UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ISABELA TOMAZINI SABINO

**Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados com
a resistência à insulina em linhagens de camundongos com
diferentes suscetibilidades genéticas à fluorose**

BAURU
2015

ISABELA TOMAZINI SABINO

**Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados com
a resistência à insulina em linhagens de camundongos com
diferentes suscetibilidades genéticas à fluorose**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2015

Sabino, Isabela T
Sa13e Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados com a resistência à insulina em linhagens de camundongos com diferentes suscetibilidades genéticas à fluorose / Isabela Tomazini Sabino. – Bauru, 2015.
72 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: a versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 031/2013
Data: 20/08/2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Rosana e Marcos, que, respondendo ao chamado divino de “ser MÃE e ser PAI”, me conceberam com muito amor, me educaram, e estiveram ao meu lado em todos os momentos da vida, apoiando, incentivando e dando-me todo o suporte necessário.

Existe um sentimento que resume a importância de vocês para minha vida: o AMOR.

Amor que “puxa a orelha” nos momentos certos. Amor que ensina valores e princípios. Amor que diz “Não!”. Amor que não mede esforços para mergulhar em meus sonhos afim de torná-los realidade. Amor em forma de colo. Amor em forma de confiança. Amor sereno. Amor enérgico. Amor sem medidas. Amor sem interesse. Amor puro. Amor por amor. Amor por amar.

Obrigada mãe por todas as vezes (não foram poucas!) que me esperou na porta do biotério enquanto eu fazia os experimentos aos finais de semana. Pai, obrigada por apresentar as soluções quando achei que não houvesse alguma.

Muito obrigada por aceitarem os grandes desafios dessa missão - graça concedida por Deus - aqui na Terra. E mais ainda, por desempenharem tão brilhantemente seus devidos papéis. Por vocês, meus mais sinceros gestos de amor.

AGRADECIMENTOS

Uma das virtudes mais belas que um ser humano pode ter é reconhecer todos que direta ou indiretamente contribuíram para o que você é e/ou como você está hoje.

Agradeço primeiramente a Deus.

Ele que me deu o dom da vida. Ele que antes sequer de meus pais sonharem em ser MÃE e ser PAI já tinha um plano lindo arquitetado chamado FAMÍLIA. Deus que, com sua sabedoria, sempre me guiou nos caminhos mais belos a serem seguidos. Digo belos, por entender que apesar de existirem os obstáculos, os espinhos, as dificuldades da caminhada, Ele está comigo. E além dEle, Deus, em sua infinita bondade, colocou pessoas para estarem comigo. Cada uma com suas particularidades e importância.

Agradeço aos meus irmãos Erick e Leonardo.

Irmão é sinônimo de amor multiplicado. Nossa família é linda e completa. Obrigada, Erick. Obrigada, Léo. Obrigada por preencherem o espaço em nossa casa, em nossos corações, em nossas vidas. Obrigada por todo companheirismo, por toda cumplicidade. Obrigada por sorrirem comigo, e chorarem também. Obrigada por darem forças quando precisei. Por me incentivarem e me alegrarem. Amo vocês, meus meninos!!!

Agradeço ao meu noivo Denílson.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu” (Eclesiastes 3:1). Esse versículo diz muito sobre nosso relacionamento. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho no momento em que colocou. Obrigada por todo apoio e toda compreensão. Não foi um período fácil, nos últimos meses quantas vezes chorei em seus braços por algum experimento realizado sem sucesso, não é mesmo? Apesar de ser totalmente fora da sua área de trabalho, sempre se dispõe a me ajudar de alguma forma. Muito obrigada por caminhar comigo. Amo você!!!

Agradeço a família Tomazini Fardin, tios e primos.

Mone (Simone), Antonio Carlos, João Otávio e Luiz Eduardo. Em todas as etapas de nossas vidas vocês fazem questão de estarem presentes. Muito obrigada pela preocupação e interesse por meus projetos, por minha vida. O amor que sentem por mim é recíproco.

Agradeço minha prima Aline.

Aline, você é minha inspiração nessa vida de pós-graduanda. Obrigada por sempre querer me ajudar, dar dicas, conselhos e estar presente mesmo que de longe.

Agradeço todos os membros da minha família, que apesar de não estarem pertinho pra dar um abraço com frequência, se fazem presentes de alguma maneira. Fábio, Elaine, Lavinia, Miguel, Liliana, Luciano, Danilo, Patrícia, as pequenas Daphne e Júlia, Shirley, Altamir, Lucas, Vinicius, Vitória, Sueli, Sônia,

Sérgio, Simone, Júnior, Marcio, Matheus, Bia, Sílvia, Estevam.
Muito obrigada.

Agradeço minha madrinha Silvana, forte, linda e guerreira
e meu padrinho Sebastião, meu tio Tião.

Agradeço meus avós maternos Erci e Juracy (*in memoriam*),
que fizeram da minha infância e início de adolescência
momentos felizes e hoje são lindas lembranças em nossos corações.

Agradeço também minha avó paterna Antonia, a eterna vó
Tonha, que há um ano deixou de brilhar na Terra, mas que
deixou seu jeito puro e inocente em nossas memórias.

Agradeço meu sogro David, minha sogra Terezinha, que
com toda sabedoria, utilizam as palavras certas, nos momentos
corretos. Obrigada por me acolherem e me tratarem como filha.

Agradeço aos meus cunhados Josimari e Anderson, e seus
filhos (meus sobrinhos do coração) Gabriela, Miguel, Rafaela e
Emanuel. Família linda e abençoada.

Agradeço Samanta e Eduardo por me darem um presente
lindo, o Kaik como meu afilhado, alegria imensa. Nosso “japonês
sapeco”. Obrigada por compreenderem as vezes que não pude ir
visitá-los por motivos de trabalho e, ainda assim, estarem de uma
forma ou de outra junto comigo.

Minha companheira de laboratório e amiga Aline Dionísio.
Lí, quem poderia imaginar que nossa relação se tornaria tão
forte, não é?! Amigo é presente de Deus, e nossa missão é cuidar
desse presente com todo amor e carinho. Hoje nós sabemos que

podemos contar uma com a outra para qualquer coisa. E isso vai durar por muito, muito tempo, porque foi um presente divino. Muito obrigada por toda parceria, interesse e preocupação. Obrigada por sua amizade que vai muito além do território universitário.

Meus sinceros agradecimentos à minha amiga Beatriz. Bía, muito obrigada por todos os momentos que estivemos juntas durante o período do mestrado. Tenho certeza que, mesmo não estando mais todos os dias comigo, você torce para que meus objetivos sejam alcançados assim como torço muito por você. Você foi outro presente entregue por Deus.

Mais um dos presentinhos: Talita. Talitinha, obrigada pelas palavras de conforto e incentivo, dentro e fora da universidade. Sua voz suave acalma qualquer pessoa. Obrigada por doar seu precioso tempo para me ouvir e também por compartilhar comigo os acontecimentos da sua vida.

Mayara, minha amiga de anos, muito obrigada pela força sempre.

Natália, minha fisioterapeuta amiga, agradeço pelas horas de conversa extra aula e por ser tão dedicada em sua maravilhosa profissão que me ajuda tanto! LovePilates!

Minha grande amiga da graduação e da vida, Marina. Nina, querida, você é uma joia que ganhei. Amizade que não se desfez após a formatura. Muito obrigada por tudo.

Agradeço aos colegas de turma de graduação, em especial: Thiago e Sthefani.

Agradeço a farmácia Bauru Fórmulas, Renata Eiras e Luciana, e às amigas que fiz: Tati Franca, Carol Jorge e Renata Souza. Obrigada pela amizade de vocês.

Obrigada Ministério Universidades Renovadas, que surgiu para acalantar meu coração e trazer um sentido novo para minha vida. André Ottaviani e Guilherme Murari, vocês estarão sempre em meu coração. Mariana Esdras, agradeço por compreender minha ausência em alguns momentos e pela amizade que não se rompeu. Fernando Florêncio, não preciso dizer o quanto importante é para mim, agradeço muito por sua vida, e, por não ter desistido de me levar pra mais perto de Deus. Obrigada Grupo de Oração Arca de Noé. Agradeço por cada abraço, cada sorriso, cada momento com cada pessoa que acompanhou minha trajetória de 2013 até o momento.

