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	102,8
Q9Z2K1	Keratin, type I cytoskeletal 16	82,76
Q9QWL7	Keratin, type I cytoskeletal 17	82,76
Q6IFX2	Keratin, type I cytoskeletal 42	104,15
Q8BGZ7	Keratin, type II cytoskeletal 75	96,82
Q8CCX5	Keratin-like protein KRT222	89,93
Q9D6Y7	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	283,78
P06801	NADP-dependent malic enzyme	101,48
Q8R4V1	NFAT activation molecule 1	158,18
Q9WV68	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	98,30

Q99MZ7	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	103,93
P16331	Phenylalanine-4-hydroxylase	92,76
Q9QXZ7	Photoreceptor-specific nuclear receptor	117,37
Q9DBA8	Probable imidazolonepropionase	190,01
Q8BHZ0	Protein FAM49A	127,41
P23492	Purine nucleoside phosphorylase	101,43
Q9CSU0	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	97,97
O35423	Serine--pyruvate aminotransferase, mitochondrial	104,88
Q7TME2	Sperm-associated antigen 5	128,76
O55106	Striatin	99,44
Q925K9	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6	148,96
Q9JHE6	Transcription cofactor HES-6	291,49
Q91XE8	Transmembrane protein 205	191,15
P54728	UV excision repair protein RAD23 homolog B	216,09
Q8R164	Valacyclovir hydrolase	105,17
O88384	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B	100,11

As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 10. Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos NOD do grupo tratado com 10 ppm F em comparação ao controle

Número de acesso Uniprot	Descrição da proteína	Score	Ratio 10 ppm F: controle
P68134	Actin, alpha skeletal muscle	2745,77	3,39
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1	2753,47	3,22
P62737	Actin, aortic smooth muscle	1536,21	3,00
P63268	Actin, gamma-enteric smooth muscle	1526,51	3,00
P17183	Gamma-enolase	103,14	1,52
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	529,77	1,34
P01942	Hemoglobin subunit alpha	5471,27	1,31
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	246,15	1,31
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	334,46	1,26
P11679	Keratin, type II cytoskeletal 8	459,68	1,20
P07724	Serum albumin	1390,96	1,14
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4452,94	1,08
P46425	Glutathione S-transferase P 2	3255,9	1,08
Q8C196	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	3613,09	0,93
Q63836	Selenium-binding protein 2	5498,67	0,92
P16858	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase	353,68	0,84
P16460	Argininosuccinate synthase	1324,47	0,82
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	15899,88	0,82
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	15899,88	0,80
Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	123,82	0,45

As proteínas identificadas estão organizadas de acordo com o *Ratio*. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Tabela 11. Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos NOD do grupo tratado com 50 ppm F em comparação ao controle.

Número de acesso do Uniprot	Descrição da proteína	Score	Ratio 50 ppm F: controle
Q921G7	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	180,68	2,32
P00405	Cytochrome c oxidase subunit 2	381,09	2,05
P32020	Non-specific lipid-transfer protein	75,14	1,73
P11679	Keratin, type II cytoskeletal 8	459,68	1,62
Q9WVL0	Maleylacetoacetate isomerase	281,02	1,46
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	246,15	1,36
P99024	Tubulin beta-5 chain	342,36	1,31
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	334,46	1,30
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	422,58	1,27
P68372	Tubulin beta-4B chain	451,46	1,27
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2371,96	1,26
P16015	Carbonic anhydrase 3	1180,69	1,21
Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	993,75	1,20
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4452,94	1,17
P56395	Cytochrome b5	1681,34	1,16
P52760	Ribonuclease UK114	3840,83	1,15
P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	4718,11	1,09
Q8C196	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	3613,09	0,90
P62737	Actin, aortic smooth muscle	1536,21	0,89
Q05920	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	468,79	0,88
Q8R0Y6	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	692,14	0,88
P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	373,02	0,87
P54869	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	1889,09	0,86
P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2541,83	0,86
P17563	Selenium-binding protein 1	5506,33	0,86
Q63836	Selenium-binding protein 2	5498,67	0,85
P16460	Argininosuccinate synthase	1324,47	0,79
Q99J08	SEC14-like protein 2	625,00	0,76
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	15899,88	0,75
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	15899,88	0,75
P11589	Major urinary protein 2	283,35	0,66
Q9QXE0	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	293,44	0,64
Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	123,82	0,57
Q6P3D0	U8 snoRNA-decapping enzyme	116,17	0,35
P67984	60S ribosomal protein L22	272,44	0,28
P11714	Cytochrome P450 2D9	114,78	0,27

As proteínas identificadas estão organizadas de acordo com o Ratio. A identificação é baseada no número de acesso da proteína do banco de dados do Uniprot.