Priscilla e Diego, amigos de palco, da ficção e da vida real. Muito obrigada.

À Universidade do Sagrado Coração, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos professores da graduação: muito obrigada por compartilharem todo o conhecimento de vocês. Em especial, agradeço aos professores e colegas farmacêuticos: Eliane Simionato, Silvana Coradi, Marcia Marcelino, Gilberto, Fernando Tozze, Tatiana Casoto, Karla, Claudia Salomão, Daniella Nicolielo. Ao professor, biólogo e orientador de trabalho de

conclusão de curso Paulo Weckewerth (Paulão, como é mais conhecido), obrigada por todo ensinamento transmitido.

Agradeço a Universidade de São Paulo-Faculdade de Odontologia de Bauru, aos colegas e 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 e ao professor de Farmacologia Dr. Flávio. Obrigada por todos os ensinamentos e incentivo.

À “família” Bioquímica, aos colegas de laboratório, que, sempre que podem dão dicas e ensinam algo. Todo dia é dia de aprender. Janete Lobo, obrigada por estar comigo no início do mestrado, me auxiliando com o projeto e com os primeiros experimentos. Heloisa Pereira, muito obrigada por toda ajuda com conversas, em experimentos e deixando meus dias mais doces, literalmente. Mileni Fernandes, Flavia Iano, Flavia Levy, Senda Charone, Camila Perez, Carina Melo, a experiência de vocês me auxiliou muito desde o início. Obrigada.

Meu agradecimento especial às técnicas de laboratório que estão sempre prontas a nos auxiliar. Thelma, logo que eu cheguei na Bioquímica, foi a primeira pessoa que tive maior contato, muito obrigada. Larissa, agradeço por todos os ensinamentos compartilhados e por toda ajuda com os experimentos.

Aline Leite, lembro-me do dia em que me perguntou: “Você tem certeza que quer fazer o mestrado?”, confesso que naquele dia não tinha certeza, não. Mas hoje posso te dizer que fiz a escolha certa. Obrigada por ensinar desde o “B-A-BÁ” do laboratório de

bioquímica até os experimentos mais complexos. Além da inteligência, seu esforço e dedicação servem de inspiração.

Claúdio Buzalaf, agradeço imensamente a Deus por ter colocado você em nossos caminhos. E agradeço você por todas as oportunidades que proporcionou à mim e à minha família. Se hoje estou concluindo esta etapa, foi porque lá no início, teve um “empurrão” seu. Obrigada por me apresentar à querida Professora e orientadora Marília.

Tatiana Martiní, companheira de biotério, laboratório e de longas conversas fora da universidade, muito obrigada. Torço demais por você.

Aos funcionários do biotério: Luís, Erasmo, Elías e Richard. Muito obrigada pela dedicação e zelo que vocês tem pelos animais e bem estar deles. Obrigada também por sempre serem prestativos durante a etapa de experimento com os animais.

Agradeço a Vera Lucia Rufino e Dalva Ribeiro de Oliveira, secretárias do departamento de Ciências Biológicas (FOB/USP) e Maristela Petenuci Ferrari (Comissões FOB/USP), por me atenderem prontamente quando precisei.

Meu agradecimento à FAPESP, pela aprovação e auxílio financeiro desde a Iniciação Científica até hoje com o trabalho de Mestrado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Profª e Orientadora Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Marília, sou muito feliz por te ter como minha orientadora. Não tenho palavras para agradecer o que fez por mim desde que coloquei os pés na Faculdade de Odontologia de Bauru. Sinônimo de dedicação, cuidado, esforço e muita, muita, muita sabedoria. Sua empolgação com os projetos em andamento e/ou em projetos futuros é o que me motiva. Muito obrigada por estar sempre com a porta da sua sala e coração abertos, para me receber, incentivar e animar quando algo dá errado. Obrigada por todos os ensinamentos. Obrigada por ser profissional e ao mesmo tempo família. Agradeço a Deus por sua vida e a você por ter aceito o dom e os desafios que Ele te deu.

“Ama e faz o que quiseses. Se calares, calarás com amor; se gritares, gritarás com amor; se corrigires, corrigirás com amor; se perdoares, perdoarás com amor. Se tiveres o amor enraizado em ti, nenhuma coisa senão o amor serão os teus frutos.”

Santo Agostinho

RESUMO

O íon fluoreto (F) provém do elemento flúor. Sua absorção é inversamente relacionada ao pH e ocorre rapidamente no estômago e posteriormente no intestino delgado. Após sua absorção, o F é distribuído pelos tecidos através da corrente sanguínea e armazenado nos tecidos calcificados e moles. Sua excreção acontece por via renal. Trata-se de um elemento relevante em termos de Saúde Pública, devido às suas propriedades de prevenir ou reverter lesões cariosas em indivíduos de todas as idades. No entanto, sua ingestão excessiva é capaz de afetar o metabolismo ósseo e desenvolvimento do esmalte dentário. Estudos sugerem que o F pode interferir em vias metabólicas, inibindo a ação de diversas enzimas. Entretanto, a literatura é conflitante em relação aos seus efeitos na homeostasia da glicose, o que poderia, talvez, ser explicado pela diferença genética entre as linhagens utilizadas. Sabe-se que camundongos da linhagem A/J são extremamente sensíveis aos efeitos do F, enquanto que os camundongos da linhagem 129P3/J são altamente resistentes ao tratamento com esse íon. Por este motivo, foi investigado se esses animais que sabidamente apresentam uma expressão proteica diferencial em função do F devido ao seu *background* genético apresentam também respostas diferentes em parâmetros bioquímicos (glicemia jejum, insulinemia, índice de resistência à insulina [HOMA2-IR] e teste de tolerância à insulina) e imunológicos (TNF- α). Após aprovação da Comissão de ética, 156 animais (78 da linhagem A/J e 78 da linhagem 129P3/J) foram divididos em 3 grupos para cada linhagem, e tratados por um período de 42 dias com doses de 0, 15 ou 50 ppm de F na água e ração com baixo teor de F. Após o término do tratamento, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção de amostras de sangue. Os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios e testes de Tukey e Sidak para comparações individuais ($p < 0,05$). Para a glicemia, os animais A/J que receberam água sem F e com a dose de 15 ppm F tiveram glicemia significativamente mais alta que os animais 129P3/J que receberam o mesmo tratamento. Para as dosagens de insulina no plasma, houve diferença significativa apenas entre os camundongos A/J 0 ppm F e 50 ppm F, sendo mais baixa a insulinemia para os animais tratados. O índice HOMA2-IR mostrou diferença significativa somente entre os animais da linhagem A/J, sendo que o grupo que recebeu água contendo 50 ppm F apresentou valores menores quando comparado para os grupos 0 ppm F e 15 ppm F. Quanto ao TNF- α , não foi observada diferença significativa entre as linhagens e entre os tratamentos. Entretanto, houve uma tendência para seu aumento nos grupos tratados com água contendo 15 ppm F nas duas linhagens. Para o teste de tolerância à insulina,

também não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens, nem entre os tratamentos. Levando em consideração os resultados, percebe-se que as diferentes concentrações de F alteram os resultados para os parâmetros analisados, e, as linhagens respondem diferentemente a essas alterações. No entanto, é necessário que se analisem outras variáveis para que esse assunto seja melhor elucidado.

Palavras-chave: Fluoreto. Resistência à insulina. Suscetibilidade genética.

ABSTRACT

Dose-response effect of fluoride in parameters related to insulin resistance in mice strains with different genetic susceptibilities to fluorosis

Fluoride (F) comes from the element fluorine. Its absorption is inversely related to the pH and occurs quickly in the stomach and later in the small intestine. After absorption, F is distributed to the tissues through the bloodstream and stored in calcified and soft tissues. Excretion occurs via the kidneys. It is an important element in terms of public health, due to its properties to prevent or reverse caries in individuals of all ages. However, its excessive intake can affect bone metabolism and the development of tooth enamel. Studies suggest that F can interfere with metabolic pathways, by inhibiting the action of several enzymes. However, there is contradiction in the literature regarding its effects on glucose homeostasis, which could possibly be explained by genetic differences between the strains used. A/J mice are extremely sensitive to the effects of F, whereas 129P3/J mice are highly resistant to treatment with this ion. For this reason, it was investigated whether these animals which are known to exhibit differential protein expression upon exposure to F due to their genetic background also exhibit distinct responses in biochemical (fasting glucose, insulin, insulin resistance index [HOMA2-IR] and insulin tolerance test) and immune (TNF- α) parameters. After approval by the Ethics Committee, 156 animals (78 of A/J strain and 78 of 129P3/J strain) were obtained, divided into 3 groups for each strain and treated for a period of 42 days with 0, 15 or 50 ppm F in the drinking water. They received low-F diet. After treatment, the mice were euthanized and blood samples were obtained. Data were analyzed by 2-way ANOVA and Tukey and Sidak tests for individual comparisons ($p < 0.05$). For blood glucose analysis, A/J mice treated with water containing no F containing 15 ppm F had significantly higher levels of glucose than 129P3/J animals receiving the same treatment. For plasma insulin, there was significant difference only between A/J mice treated with no F and 50 ppm F, with lower values for the treated animals. HOMA2-IR index showed a significant difference only between A/J animals, where the group received water containing 50 ppm F had lower values when compared to those receiving water containing no F or 15 ppm F. Regarding TNF- α , no significant differences were observed between the strains or among the treatments. However, there was a trend towards an increase in the groups treated with water containing 15 ppm F for both strains. For insulin tolerance test, also no significant differences

between the strains or among treatments were observed. The results suggest that the different F concentrations alter the results of the parameters analyzed, and the strains respond differently to these changes. However, it is necessary to analyze other variables in order to better elucidate these findings.

Key words: Fluoride. Insulin resistance. Genetic Predisposition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Esquema geral metabolismo do F, quando ingerido.....	23
Figura 2 -	As vias de sinalização insulínica.....	27
Figura 3 -	Delineamento experimental.....	37
Figura 4 -	Esquema da análise de fluoreto no plasma.....	39
Figura 5 -	Análise de glicemia.....	41
Figura 6 -	Análise de insulinemia.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Preparação dos padrões para dosagem da glicemia.....	40
Tabela 2 -	Massa média no início do tratamento (g, $\pm$ DP) dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	47
Tabela 3 -	Massa média ao fim do tratamento (g, $\pm$ DP) dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	48
Tabela 4 -	Concentração plasmática média (mg/L, $\pm$ DP) de F em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	49
Tabela 5 -	Glicemia média (mg/dL, $\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	49
Tabela 6 -	Insulinemia média (pmol/L, $\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	50
Tabela 7 -	Índice HOMA2-IR médio ($\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias.....	50
Tabela 8 -	Função média ($\pm$ DP) das células β pancreáticas (%B) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias.....	51
Tabela 9 -	Sensibilidade à insulina (%S) média ($\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias.....	51
Tabela 10 -	Velocidade média ($\pm$ DP) de desaparecimento da glicose (Kitt, % por minuto) sanguínea ao longo do tempo, em função da administração de insulina (0,75 U/Kg peso corporal) em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.....	52
Tabela 11 -	Concentração plasmática média de TNF- α (pg/mL, $\pm$ DP) em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias.....	56

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

% β	Função das células beta pancreáticas
%S	Sensibilidade à insulina
°C	Grau Celsius
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
AlF ₃	Fluoreto de Alumínio
APKC	Proteína quinase C atípica
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
dL	Decilitro
DM1	Diabetes melito tipo 1
DM2	Diabetes melito tipo 2
F	Fluoreto
g	Grama
GLUT-4	Proteína transportadora de glicose 4
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
HF	Ácido fluorídrico
HMDS	Hexametil-disiloxano
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS2	Substrato do receptor de insulina 2
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
kg	Quilograma
Kitt	velocidade de desaparecimento da glicose
L	Litro
M	Molar
m	Metro
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MFP	Monofluorfosfato

mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
PDK	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PKB	Proteína quinase B
pmol	Picomol
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotação por minuto
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	21
2	PROPOSIÇÃO	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	37
3.2	EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	38
3.3	ANÁLISE DE FLUORETO NO PLASMA	38
3.4	DOSAGEM DA GLICEMIA	40
3.5	INSULINEMIA E CÁLCULO DO ÍNDICE HOMA-IR	41
3.6	TNF- α	42
3.7	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	43
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	PESO CORPORAL (g)	47
4.2	CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO NO PLASMA	48
4.3	GLICEMIA, INSULINEMIA E ÍNDICE HOMA-IR	49
4.4	ITT	52
4.5	TNF- α	55
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Sabe-se que o íon fluoreto (F) provém do elemento flúor, que é considerado um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, encontrado naturalmente na água e no solo (RAMIRES; BUZALAF, 2008). No entanto, nunca ocorre em seu estado puro, ou seja, sempre está combinado a outro elemento (BHATNAGAR; DHAR, 2009), formando, por exemplo, fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de alumínio (AlF₃).

Após a ingestão do F, sua absorção acontece rapidamente. Por se tratar de um elemento que tem alta afinidade por íons hidrogênio, é absorvido com maior eficiência em soluções ácidas, neste caso, na região estomacal, onde se faz presente na forma de ácido fluorídrico (HF). Parte do F que não é absorvido no estômago será absorvida no intestino, mas neste caso acredita-se que a absorção seja na forma iônica (e não como HF), passando entre as células da mucosa intestinal. Uma vez absorvido, o F é distribuído pelos tecidos através da corrente sanguínea e armazenado principalmente nos tecidos calcificados, e também nos tecidos moles, em menor extensão. A excreção do F absorvido acontece essencialmente por via renal (Figura1) (WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2011).

Figura 1 – Esquema geral metabolismo do F, quando ingerido (BUZALAF, 2011)

Após a descoberta da relação entre o F e sua interferência no processo de formação da cárie dentária, seu uso tem contribuído com a diminuição da incidência da doença em todo o mundo. A fluoretação das águas de abastecimento é reconhecida como uma das 10 melhores medidas de saúde pública do século XX, no sentido de promover a prevenção da cárie (CDC, 1999). Entretanto, apesar de seus benefícios, a ingestão excessiva do F é capaz de afetar o metabolismo ósseo (causando a fluorose óssea ou 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 (WHITFORD, 1996). Estudos *in vivo* com animais demonstraram que a ingestão aguda ou crônica de F pode alterar a expressão proteica em tecidos hepático e renal de ratos ou camundongos (CARVALHO et al., 2013; LEITE, 2010; PEREIRA, 2011; KOBAYASHI et al., 2011).

Desde a década de 1940 tem sido relatado que o F seria capaz de elevar a glicemia em coelhos e ratos e ainda que a intoxicação pelo F seria acompanhada de depleção de glicogênio hepática e muscular. Foi reportado também um aumento significativo de lactato no sangue e que a administração de insulina foi capaz de prevenir as alterações do lactato sanguíneo e glicogênio muscular, mas não preveniu a hiperglicemia e diminuição do glicogênio hepático (MCGOWN; SUTTIE, 1977).

A insulina é um hormônio proteico, de baixo peso molecular (5.508 Da), constituído por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, que, quando são rompidas, levam à perda da atividade funcional da molécula. O hormônio é sintetizado pelas células β pancreáticas pelo mecanismo celular comum de síntese proteica. O RNAm é traduzido pelos ribossomos do retículo endoplasmático, formando um pré-pró-hormônio insulínico, que sofre um processo de clivagem formando a pró-insulina. Por sua vez, a pró-insulina passa por nova clivagem tornando-se então uma insulina ativa (GUYTON & HALL, 2006). A insulina é responsável por regular a homeostase da glicose em vários níveis, reduzindo sua produção no fígado e aumentando a captação periférica principalmente em tecidos muscular e adiposo. É responsável também por estimular a lipogênese no fígado e adipócitos, reduzir lipólise, aumentar a síntese e inibir a degradação proteica (CAVALHEIRA et al., 2002).