Figura 4. Diagrama de Venn mostrando as proteínas presentes no fígado de camundongos NOD dos grupos controle, tratado com 10 ppm F e 50 ppm F.

Para as comparações dos grupos tratados com 10 ppm F e 50 ppm F em relação ao controle a classificação funcional revelou que os processos biológicos mais afetados em ambos os casos foram respiração celular e respiração aeróbica.

A Figura 5 mostra a *subnetwork* gerada pelo ClusterMarker 2 para a comparação 10 ppm F vs. Controle no fígado. Dentre as proteínas presentes nesta *network*, destacam-se aquelas envolvidas em metabolismo energético, como *ATP synthase subunit beta, mitochondrial* (P56480), aumentada no grupo tratado com 10 ppm F em relação ao controle, bem como a *Fructose-bisphosphate aldolase A* (P05064) e *Creatine kinase M-type* (P07310), identificadas exclusivamente no grupo tratado com 10 ppm F. Por outro lado, *Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase* (P16858) encontrava-se diminuída, e a *Aconitate hydratase, mitochondrial* (Q99KI0), bem como a *GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial* (Q9WTP7) e a *Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial* (Q9CQN1) encontravam-se ausentes quando expostas a 10 ppm F. Outro grupo de proteínas presentes nesta *subnetwork* são aquelas envolvidas com a síntese proteica. Dentre elas, *Eukaryotic initiation factor 4A-II* (P10630) foi identificada exclusivamente no grupo tratado com 10 ppm F, enquanto *Pre-mRNA-splicing factor SYF2* (Q9D198), *60S ribosomal protein L12* (P35979), *60S*

ribosomal protein L30 (P62889) e *Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha* (Q60817) encontravam-se ausentes no grupo tratado com 10 ppm F. Também estão presentes nesta *subnetwork* proteínas relacionadas à homeostasia do Ca^{+2} , como a *Calmodulin* (P62204) e a *Nucleobindin-1* (Q02819), identificadas exclusivamente nos grupos tratados com 10 ppm F e controle, respectivamente. Foi também observado um aumento na *Serum Albumin* (P07724) mediante exposição ao F. Em adição, várias isoformas de tubulinas [*Tubulin alpha-1C chain* (P68373), *Tubulin alpha-4A chain* (P68368), *Tubulin alpha-1A chain* (P68369) e *Tubulin alpha-1B chain* (P05213)] estavam ausentes mediante tratamento com 10 ppm F. Dentre as proteínas que interagem com as identificadas no presente estudo, destacam-se aquelas envolvidas em vias de sinalização relacionadas à regulação de canais de Ca^{+2} , K^{+} ou Mg^{+2} , como *Disks large homolog 4* (Q62108), *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* (Q01097) e 1 (P35438), *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7* (Q923J1), *Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1* (Q08460) e *Glutamate receptor 2* (P23819), bem como com a via canônica da Wnt (*Inversin*; A2AM57), assim como proteínas quinases [*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (Q9Z2A0), *Tyrosine-protein kinase BTK* (P35991) e *Protein kinase C epsilon type* (P16054)].

A Figura 6 mostra a *subnetwork* gerada pelo ClusterMarker 2 para a comparação 50 ppm F vs. Controle. Dentre as proteínas presentes nesta *network*, destacam-se aquelas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio, como *Superoxide dismutase [Cu-Zn]* (P082228), além da *Glutathione S-transferase Mu 1* (P10649), que se encontravam aumentadas mediante exposição ao F. Em adição, enzimas envolvidas no metabolismo energético, como *Pyruvate carboxylase, mitochondrial* (Q05920), e *Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial* (P26443), que se encontravam diminuídas no grupo tratado com F, enquanto que enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, como *Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial* (Q921G7), *Cytochrome c oxidase subunit 2* (P00405) e *ATP-synthase subunit beta, mitochondrial* (P56480), encontravam-se aumentadas mediante tratamento com F. Embora não presente na *network*, a *Cytochrome P450 2D9* (P11714; Tabela 11) encontrava-se diminuída no grupo tratado com F. Esta proteína está envolvida na oxidação de esteroides, ácidos graxos e xenobióticos, tornando-os hidrossolúveis e polares, facilitando a excreção de substâncias indesejáveis.