O diabetes é um estado patológico resultante da deficiência na produção (tipo 1, DM1) ou na ação (tipo 2, DM2) da insulina. É considerado um problema de saúde pública mundial, crescente e oneroso do ponto de vista social e econômico e com potencial reconhecido para

prevenção (GEORG et al., 2005). Está entre as dez principais causas de óbito no mundo, com maior prevalência em países em desenvolvimento. Estimou-se um aumento de prevalência da doença de 4,9 milhões para aproximadamente 11,6 milhões de casos até o ano de 2025 na população adulta (PASSOS et al., 2005). Hoje, a estimativa de indivíduos diabéticos no mundo, para a Sociedade Brasileira de Diabetes, é de aproximadamente 280.276.444, sendo 12.054.827 brasileiros (dado baseado no Censo IBGE 2010).

Além de afetar os rins, olhos, vasos sanguíneos e coração, o diabetes pode propiciar a ocorrência de periodontites, que são infecções crônicas que afetam a gengiva e os ossos que suportam os dentes (NEGRATO; TARZIA, 2010). A resistência à insulina no tecido e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum parecem ser os primeiros sinais para o desenvolvimento do DM2, sendo que provavelmente existe relação do aumento da prevalência de obesidade infantil e hiperinsulinemia com o desenvolvimento desta doença (OLIVEIRA et al., 2004; SINHA et al., 2002).

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

Diversos estudos *in vitro* demonstraram que o F, administrado em concentrações elevadas, pode induzir diversas alterações metabólicas, decorrentes da inibição da autofosforilação dos receptores de insulina e da sua atividade tirosina quinase, inibição da via glicolítica, indução de apoptose, causando alterações no balanço energético (VIÑALS et al., 1993; OTSUKI et al., 2005; ELLIOT et al., 2002; GOH; NEFF, 2003; GUTIÉRREZ-SALINAS et al., 2010).

Há vários trabalhos em animais investigando a relação entre ingestão de F e resistência à insulina. Rigalli et al. (1990) observaram que após a administração de uma única dose de 40 μmol de NaF/100 g de peso corporal por via oral a ratas *Sprague dawley* em jejum, produzindo níveis plasmáticos de F variando entre 5 e 15 μM , houve uma queda imediata nos níveis plasmáticos de insulina, com consequente aumento da glicemia. A insulina e a glicemia retornaram aos níveis basais normais em 4-5 horas, coincidindo com a remoção do F do plasma e tecidos moles. A secreção de insulina de ilhotas de Langerhans isoladas, perfundidas

com soluções contendo 5, 10 ou 20 μM F, foi significativamente inibida em função dos níveis aumentados de F, tanto com concentrações basais quanto com concentrações estimulatórias de glicose. O mesmo grupo de pesquisa observou que o tratamento de ratas recém-desmamadas por 100 dias com água contendo 5 mM de NaF (aproximadamente 95 ppm F) produziu um súbito distúrbio da tolerância à glicose, o qual se manifestou quando os níveis de F no plasma e tecidos moles estavam elevados, durante o período de aumento da massa óssea. A tolerância à glicose normalizou-se quando a máxima massa óssea foi atingida e os níveis de F no plasma e tecidos moles retornaram aos valores normais (RIGALLI et al., 1992).

Em doses bem maiores de exposição ao F (10 mM NaF, ou cerca de 4,5 mM F) foi observada inibição da auto fosforilação dos receptores de insulina da sua atividade tirosina quinase no músculo estriado de ratos e da placenta humana (VIÑALS et al., 1993).

Rigalli et al. (1995) compararam os efeitos agudo e crônico da exposição ao fluoreto de sódio (NaF) ou monofluorofosfato de sódio (MFP) na homeostase da glicose em ratas *Sprague Dawley*. A administração oral de uma única dose de 40 $\mu\text{mol}/100$ g peso corporal de cada composto produziu aumento similar de glicose plasmática (até 1,8 g/l) e F difusível (até 130 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Por outro lado, o tratamento com NaF (5 mM) por 3 meses resultou em 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 . Os autores relataram que a homeostase da glicose é afetada quando a concentração de F difundido em plasma excede 5 μM . Em razão dos resultados obtidos pela análise do tecido pancreático, o mesmo grupo de autores sugere que o F também causa disfunção das células beta do tecido hepático, gerando uma secreção ineficiente de insulina (RIGALLI et al., 2008). Um estudo mais recente 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. Entretanto, os níveis de insulina plasmáticos aumentaram em função da concentração de F na água, demonstrando resistência à ação da insulina (LUPO et al., 2011). Lombarte et al. (2013) observaram que a administração de água contendo 15 ppm F (como NaF) a ratas *Sprague Dawley* por 30 dias causou resistência à insulina, mas o exercício físico (corridas diárias em esteira durante 60 minutos na velocidade de 2,25 m/min) reverteu este efeito.

Para que se possa entender o possível mecanismo pelo qual a administração de F poderia levar à resistência à insulina, é importante que se compreenda o mecanismo de transdução de sinal da insulina, que ocorre quando o hormônio se liga a receptores enzimáticos transmembrana. Nesta ocasião, ocorre a ativação da proteína tirosina quinase na porção citosólica do receptor, havendo então auto fosforilação de resíduos de tirosina na mesma região, os quais, uma vez fosforilados, recrutam e fosforilam diversas moléculas (substratos) como IRS1 e IRS2, que são as principais responsáveis pelo acoplamento de PI3K-PKB (fosfatidil inositol 3 quinase – proteína quinase B) e MAPK (proteína quinase ativadas por mitógeno) (LEHNINGER et al., 2002). A Figura 2 ilustra as vias de sinalização insulínica. Defeitos no processo de ativação das enzimas sinalizadoras de insulina, como IRS1/2, PI3K e na sequência da cascata (PDK, PKB e seus alvos GSK-3, APKCs, e família das proteínas MAPK), bem como no receptor de insulina, têm sido descritos nos estudos em músculo e tecido adiposo e em casos de obesidade e diabetes tipo 2 (DM2), como responsáveis pela resistência periférica à insulina (FRÖJDÖ et al., 2009).

Figura 2. As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se auto fosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares com as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CHIBA, 2010, modificado de CARVALHEIRA et al., 2002).

Chehoud et al. (2008), conduziram estudo no sentido de se verificar se era plausível a hipótese de que em animais tratados de forma aguda com NaF poderia haver alteração na cascata de sinalização insulínica, em especial na pp185 (IRS1/IRS2). Foi observado que após tratamento agudo com F (1 mg/Kg peso corporal) 30 minutos antes do sacrifício dos animais,

apesar do NaF induzir a hiperglicemia, indicando, portanto, que houve interferência na homeostase da glicose, não houve alteração na sensibilidade à insulina. Entretanto, os autores relatam que deve ser considerado que outros substratos insulínicos podem estar envolvidos na homeostase da glicemia.

Uma vez que os resultados do tratamento agudo por NaF não alteraram a fosforilação em tirosina da pp185, Chiba et al. (2012) procederam com um tratamento crônico por NaF, em ratos *Wistar* machos, durante 42 dias, submetendo os animais à dose diária de 4,0 mg F/Kg peso corporal, a fim de se caracterizar o efeito do NaF sobre a sensibilidade à insulina, grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185, IRS1/IRS2), fluoremia, glicemia e insulinemia. Os autores observaram aumento significativo na fluoremia, diminuição da sensibilidade à insulina, redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em tecido muscular após estímulo insulínico, sendo que não houve alteração em relação à glicemia e insulinemia e, fosforilação em tirosina da pp185 em tecido hepático. Entretanto, a dose diária de exposição ao F no estudo de Chiba et al. (2012) foi alta. Em virtude disto, foi investigado recentemente por nosso grupo de pesquisa se a administração de doses crônicas de F associadas àquelas equivalentes em humanos que recebam níveis ótimos de F através da água artificialmente fluoretada ou níveis aumentados através da água naturalmente fluoretada (em torno de 5 ppm) também seria capaz de alterar estes parâmetros em ratos *Wistar* machos, normais ou com diabetes induzido por estreptozotocina (LOBO, 2013). Os resultados foram diferentes daqueles descritos pelos grupos de Rigalli e Chiba. O tratamento crônico com NaF na água (5 ou 50 ppm F), não causou aumento significativo na glicemia, nem nas concentrações plasmáticas de insulina em ratos não diabéticos (LOBO, 2013). Entretanto, nos animais diabéticos, a exposição à concentração mais baixa de F aumentou a sensibilidade à insulina (LOBO et al., 2015).

Esses resultados discrepantes talvez possam ser explicados pela diferença entre as linhagens que foram utilizadas pelos grupos de pesquisa distintos. Nos trabalhos do grupo de Rigalli em que se observou alteração na glicemia em função do tratamento com F foram tratadas ratas da linhagem *Sprague dawley*, ao passo que nosso grupo de pesquisa trabalhou com ratos da linhagem *Rattus norvegicus* (*Wistar*). Outra peculiaridade diz respeito à dosagem de F ministrada. A maioria dos trabalhos existentes na literatura utilizou doses de fluoreto agudas [40 mg de NaF/Kg p.c. para o trabalho de MacGown (1976) e 40 μ mol de NaF/100g p.c. para o trabalho de Rigalli et al. (1990)] ou crônicas mais elevadas (CHIBA et al., 2012) que as empregadas no nosso estudo (LOBO et al., 2015). No que se refere à

linhagem, vale ainda ressaltar que em trabalho mais recente (CHEHOUD et al., 2008) foi avaliada a mesma linhagem de ratos (fêmeas castradas) que a utilizada pelo nosso grupo de pesquisa (*Wistar*), e embora as ratas tenham apresentado um aumento na glicemia perante ao tratamento agudo com F, também não foi observada alteração na sensibilidade à insulina em ratas não-diabéticas, nem tampouco no grau de fosforilação da tirosina da pp185.

Por outro lado, vale destacar que os efeitos do F sobre a resistência óssea podem variar bastante, dependendo do protocolo experimental utilizado (TURNER et al., 1995). Em determinadas circunstâncias, o F pode agir benéficamente no metabolismo ósseo, e em outras pode agir de maneira negativa. Tem sido destacado que cerca de apenas 40% dos indivíduos tratados com F visando ao aumento da massa óssea respondem positivamente ao tratamento, enquanto a maioria não responde. A possibilidade da influência do *background* genético na resposta dos tecidos calcificados ao F foi estudada inicialmente por Everett et al. (2002). Os autores relataram que camundongos da linhagem A/J são extremamente sensíveis ao tratamento com F, desenvolvendo uma fluorose dentária rápida e severa, enquanto que os camundongos da linhagem 129P3/J são extremamente resistentes ao desenvolvimento da fluorose dentária, mesmo que expostos a doses de F na água tão altas quanto 100 ppm F. A resposta destas 2 linhagens de animais aos efeitos do F no tecido ósseo também é bastante distinta (MOUSNY et al., 2006, 2008; KOBAYASHI et al., 2014). Estes animais ainda metabolizam o F de maneira diferente, sendo que os animais da linhagem A/J excretam uma quantidade de F através da urina significativamente maior, e consequentemente têm níveis de F no plasma significativamente menores que aqueles da linhagem 129P3/J (CARVALHO et al., 2009). Animais destas duas linhagens ainda têm diferenças importantes no perfil proteômico renal (CARVALHO et al., 2013). O perfil diferente de resposta ao F observado para os animais destas 2 linhagens nos fez aventar a hipótese de que o *background* genético pudesse também influenciar nos parâmetros relacionados à suscetibilidade ou não em desenvolver distúrbios metabólicos relacionados ao diabetes em consequência da exposição ao F, como hiperglicemia, alterações nos níveis plasmáticos de insulina, resistência periférica e taxa de funcionalidade das células β pancreáticas (dados calculados pelo índice HOMA2-IR). Neste sentido, estas 2 linhagens que sabidamente apresentam perfis de resposta ao F distintos, tanto em tecidos moles quanto em tecidos calcificados, parecem se constituir no modelo experimental mais adequado para ser estudado. Se esta diferença de resposta aos distúrbios metabólicos relacionados ao diabetes for confirmada nos animais destas duas linhagens, o próximo passo seria identificar padrões de resposta similares em humanos, bem

como biomarcadores que possam ser utilizados na predição de risco ao desenvolvimento de resistência à insulina, de maneira que se possa indicar e recomendar corretamente o uso adequado e racional do F para cada grupo étnico.

É relevante também realizar estudos imunológicos e de vias de sinalização para a captação da glicose celular em camundongos com diferentes suscetibilidades ao F, já que o estresse oxidativo causado pelo F pode induzir uma resposta imunológica (PRYSTUPA, 2011), com aumento de TNF- α , produção de óxido nítrico (NO), inibição na secreção de insulina, ou até mesmo apoptose de células β (OYADOMARI et al., 2001), ocasionando resistência periférica por interferir na expressão dos receptores e proteínas do início da cascata de sinalização de insulina, as quais promovem a migração da GLUT-4 para membrana celular para captação da glicose (Figura 2). O TNF- α está associado à fosforilação de IRS1/2 em serina, de maneira que a transdução do sinal insulínico fica prejudicada, já que a fosforilação em serina bloqueia o sinal enzimático gerado pela ligação insulina-receptor [auto fosforilação da tirosina em tirosina-quinase em pp185 (IRS1/IRS2)] (HOTAMISLIGIL et al., 1996).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo geral avaliar, em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J, recém-desmamados e expostos cronicamente a doses de F na água de beber que simulam a ingestão de F pela água natural e artificialmente fluoretada, se ocorre efeito dose-resposta nos parâmetros relacionados à resistência periférica à insulina, em função da linhagem genética desses camundongos. Especificamente objetivou-se:

- ✓ Avaliar a sensibilidade à insulina;
- ✓ Avaliar a fluoremia, glicemia jejum e insulinemia;
- ✓ Avaliar pesos corporais inicial e final;
- ✓ Avaliar o índice de resistência à insulina (HOMA2-IR);
- ✓ Dosar TNF- α .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Mediante a aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP, os animais foram obtidos imediatamente após o desmame, ou seja, aos 21 dias de vida, junto ao Biotério Central da FOB/USP (Protocolo 031/2013; ANEXOS A e B), e foram tratados por um período de 42 dias sob condições de luz, temperatura e umidade controladas. Foi fornecida quantidade conhecida de ração com baixo teor de F (Presence, Purina). Foram utilizados 156 camundongos, sendo 78 da linhagem A/J e 78 da linhagem 129P3/J, organizados em 6 grupos experimentais, conforme figura 3.

Figura 3. Delineamento experimental. 1) Linhagens de camundongos, idade, quantidade e tempo de tratamento; Tipos de tratamento; Alocação dos animais nos grupos experimentais; Análises que foram realizadas.

As concentrações de F na água, que foram administradas *ad libitum*, foram selecionadas por corresponderem, em humanos, a doses de 0, 3 (concentração de F mais comumente encontrada naturalmente na água em áreas de fluorose endêmica) e 10 ppm de F

na água (maior concentração de F que pode estar presente naturalmente na água de regiões onde ocorre fluorose endêmica), respectivamente (DUPANICE et al. 1995). Em adição, a concentração de 15 ppm F foi escolhida porque, em estudo desenvolvido anteriormente, esta concentração provocou mais alterações em parâmetros relacionados a equilíbrio oxidante/antioxidante que a dose de 50 ppm F (IANO et al., 2014). Além disso, foi observado que ratas *Sprague dawley* tratadas com água contendo 15 ppm F desenvolveram resistência à insulina (LOMBARTE et al., 2013).

Os animais de cada grupo foram mantidos 2 a 2 em gaiolas metabólicas, para que fosse possível obter dados de ingestão hídrica, uma vez que os animais da linhagem A/J consomem mais água que os animais da linhagem 129P3/J, independentemente da concentração de F (CARVALHO et al., 2009). Estes dados foram coletados uma vez por semana ao longo do tratamento, para que na semana seguinte as concentrações de F na água fornecida aos animais da linhagem A/J fosse diminuída, de forma a assegurar a mesma ingestão de F pelos animais das duas linhagens. Adicionalmente, foi avaliada a massa (g) dos animais, também uma vez por semana durante os 42 dias de tratamento.