Figura 5. Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no fígado do grupo de 10 ppm F em relação ao grupo controle. Os nodos em vermelho e verde escuro indicam proteínas exclusivas dos grupos controle e 10 ppm F, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo Cytoscape, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os nodos em vermelho e verde claro indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo de 10 ppm F em relação ao controle. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem a: O70468- Myosin-binding protein C, cardiac-type; P24369- Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B; Q61735- Leukocyte surface antigen CD47; Q9Z2A0- 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; P35700- Peroxiredoxin-1; Q61171- Peroxiredoxin-2; O88811- Signal transducing adapter molecule 2; O88807- Peroxiredoxin-4; O89061- Delta-aminolevulinic acid dehydratase; P84244- Histone H3.3; Q921E2- Ras-related protein Rab-31; P09103- Protein disulfide-isomerase; P84228- Histone H3.2; P29391- Ferritin light chain 1; Q60864- Stress-induced-phosphoprotein 1; Q99L75- Submitted name: Heat shock protein 4; P68433- Histone H3.1; Q3UMW8- Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog; Q99PT1- Rho GDP-dissociation inhibitor 1; Q9R1S0- B9 domain-containing protein 1; A2AM57- Submitted named: Inversin; P35991- Tyrosine-protein kinase BTK; Q08460- Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1; Q8CG73- Protein phantom; Q01097- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B; Q62108- Disks large homolog 4; P35294- Ras-related protein Rab-19; P11881- Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1; Q8CH72- E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32; P23819- Glutamate receptor 2; Q8K2V6- Importin-11; Q8BP00- IQ calmodulin-binding motif-containing protein 1; P35438- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1; Q923J1- Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7; Q8QZZ8- Ras-related protein Rab-38; Q9Z0V2- Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2; Q8R0S4- Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-4; Q68FF6- ARF GTPase-activating protein GIT1; Q62277- Synaptophysin; O70589- Peripheral plasma membrane protein CASK; Q9CZ62- Centrosomal protein of 97 kDa; Q7TSH4- Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa; Q14BB9- MAP6 domain-containing protein

1;Q8CBI8- Exportin-7;P56371- Ras-related protein Rab-4A;Q6A078- Centrosomal protein of 290 kDa;Q8K3E5- Jouberin;A2APS1- Submitted name: Nephrocystin-1;A2AG06- Meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein MEIOC;Q91ZR5- Cation channel sperm-associated protein 1;P28574- Protein max;Q9Z1R2- Large proline-rich protein BAG6;P11440- Cyclin-dependent kinase 1;Q99MV5- RNA helicase Mov10l1;Q3TTP0- Testicular spindle-associated protein SHCBP1L;O35723- DnaJ homolog subfamily B member 3;Q5SW45- Meckel syndrome type 1 protein homolog;Q8CBW3- Abl interactor 1;Q5S006- Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2;Q9QY53- Nephrocystin-1;P98083-2- SHC-transforming protein 1;P59240- Nephrocystin-4;Q8BMZ5- tRNA-splicing endonuclease subunit Sen34;P47713- Cytosolic phospholipase A2;P35278- Ras-related protein Rab-5C;Q9CZE3- Ras-related protein Rab-32;P19253- 60S ribosomal protein L13a;Q61625- Glutamate receptor ionotropic, delta-2;Q8VCN5- Cystathionine gamma-lyase;P07141- Macrophage colony-stimulating factor 1;P42859- Huntingtin;P16054- Protein kinase C epsilon type;P52927- High mobility group protein HMGI-C;P04224- H-2 class II histocompatibility antigen, E-K alpha chain;P05201- Aspartate aminotransferase, cytoplasmic;Q8R317-2- Ubiquilin-1;Q3TTA7- E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B. Os números de acesso nos nodos verde claro correspondem a: P68033- Actin, alpha cardiac muscle 1;P01942- Hemoglobin subunit alpha;P07724- Serum albumin;P56480- ATP synthase subunit beta, mitochondrial;P17156- Heat shock-related 70 kDa protein 2. Os números de acesso nos nodos vermelho claro correspondem a: P02088- Hemoglobin subunit beta-1;P02089- Hemoglobin subunit beta-2;P16858- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Os números de acesso nos nodos verde escuro correspondem a: P05064- Fructose-bisphosphate aldolase A;Q5SX40- Myosin-1;P07310- Creatine kinase M-type;P09542- Myosin light chain 3;P58771- Tropomyosin alpha-1 chain;P97457- Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform ;P58774- Tropomyosin beta chain;P10630- Eukaryotic initiation factor 4A-II. Os números de acesso nos nodos vermelho escuro correspondem a: P62889- 60S ribosomal protein L30;Q9WTP7- GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial;Q9D198- Pre-mRNA-splicing factor SYF2;Q9CQN1- Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial;Q8BP01- Vimentin-type intermediate filament-associated coiled-coil protein;P70670- Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form;Q5SWZ9- Mitochondrial cardiolipin hydrolase;P05213- Tubulin alpha-1B chain;P68369- Tubulin alpha-1A chain;P68368- Tubulin alpha-4A chain ;Q02819- Nucleobindin-1;Q60817- Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha;P35979- 60S ribosomal protein L12;P68373- Tubulin alpha-1C chain;Q99KI0- Aconitate hydratase, mitochondrial.

Figura 6. Subnetwork criada pelo ClusterMark para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no fígado do grupo de 50 ppm F em relação ao grupo controle. Os nodos em vermelho e verde escuro indicam proteínas exclusivas dos grupos controle e 50 ppm F, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo Cytoscape, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os nodos em vermelho e verde claro indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo de 50 ppm F em relação ao controle. Os números de acesso nos nodos cinza correspondem a: O35963- Ras-related protein Rab-33B; Q6PHN9- Ras-related protein Rab-35; P62821- Ras-related protein Rab-1^a; P35279- Ras-related protein Rab-6^a; P63011- Ras-related protein Rab-3^a; P63001- Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Q61093- Cytochrome b-245 heavy chain; Q8CDK3- IQ and ubiquitin-like domain-containing protein; P11881- Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1; Q921E2- Ras-related protein Rab-31; P16054- Protein kinase C epsilon type; O89061- Delta-aminolevulinic acid dehydratase; Q61171- Peroxiredoxin-2; O08807- Peroxiredoxin-4; Q99L75- Submitted name: Heat shock protein 4; P35700- Peroxiredoxin 1; P09103- Protein disulfide-isomerase; Q9Z2A0- 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; Q99PT1- Rho GDP-dissociation inhibitor 1; Q3UMW8- Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog; Q60864- Stress-induced-phosphoprotein 1; Q8K2V6- Importin-11; Q8K299- Scavenger receptor class A member 5; P01942- Hemoglobin subunit alpha; P98083-2- SHC-transforming protein 1; P05201- Aspartate aminotransferase, cytoplasmic; P00687- Alpha-amylase 1; Q8K2C6- NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-5, mitochondrial; P04224- H-2 class II histocompatibility antigen, E-K alpha chain; P05064- Fructose-bisphosphate aldolase A; Q8BP00- IQ calmodulin-binding motif-containing protein 1; P07141- Macrophage colony-stimulating factor 1; P56371- Ras-related protein Rab-4A; P52927- High mobility group protein HMGI-C; Q923J1- Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7; P35991- Tyrosine-protein kinase BTK; P23819- Glutamate receptor 2; Q9QZL0- Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; Q9CZE3- Ras-related protein Rab-32; Q9R1S0- B9 domain-containing protein 1; Q08460- Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1; Q8R216- NAD-dependent protein lipoamidase sirtuin-4, mitochondrial; A2AM57- Submitted