3.2 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais utilizados no experimento foram eutanasiados, previamente anestesiados por Tiopental Sódico (Thiopentax[®], 3%, 5 mg/100g peso corpóreo, intraperitoneal), sendo adicionadas ligeiras doses extras nos casos em que os animais ainda demonstraram alguma sensibilidade à palpação das patas e cauda, para evitar qualquer tipo de dor durante os procedimentos técnicos e cirúrgicos. Após decapitação, foram coletadas amostras de sangue em tubos heparinizados. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm a 4°C por 15 minutos, para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20°C até análise.

3.3 ANÁLISE DE FLUORETO NO PLASMA

Para análise do F no plasma (Figura 4), foram utilizados 200 µL do mesmo, que foram submetidos a uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, contém CO₂, que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra plasmática foi colocada na placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado (HMDS) em um volume que

correspondia a 15% do volume da amostra de plasma. O HMDS foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido à metade (agora chamado de ácido aquecido), a fim de se eliminar qualquer fluoreto residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a evaporação do CO_2 , o volume das mesmas então foi completado para 2 mL com água deionizada e a difusão seguiu normalmente como descrita por TAVES (1968), modificado por WHITOFRD (1996).

Para a difusão, 25 μL de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas. As placas foram fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício, previamente feito na tampa, foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 12,5 μL de ácido acético 0,2 M, e o volume total foi ajustado para 37,5 μL com água deionizada, usando uma pipeta automática Gilson (10-100 μL). A gota, contendo todo o F, foi então analisada com eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catalogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 9409, sendo estes mantidos unidos através de bandas de borracha durante a leitura, e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

Figura 4. Esquema da análise de fluoreto no plasma. 1) Placa de Petri, na qual serão adicionados 200 μL de amostra. 2) Adição de NaOH na tampa da placa 3) Adição de HMDS para difusão. 4) Placa selada com vaselina e parafilme, pronta a difusão. 5) Mesa agitadora onde foram colocadas as placas *overnight*; 6) Leitura da amostra através do eletrodo de F Orion E9409, acoplado ao eletrodo de referência calomelano.

3.4 DOSAGEM DA GLICEMIA

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

Utilizou-se kit enzimático para glicose marca KATAL (Katal Biotecnologia Indústria e Comercio Ltda., São Paulo, Brasil).

As dosagens foram realizadas em microplacas de 96 poços. Foram feitos cinco padrões com diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100 mg/dL) a partir do padrão 100 mg/dL (fornecido pelo Kit), para ser realizada a curva. O preparo dos padrões foi realizado conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Preparação dos padrões para dosagem da glicemia

Padrões	µl Água	µl Padrão 100
20	80	20
40	60	40
60	40	60
80	20	80
100	0	100

Após o preparo dos padrões, foram pipetados 2,5 µL de cada um e dispensados nos poços da microplaca. A mesma quantidade (2,5 µL) foi pipetada de cada amostra. Em todos os poços foram adicionados 250 µL do reagente fornecido pelo kit (Figura 5), e então a microplaca foi colocada no Eppendorf ThermoMixer® à temperatura de 37°C durante 15 minutos, sob agitação (300 rpm). As leituras no espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda 505 nm.

Para obtenção dos resultados, foram adotados os seguintes cálculos:

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

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

Figura 5. Análise de glicemia. Microplaca de 96 poços com as amostras de plasma e reagentes para leitura no espectrofotômetro.

3.5 INSULINEMIA E CÁLCULO DO ÍNDICE HOMA-IR

A dosagem de insulina foi realizada utilizando o kit Mouse Insulin ELISA (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, EUA, catalog #80-INSMS-E01, E10, version October 4, 2012), seguindo instruções do fabricante.

Trata-se de um imunoenensaio do tipo sanduíche. A microplaca (Figura 6) foi recoberta com um 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 microplacas na velocidade entre 700 e 900 rpm, por 2 horas. Após o término da primeira incubação, os poços foram lavados com tampão específico de lavagem e secos. O substrato TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionado e a microplaca foi incubada pela segunda vez à temperatura ambiente num agitador de microplacas, na velocidade entre 700 e 900 rpm, por 15 minutos. A solução de *stop* foi então adicionada e a densidade óptica foi lida no leitor de microplacas (SynergyTM Mx Monochromator-Based Multi-Mode, Bio-Tek Instruments, EUA).

A curva de calibração foi construída com padrões contendo 0, 0,188, 0,5, 1,25, 3,75 e 6,9 ng/mL ($r^2=0,9864$). Todas as leituras foram feitas em duplicata. As concentrações das amostras obtidas em ng/mL foram convertidas em pmol/L, multiplicando-se os valores em ng/mL por 172,1, para que pudesse ser feita a análise de resistência à insulina utilizando o índice HOMA2-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*).

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

Figura 6. Análise de insulinemia. Microplaca com as amostras de plasma e reagente para leitura no espectrofotômetro.

3.6 TNF- α

Foi utilizado o Kit ELISA Mouse TNF- α (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EUA, catalog# KMC3011). Trata-se de ELISA tipo sanduíche de fase sólida. Um anticorpo monoclonal específico para TNF- α foi adicionado nos poços da microplaca fornecida. As

amostras e os padrões de concentrações conhecidas foram pipetados nestes poços, e na sequência foi adicionado um segundo anticorpo policlonal biotinilado. Durante a primeira incubação (90 minutos à temperatura ambiente), o antígeno de TNF- α se liga ao anticorpo imobilizado em um ponto, e ao anticorpo biotinilado num segundo ponto. Após a incubação, foram descartados o líquido e o excesso do segundo anticorpo (foram realizadas quatro lavagens com a solução de lavagem fornecida), e então a enzima estreptavidina-peroxidase foi adicionada. A placa foi coberta e incubada por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Depois da segunda incubação e lavagem para remover toda a enzima não ligada (30 minutos de incubação em temperatura ambiente e realização de quatro lavagens), uma solução de substrato foi adicionada, que reagiu produzindo cor azul. A placa foi novamente incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, em local escuro. A intensidade do produto colorido é diretamente proporcional à concentração de TNF- α presente na amostra. A solução de *stop* foi então adicionada e a densidade óptica foi lida no leitor de microplacas (SynergyTM Mx Monochromator-Based Multi-Mode, Bio-Tek Instruments, EUA).

3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

O teste de tolerância à insulina é um método que afere a constante da velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) do plasma a partir da administração de insulina e estima a sensibilidade ao fármaco (WAJCHENBERG et al., 1999).

O experimento foi realizado pela manhã, ao final dos 42 dias de tratamento, em 16 animais de cada grupo. Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Thiopentax[®], 3%, 5 mg/100g peso corpóreo, intraperitoneal). Em seguida, foi coletada amostra de sangue (cerca de 50 μ L) através de secção na cauda, para aferição da glicemia inicial. Posteriormente, foi administrada uma única dose de insulina de 0,75 U/Kg peso corpóreo por via intraperitoneal. Na sequência, foram realizadas coletas de sangue para aferição da glicemia a cada 4 minutos durante 16 minutos.

A dosagem glicêmica foi feita utilizando monitor de glicemia (Accu-Check Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A constante (Kitt) foi calculada a partir da fórmula $\ln^2/t^{1/2}$ e o $t^{1/2}$ da glicose a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al., 1989).

Portanto:

$$t^{1/2} = \text{Ln}^2 / \text{coeficiente de x.}$$

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os softwares GraphPad InStat versão 3,0 para Windows, Prism versão 6,0 para Windows (GraphPad Software Inc., LA Jolla, CA, EUA). Inicialmente os dados foram checados em relação à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett) para seleção do teste estatístico apropriado. Os dados de massa inicial, massa final, glicemia, insulinemia, HOMA2-IR, %B, %S e concentração plasmática de foram analisados por ANOVA a 2 critérios e pelos testes de Tukey e Sidak para comparações individuais. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PESO CORPORAL (g)

As tabelas 2 e 3 mostram a massa média inicial e final, respectivamente, dos animais das linhagens A/J e 129P3/J, tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto. Em relação à massa média inicial, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=7,854$, $p=0,0070$), mas não entre os tratamentos com fluoreto ($F=0,019$, $p=0,981$) e nem para a interação entre ambos ($F=0,576$, $p=0,565$). Apesar de a massa média dos animais 129P3/J ter sido ligeiramente maior que a dos animais da linhagem A/J, o teste de comparações individuais de Sidak não encontrou diferenças significativas entre as linhagens. Para a massa final, a ANOVA a 2 critérios não encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=2,368$, $p=0,30$), tratamentos com fluoreto ($F=0,552$, $p=0,579$) ou interação ($F=0,622$, $p=0,541$). Estes resultados são similares a outros achados do nosso grupo que mostram não haver diferença de massa entre os animais das linhagens A/J e 129P3/J (CARVALHO et al. 2009) e ainda que o tratamento com F na água em concentrações até 50 ppm F não causa diminuição de massa (PEREIRA et al., 2013).