name: Inversin; Q01097- Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B; P35282- Ras-related protein Rab-21; P35294- Ras-related protein Rab-19; Q9Z1R2- Large proline-rich protein BAG6; P11440- Cyclin-dependent kinase 1; P28574- Protein max; Q91ZR5- Cation channel sperm-associated protein 1; Q3TTP0- Testicular spindle-associated protein SHCBP1L; Q99MV5 RNA helicase Mov1011; O35723- DnaJ homolog subfamily B member 3; A2AG06- Meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein MEIOC; Q62108- Disks large homolog 4; P59240- Nephrocystin-4; Q8K3E5- Jouberin; Q8CG73- Protein fantom; Q921E6- Polycomb protein EED; Q3TTA7- E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B; Q8R0S4- Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-4; Q9Z0V2- Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2; Q5SW45- Meckel syndrome type 1 protein homolog; Q68FF6- ARF GTPase-activating protein GIT1; Q62277-Synaptophysin; A2APS1- Submitted name:Nephrocystin-1; O70589- Peripheral plasma membrane protein CASK; Q8QZZ8- Ras-related protein Rab-38; Q9QY53- Nephrocystin-1; Q6A078- Centrosomal protein of 290 kDa; P50516- V-type proton ATPase catalytic subunit A. Os números de acesso nos nodos verde claro correspondem a: P08228-Superoxide dismutase [Cu-Zn]; P10649-Glutathione S-transferase Mu 1; P56480-ATP synthase subunit beta, mitochondrial; P17156-Heat shock-related 70 kDa protein 2; P52760-2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase; P99024-Tubulin beta-5 chain; P68372-Tubulin beta-4B chain; Q9D6F9- Tubulin beta-4A chain; Os números de acesso nos nodos vermelho claro correspondem a: P47738- Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial; P02088- Hemoglobin subunit beta-1; P26443- Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial; P02089- Hemoglobin subunit beta-2; Q8C196- Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial; P67984- 60S ribosomal protein L22; Os números de acesso nos nodos verde escuro correspondem a: P97807- Fumarate hydratase, mitochondrial; P22599-Alpha-1-antitrypsin 1-2; P29391-Ferritin light chain 1; Q9D8N0-Elongation factor 1-gamma; Q8BGZ7-Keratin, type II cytoskeletal 75; P19096-Fatty acid synthase; P57776-Elongation factor 1-delta. Os números de acesso nos nodos vermelho escuro correspondem a: Q5SWZ9-Protein -Mitochondrial cardiolipin hydrolase; Q02819- Protein-Nucleobindin-1; Q99I0- Aconitate hydratase, mitochondrial; Q8BP01- Vimentin-type intermediate filament-associated coiled-coil protein; P05213- Tubulin alpha-1B chain; P47713- Cytosolic phospholipase A2; P70670- Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form; Q9CQN1- Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial; P68369- Tubulin alpha-1A chain; Q60817- Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha; P68368- Tubulin alpha-4A chain; Q9WTP7- GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial; P35979- 60S ribosomal protein L12; P68373- Tubulin alpha-1C chain; Q9D198- Pre-mRNA-splicing factor SYF2; P62077- Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B; P62889- 60S ribosomal protein L30.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em um estudo recente relatamos, pela primeira vez, que o tratamento crônico com baixa concentração de F (10 ppm - nível que simula a encontrada na água potável artificialmente fluoretada (DUNIPACE et al. 1995) aumentou a sensibilidade à insulina e causou alterações proteicas no fígado de animais com diabetes induzido por estreptozotocina. A exposição ao F reduziu significativamente a insulinemia sem alterar a glicemia, que aumentou a %S nos animais tratados com F, em comparação aos não tratados. Estes resultados são bastante interessantes, uma vez que abrem novas perspectivas para a prevenção do diabetes tipo 1 (LOBO et al., 2015). No entanto, como o diabetes induzido por estreptozotocina difere notavelmente do diabetes tipo 1 em humano (NORDQUIST et al., 2009), seria interessante usar modelos animais mais adequados, como o camundongo diabético não obeso (NOD) (MAKINO et al., 1980), que foi o foco do presente estudo.

Nos camundongos NOD, o desenvolvimento de insulite e diabetes é maior nas fêmeas. A insulite começa às 2-4 semanas nas fêmeas e às 5-7 semanas nos machos. A hiperglicemia se desenvolve em 12-30 semanas e em 30 semanas até 90-100% das fêmeas e 50-80% dos machos se tornam manifestadamente diabéticos (MULLEN, 2017). No presente estudo, utilizamos camundongos machos NOD, pois estavam mais facilmente disponíveis. Os animais foram recebidos aos 35-60 dias de idade e após 1 semana de adaptação ocorreu o início do tratamento com F, que durou 21 dias. Assim, quando os animais foram mortos tinham 9-12,6 semanas de idade e já se observou hiperglicemia, uma vez que os camundongos do controle (não tratados com F) tinham glicemia média de 191,4 mg / dL. O tratamento com 10 ppm de F reduziu significativamente a glicemia em relação ao controle, a qual não foi observada para os camundongos tratados com 50 ppm de F na água de beber (Tabela 1). Curiosamente, em nosso estudo anterior, o tratamento de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina com 10 ppm F reduziu a insulinemia, mas não alterou a glicemia (Lobo, Leite et al., 2015), o que pode ser devido ao modelo diferente utilizado (ratos com estreptozotocina induzida por diabetes no primeiro estudo versus NOD camundongos no presente estudo). Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com baixa concentração de F pode prevenir ou pelo menos retardar o início

do diabetes, mas estudos adicionais usando camundongos NOD fêmeas e tempo prolongado de tratamento com F (por exemplo, até 210 dias de vida, quando se espera que 90-100% dos camundongos fêmeas tornem-se manifestadamente diabéticos (MULLEN, 2017)) são necessários para fornecer mais evidências sobre este assunto.