Tabela 2. Massa média no início do tratamento (g, $\pm$ DP) dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	21,04 $\pm$ 1,94 ^a	22,76 $\pm$ 2,11 ^a
15 ppm	21,61 $\pm$ 1,51 ^a	22,26 $\pm$ 1,48 ^a
50 ppm	20,90 $\pm$ 1,18 ^a	22,74 $\pm$ 2,89 ^a

Não houve diferenças significativas entre as linhagens ou tratamentos (ANOVA a 2 critérios e teste de Sidak, $p>0,05$). n=10.

Tabela 3. Massa média ao fim do tratamento (g, $\pm$ DP) dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	21,98 $\pm$ 1,42 ^a	22,43 $\pm$ 2,48 ^a
15 ppm	22,29 $\pm$ 1,15 ^a	22,63 $\pm$ 1,60 ^a
50 ppm	20,96 $\pm$ 0,62 ^a	22,61 $\pm$ 3,56 ^a

Não houve diferenças significativas entre as linhagens ou tratamentos (ANOVA a 2 critérios e teste de Sidak, $p > 0,05$). $n=10$.

4.2 CONCENTRAÇÃO DE FLUORETO NO PLASMA

Em relação à concentração de F no plasma, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre os tratamentos com F ($F=16,07$, $p < 0,0001$), mas não entre as linhagens ($F=0,532$, $p=0,470$) sem interação entre estes critérios ($F=0,264$, $p=0,769$). Em geral, foi observada uma dose resposta em relação à concentração de F na água, como observado em trabalho prévio com animais das mesmas linhagens submetidos tratados com água contendo concentrações similares de F (CARVALHO et al., 2009). Para os animais da linhagem A/J, o teste de Tukey revelou diferença significativa entre os grupos tratados com 0 e 50 ppm F. Já para os animais 129P3/J, ambos os grupos tratados com F diferiram significativamente do controle, mas não diferiram entre si. Deve ser destacado ainda que os animais da linhagem 129P3/J tratados com F apresentaram concentrações plasmáticas maiores que os animais A/J submetidos aos mesmos tratamentos com F, embora não tenha havido diferença significativa entre as linhagens (Tabela 4). Estes resultados seguem a mesma tendência daqueles observados por Carvalho et al. (2009), os animais 129P3/J tratados com 50 ppm F na água por 42 dias tiveram concentrações de F no plasma significativamente maiores, embora tenha havido diferença significativa entre os animais A/J e 129P3/J tratados com 50 ppm F.

Tabela 4. Concentração plasmática média (mg/L, $\pm$ DP) de F em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	0,029 $\pm$ 0,007 ^a	0,023 $\pm$ 0,005 ^a
15 ppm	0,103 $\pm$ 0,047 ^{ab}	0,125 $\pm$ 0,092 ^b
50 ppm	0,143 $\pm$ 0,055 ^b	0,168 $\pm$ 0,063 ^b

* Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com fluoreto. As diferenças entre as linhagens não foram significativas (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n = 5-10$.

4.3 GLICEMIA, INSULINEMIA E ÍNDICE HOMA-IR

Para a glicemia, a ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F = 6,871$, $p = 0,0118$), mas não entre os tratamentos com F ($F = 0,248$, $p = 0,782$), com interação significativa entre ambos ($F = 4,922$, $p = 0,012$). Os animais A/J que receberam água sem F ou contendo 15 ppm F tiveram glicemia significativamente mais alta do que os animais 129P3/J que receberam o mesmo tratamento. Já para os animais tratados com 50 ppm F, não houve diferença significativa entre as linhagens (Tabela 5).

Tabela 5. Glicemia média (mg/dL, $\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	179,6 $\pm$ 20,4 ^A	144,7 $\pm$ 30,2 ^B
15 ppm	174,0 $\pm$ 18,7 ^A	138,6 $\pm$ 30,8 ^B
50 ppm	154,5 $\pm$ 23,9 ^A	167,4 $\pm$ 29,6 ^A

* Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre as linhagens (ANOVA a 2 critérios e teste de Sidak, $p < 0,05$). $n = 7-10$.

Para as dosagens de insulina no plasma, a ANOVA a 2 critérios não encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F = 0,476$, $p = 0,493$), mas sim entre os tratamentos com F ($F = 5,485$, $p = 0,0069$). A interação entre os critérios não foi significativa ($F = 1,013$, $p = 0,370$). Os animais da linhagem A/J, tratados com 50 ppm F, tiveram insulinemia significativamente menor que os respectivos controles (teste de Tukey). Para as demais comparações não houve diferenças significativas (Tabela 6).

Tabela 6. Insulinemia média (pmol/L, $\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	72,47 $\pm$ 6,48 ^a	68,65 $\pm$ 4,23 ^a
15 ppm	71,55 $\pm$ 8,78 ^{ab}	71,77 $\pm$ 4,65 ^a
50 ppm	65,83 $\pm$ 1,96 ^b	66,48 $\pm$ 3,24 ^a

* Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F. Não houve diferença significativa entre as linhagens (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). n=9-10.

Com os resultados de glicose e insulina, foi realizado o teste HOMA2-IR. A ANOVA a 2 critérios revelou diferença significativa entre os tratamentos com F ($F=3,819$, $p=0,029$), mas não entre as linhagens ($F=3,458$, $p=0,070$), sem interação significativa ($F=2,247$, $p=0,117$). Os animais da linhagem A/J tratados com 50 ppm F tiveram índice HOMA2-IR significativamente menor que os animais da mesma linhagem, que receberam água sem F ou contendo 15 ppm F (teste de Tukey). Para as demais comparações não houve diferença significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Índice HOMA2-IR médio ($\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	1,57 $\pm$ 0,16 ^a	1,41 $\pm$ 0,1 ^a
15 ppm	1,55 $\pm$ 0,17 ^a	1,48 $\pm$ 0,1 ^a
50 ppm	1,39 $\pm$ 0,07 ^b	1,42 $\pm$ 0,10 ^a

* Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F. Não houve diferença significativa entre as linhagens (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). n=7-10.

Em relação à porcentagem de células β pancreáticas (%B), a ANOVA a 2 critérios revelou diferença significativa entre as linhagens ($F=5,332$, $p=0,026$), mas não entre os tratamentos com F ($F=0,826$, $p=0,445$), nem para a interação entre ambos ($F=2,910$, $p=0,065$). Na comparação entre as linhagens, a %B foi significativamente maior para os animais 129P3/J quando comparados aos A/J, apenas para os grupos tratados com 15 ppm F (teste de Sidak). Na comparação entre os tratamentos, só houve diferença para os animais da linhagem 129P3/J, sendo que os animais tratados com 15 ppm F apresentaram %B significativamente maior que os animais tratados com 50 ppm F (teste de Tukey) (Tabela 8).

Tabela 8. Função média ($\pm$ DP) das células β pancreáticas (%B) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	32,4 $\pm$ 9,1 ^{Aa}	44,0 $\pm$ 13,2 ^{Aab}
15 ppm	34,1 $\pm$ 9,1 ^{Aa}	52,2 $\pm$ 19,0 ^{Ba}
50 ppm	39,7 $\pm$ 13,0 ^{Aa}	36,2 $\pm$ 13,3 ^{Ab}

* Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre as linhagens. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F (ANOVA a 2 critérios e testes de Tukey e Sidak, $p < 0,05$). $n = 7-10$.