Entre as proteínas presentes na sub-rede que compara o músculo de camundongos tratados com 10 ppm F versus camundongos do grupo controle (Figura 2), muitas proteínas relacionadas ao metabolismo energético foram identificadas apenas no grupo tratado com F, tais como Triosifosfato Isomerase (P17751), Aconitato hidratase mitocondrial (Q99KI0) e L-lactato desidrogenase B (P16125). Esses achados sugerem uma possível alteração no metabolismo energético do músculo, o que pode estar relacionado à redução da glicemia.

O achado mais notável do presente estudo foi o aumento significativo da %B para os animais tratados com 10 ppm de F, o que sugere que F pode ter retardado ou prevenido a lesão da células β . Menor expressão de genes associados a mecanismos de defesa antioxidantes tem sido relatada como contribuindo para a lesão de células β e para o desenvolvimento de diabetes em ratos BB. Ratos biobreeding linfopênicos (BB) espontaneamente diabéticos sub-expressaram em suas ilhotas muitos genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo membros da família da glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutases (SODs), peroxidases e peroxirredoxinas. Ratos BB também apresentaram atividade GST plasmática significativamente menor. Além disso, a administração sistêmica do antioxidante N-acetilcisteína aos ratos BB reduziu a gravidade da insulite e atrasou, mas não impediu o início do diabetes (BOGDANI et al., 2013). No presente estudo, a glutathione S-transferase Mu 6 foi encontrada exclusivamente no fígado do grupo tratado com 10 ppm F. Além disso, a superexpressão da glutathione S-transferase P2, bem como da proteína 70 kDa relacionada ao choque térmico, foi observada no grupo tratado com 10 ppm F quando comparado ao controle. Estes resultados sugerem um aumento na defesa anti-oxidante no fígado dos camundongos expostos a 10 ppm de F, o que já foi descrito em ratos tratados com 15 ppm de F (IANO et al., 2014). Estudos futuros devem avaliar se o tratamento com baixas doses de F também aumenta os níveis de anti-oxidantes nas ilhotas. Se assim for, este poderia ser um mecanismo possível pelo qual baixas doses de F previnem o diabetes tipo 1.

Finalmente, deve-se notar que, apesar dos modelos de roedores terem contribuído muito para nossa compreensão do diabetes tipo 1, as diferenças entre humanos e roedores devem ser reconhecidas na interpretação dos resultados obtidos usando modelos animais (MULLEN, 2017). Assim, antes que o F possa ser empregado para prevenir o diabetes tipo 1, são necessários mais estudos mecanísticos em animais, assim como estudos em humanos.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Embora o grupo tratado com 10 ppm F tenha apresentado concentração plasmática maior que o grupo controle, a diferença não foi significativa, já que apenas o grupo tratado com 50 ppm F teve concentração plasmática de F significativamente maior que o controle.

Os animais tratados com 10 ppm F apresentaram glicemia significativamente menor que o grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos em relação à insulinemia. A % de função das células β pancreáticas foi significativamente maior no grupo tratado com 10 ppm F em comparação aos demais.

A análise proteômica revelou alterações no perfil proteômico tanto do tecido muscular quanto do hepático. No tecido muscular, o grupo de 10 ppm apresentou, em relação ao controle, expressão aumentada de proteínas envolvidas no metabolismo energético. Já o grupo de 50 ppm F, em relação ao controle, apresentou expressão aumentada de proteínas relacionadas à contração muscular, diferenciação do tecido adiposo marrom e apoptose. Para o tecido hepático, também foi observada expressão aumentada no grupo de 10 ppm F em relação ao controle de proteínas envolvidas no metabolismo energético e síntese proteica, com destaque ainda para o aumento de isoformas de *Glutathione S transferase*, bem como de Heat shock-related 70 kDa protein 2. O aumento na expressão de proteínas antioxidantes mediante tratamento com a baixa concentração de F pode ajudar a explicar a proteção contra o desenvolvimento do diabetes, o que deve ser comprovado em estudos mecanísticos futuros.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35:S64-S71.

Bauer-Mehren A. Integration of genomic information with biological networks using Cytoscape. *Methods Mol Biol*. 2013; 1021: 37-61.

Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009; 25(8): 1091-1093.

Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*. 2013; 29(5): 661-663.

Bogdani M, Henschel AM, Kansra S, Fuller JM, Geoffrey R, Jia S, Kaldunski ML, Pavletich S, Prosser S, Chen YG, Lernmark A, Hessner MJ. Biobreeding rat islets exhibit reduced antioxidative defense and N-acetyl cysteine treatment delays type 1 diabetes. *J Endocrinol*. 2013; 216(2): 111-123.

Bloom DE, Cafiero ET, Jané-Llopis E, Abrahams-Gessel S, Bloom LR, Fathima S, et al. The global economic burden of noncommunicable diseases (Working Paper Series). Geneva: Harvard School of Public Health and World Economic Forum; 2011.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Buzalaf M. Fluoride and the Oral Environment. *Monogr Oral Sci*. Basel, Karger. 2011;p22.

Carvalho JG, Leite Ade L, Peres-Buzalaf C, Salvato F, Labate CA, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. *PLOS ONE*. 2013; 8(1):e53261.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Achievements in public health, 1900-1999: fluoridation of drinking water to prevent dental caries. *Morb Mort Wkly Rep* 1999;48(41):933-940.

Charone S, De Lima Leite A, Peres-Buzalaf C, Silva Fernandes M, Ferreira de Almeida L, Zardin Graeff MS, Cardoso de Oliveira R, Campanelli AP, Groisman S, Whitford GM, Everett ET, Buzalaf MA. Proteomics of Secretory-Stage and Maturation-Stage Enamel of Genetically Distinct Mice. *Caries Res.* 2016; 50(1): 24-31.

Chiba FY. Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF. Dissertação de mestrado. 2010. Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

Chiba FY, Garbin CAS, Sumida DH. Effect of fluoride intake on carbohydrate metabolism, glucose tolerance, and insulin signaling. *Fluoride.* 2012; 4:236-41.

De Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosom Med.* 2001;63(4):619-30.

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.

Dionizio AS, Melo CGS, Sabino-Arias IT, Ventura TMS, Leite AL, Souza SRG, Santos EX, Heubel AD, Souza JG, Perles J, Zanoni JN, Buzalaf MAR. Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: insights from proteomics and enteric innervation analysis. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 3180.

Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, Warrick JM, Stookey GK. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J. Dent. Res.* 1995; 74 (1):358-368.

Elisa Kit, Mouse Insulin, ALPCO Diagnóstics, Salem-EUA

Elliot J, Sacarpello JHB, Morgan NG. Differential effects of genistein on apoptosis induced by fluoride and pertussis toxin in human na rat pancreatic islets and RINm5F cells. *J Endocr.* 2002; 172, 137-43.

Georg A E, Duncan BB, Toscano CM, Schimidt MI, Mengue S, Duarte C, Polanczyk CA. Grupo de Trabalho de Avaliação da Campanha Nacional de Detecção de Diabetes Mellitus. *Rev. Saúde Pública.* 2005; 39:452-460

Goh EH, Neff AW. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food and Chemical Toxicology.* 2003; 41:1501-1508.

Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA, Madrigal-Santillán E, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, González-Rubio MG, Suástegui-Domínguez S, Valadez-Vega C. Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes. *Int J Mol Sci.* 2010; 11:3610-22.

Iano FG, Ferreira MC, Quaggio GB, Fernandes MS, Oliveira RC, Ximenes VF, M. A. R. Buzalaf MAR. Effects of chronic fluoride intake on the antioxidant systems of the liver and kidney in rats. *Journal of Fluorine Chemistry.* 2014; 168: 212-217.

Katal Biotecnologia Ind. Com. Ltda. Belo Horizonte, Brasil.

Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol.* 1992; 51:285-322.

Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, Palma MS, Domont GB, Buzalaf MA. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact.* 2009; 180(2):305-11.

Kobayashi CA, Leite Ade L, da Silva TL, dos Santos LD, Nogueira FC, Santos KS, de Oliveira RC, Palma MS, Domont GB, Buzalaf MA. Proteomic analysis of urine in rats chronically exposed to fluoride. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011; 25(1):8-14.

Kobayashi CA. Efeito do fluoreto no osso de camundongos com diferentes susceptibilidades genéticas à fluorose: uma análise proteômica. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, 2012.

Leite AL. Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. 2010.

Leite AL, Lobo JGVM, Pereira HABS, Fernandes MS, Martini T, Zucki F, Sumida DH, Rigalli A, Buzalaf MAR. Proteomic Analysis of Gastrocnemius Muscle in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes and Chronically Exposed to Fluoride. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106646.

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care.* 1998; 21(12): 2191-2192.

Lobo JGVM. 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 de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. 2013.

Lobo JGVM, Leite AL, Pereira HA, Fernandes MS, Peres-Buzalaf C, Sumida DH, Rigalli A, Buzalaf MA. Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. *J Dent Res*. 2015; 94(7): 990-997.

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; 218(1):99-103.

Lupo M, Buzalaf MA, Rigalli A. Effect of fluoridated water on plasma insulin levels and glucose homeostasis in rats with renal deficiency. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 140(2):198-207.

Magalhães AC, Oliveira RC, Buzalaf MAR. Fluoretos | Ingestão, Metabolismo, Toxicidade e Mecanismos de Ação. In: _____. **Bioquímica Básica e Bucal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2017. cap.18, p.193-214.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980; 29(1): 1-13.

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

Matthews DR, Matthews PC. Banting Memorial Lecture 2010[^]. Type 2 diabetes as an 'infectious' disease: is this the Black Death of the 21st century? *Diabet Med*. 2011;28(1):2-9.

Melo CGS, Perles J, Zanoni JN, Souza SRG, Santos EX, Leite AL, Heubel AD, CO ES, Souza JG, Buzalaf MAR. Enteric innervation combined with proteomics for the evaluation of the effects of chronic fluoride exposure on the duodenum of rats. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 1070.

Millan PP. Visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol*. 2013; 1021: 63-88.

Mullen Y. Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes. *Pancreas*. 2017; 46(4): 455-466.

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

Nordquist L, Sjoquist M. Improvement of insulin response in the streptozotocin model of insulin-dependent diabetes mellitus. Insulin response with and without a long-acting insulin treatment. *Animal*. 2009; 3(5): 685-689.

Organização Mundial da Saúde. Diabetes country profiles. Geneva: World Health Organization, 2016.

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

Otsuki S, Morshed SR, Chowdhury SA, Takayama F, Satoh T, Hashimoto K, Sugiyama K, Amano O, Yasui T, Yokote Y, Akahane K, Sakagami H. Possible Link between Glycolysis and Apoptosis Induced by Sodium Fluoride. *J Dent Res*. 2005. 84(10) 919-923.

Pereira HABS, Leite AL, Charone S, Lobo JG, Cestari TM, Peres-Buzalaf C, Buzalaf MA. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. *PLoS One*. 2013; 8(9):e75343.

Pereira HABS, Dionizio AS, Fernandes MS, Araujo TT, Cestari TM, Buzalaf CP, Iano FG, Buzalaf MAR. Fluoride Intensifies Hypercaloric Diet-Induced ER Oxidative Stress and Alters Lipid Metabolism. *PloS One*. 2016; 11(6):e0158121.

Piya MK, Tahrani AA, Barnett AH. Emerging Treatment Options for Type 2 Diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 2010. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03711.x. [Epub ahead of print].

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

Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone-Miner*. 1992. 16: 101-8.

Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittel-forschung*. 1995. 45:289-92.

Rigalli A, Menoyo I, Puche RC. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. *Fluoride*. 2008; 41(4): 260-9.

Seuring T, Archangelidi O, Suhrcke M. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. *Pharmacoeconomics*. 2015; 33(8): 811-831.

Sinha MD, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Taksali S, Barbetta G, Sherwin RS, Caprio S. Prevalence of Impaired Glucose Tolerance among Children and Adolescents with Marked Obesity. *N. Engl J. Med.* 2002;346:802-10.

Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta.* 1968; 15(10): 1015-1023.

Van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT, Grobbee DE, Neal B. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2010;17 Suppl 1:S3-8.

Viñals F, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochem J.* 1991; 291:615-22

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

ANEXO

Anexo A – Carta de Aprovação Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais.

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 021/2014

Bauru, 30 de setembro de 2014.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito dose-resposta do fluoreto nos parâmetros relacionados com à Insulina e glicemia, na expressão de proteínas hepáticas e musculares em camundongos NOD**, de autoria de Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira, Aline Salgado Dionizio e Aline de Lima Leite, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** *ad referendum* desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli
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: mferrenzi@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>