Para a sensibilidade à insulina (%S), houve diferença significativa entre os tratamentos com F ($F = 3,929$, $p = 0,027$), e entre as linhagens ($F = 3,289$, $p = 0,076$), sem interação entre ambos ($F = 2,461$, $p = 0,097$). Na comparação entre as linhagens, os animais da linhagem 129P3/J apresentaram %S significativamente maior que os animais A/J, apenas para o grupo controle. Na comparação entre os tratamentos, os animais A/J tratados com 50 ppm F tiveram %S significativamente maior que os animais da mesma linhagem tratados com 15 ppm F ou controle (teste de Sidak) (Tabela 9).

Tabela 9. Sensibilidade à insulina (%S) média ($\pm$ DP) de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	64,2 $\pm$ 6,6 ^{Aa}	71,4 $\pm$ 5,2 ^{Ba}
15 ppm	65,1 $\pm$ 6,8 ^{Aa}	68,0 $\pm$ 5,3 ^{Aa}
50 ppm	72,4 $\pm$ 4,2 ^{Ab}	70,9 $\pm$ 4,9 ^{Aa}

* Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre as linhagens. Letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos com F (ANOVA a 2 critérios e teste de Sidak, $p < 0,05$). $n = 7-10$.

4.4 ITT

Para o Teste de tolerância à insulina curto (ITT), que demonstra a velocidade de desaparecimento da glicose sanguínea (Kitt), ao longo do tempo, em função da administração de insulina, a ANOVA a 2 critérios não encontrou diferenças significativas entre as linhagens ($F=0,612$, $p=0,438$), nem entre os tratamentos com fluoreto ($F=0,493$, $p=0,614$). A interação entre ambos também não foi significativa ($F=0,572$, $p=0,568$) (Tabela 10).

Tabela 10. Velocidade média ($\pm$ DP) de desaparecimento da glicose (Kitt, % por minuto) sanguínea ao longo do tempo, em função da administração de insulina (0,75 U/Kg peso corporal) em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de fluoreto durante 42 dias.

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	4,481 $\pm$ 1,896 ^a	3,575 $\pm$ 0,967 ^a
15 ppm	3,969 $\pm$ 1,296 ^a	4,238 $\pm$ 1,618 ^a
50 ppm	3,816 $\pm$ 1,785 ^a	3,429 $\pm$ 1,794 ^a

* Não houve diferença significativa entre as linhagens nem entre os tratamentos com fluoreto (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p<0,05$). $n=8-13$.

A razão para trabalharmos com animais das linhagens A/J e 129P3/J foi que animais destas linhagens apresentam diferenças em relação ao metabolismo do F (CARVALHO et al., 2009), suscetibilidade à fluorose dentária (EVERETT et al., 2002) e aos efeitos do F no tecido ósseo (MOUSNY et al., 2006), assim como no perfil proteômico renal (CARVALHO et al., 2013) e ósseo (KOBAYASHI et al., 2014). Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar se estes animais destas linhagens também diferem em relação aos parâmetros relacionados à resistência à insulina. Estudos prévios relataram que exposição crônica de animais (ratos das linhagens *Wistar* e *Sprague Dawley*) a doses crônicas de F (4,0 mg F/Kg peso corporal ou 15 ppm F na água, respectivamente) provocavam aumento significativo da resistência à insulina (índice HOMA2-IR). Este aumento da resistência à insulina se dá às custas de um aumento da insulinemia, embora a glicemia permaneça inalterada (CHIBA et al., 2010; LOMBARTE et al., 2013). Em trabalho prévio do nosso grupo, foi avaliado se a administração de doses crônicas de F associadas àquelas equivalentes em humanos que recebam níveis ótimos de F através da água artificialmente fluoretada (1 ppm) ou níveis aumentados através da água naturalmente fluoretada (em torno de 5 ppm; similar à dose de 50 ppm para camundongos no presente estudo) também seria capaz de alterar estes parâmetros

em ratos *Wistar* machos, normais ou com diabetes induzido por estreptozotocina. Nossos resultados foram diferentes daqueles descritos acima. O tratamento crônico com NaF na água (5 ou 50 ppmF), não causou aumento significativo na glicemia, nas concentrações plasmáticas de insulina e nem no índice HOMA2-IR em ratos não diabéticos. A sensibilidade à insulina só foi alterada em ratos diabéticos tratados com 5 ppm F. Mas esta alteração correspondeu a um aumento na sensibilidade à insulina (LOBO et al, 2015), e não a uma diminuição, como vinha sendo relatado em estudos prévios (CHIBA et al., 2010; LOMBARTE et al., 2013). Hipotetizou-se então que as diferenças encontradas nos trabalhos realizados por grupos distintos em relação aos parâmetros relacionados à resistência à insulina poderiam ser atribuídas ao *background* genético dos animais. Por este motivo trabalhamos, no presente estudo, com animais das linhagens A/J e 129P3/J, que sabidamente possuem diferenças genéticas em relação ao metabolismo e efeitos do F no organismo. Os resultados obtidos confirmam esta hipótese. Os animais da linhagem A/J apresentaram glicemia significativamente mais alta que aqueles da linhagem 129P3/J, mas apenas para os grupos controle e tratado com 15 ppm F, já que a exposição dos animais 129P3/J a 50 ppm F provocou uma diminuição da insulinemia, que, embora não tenha diferido significativamente dos animais da mesma linhagem tratados com água sem F ou contendo 50 ppm F, foi significativamente maior que a glicemia observada para os animais A/J tratados com 15 ppm F. Curiosamente, para a insulinemia, não houve diferença significativa entre as linhagens, mas para os animais da linhagem A/J, o tratamento com 50 ppm F reduziu significativamente a insulinemia quando comparado aos grupos controle e tratado com 15 ppm F, efeito não observado para os animais da linhagem 129P3/J, e este resultado foi refletido no índice HOMA2-IR, que foi significativamente menor para os animais A/J tratados com 50 ppm F em relação aos animais da mesma linhagem não tratados com F ou tratados com 15 ppm F, ou seja, a exposição à alta dose de F aumentou a sensibilidade à insulina nos animais da linhagem A/J. Os possíveis mecanismos que levam a este efeito precisam ser estudados. Um estudo recente revelou aumento da sensibilidade à insulina em ratos tratados com 10 ppm F e isto foi atribuído a um aumento na expressão de GRP-78 no fígado, que é recrutada para a membrana plasmática devido ao *stress* do retículo endoplasmático induzido pelo F. Na membrana plasmática, a GRP-78 forma um complexo com a proteína ERj3P, aumentada mediante exposição ao F e os sinais subsequentes levam a um efeito benéfico nas disfunções metabólicas induzidas pelo *stress* do retículo endoplasmático, aumentando a sensibilidade à insulina (LOBO et al., 2015).

Estes resultados de um aumento na sensibilidade à insulina pela exposição dos animais A/J a 50 ppm F são diferentes daqueles observados por Chiba et al. (2010) e Lombarte et al., (2013), que encontraram um aumento da resistência à insulina em ratos *Wistar* tratados com 4 mgF/Kg de peso corporal por 42 dias, o que aumentou a concentração de F no plasma para 0,121 µg/mL (CHIBA et al., 2010) e *Sprague dawley* tratados com 15 ppm F na água de beber (0,29 por 30 dias), o que aumentou a concentração de F no plasma (LOMBARTE et al., 2013). Esta alteração também ocorreu às expensas de mudanças na insulinemia, com a glicemia permanecendo inalterada, como no presente estudo, apesar do padrão inverso de resposta, ou seja, diminuição da resistência à insulina no presente estudo vs. aumento da resistência à insulina nos estudos de Chiba et al. (2010) e Lombarte et al. (2013). É importante destacar que embora os *designs* do presente estudo e do estudo de Chiba et al. (2010) tenham sido diferentes, já que a espécie animal foi diferente (camundongos vs. ratos, respectivamente) e a forma de administração de F também (concentração fixa de F na água de beber vs. concentração de F ajustada em relação ao peso corporal), as concentrações plasmáticas de F nos dois estudos foram bastante parecidas, de forma que as diferenças no padrão de resposta ao F em relação aos parâmetros relacionados à resistência à insulina poderiam ser atribuídos ao tipo de animal estudado. Em outras palavras, os animais A/J, que já tinham sido reportados como suscetíveis aos efeitos do F em relação à ocorrência de fluorose dentária (EVERETT et al., 2002), também são suscetíveis à alterações na homeostasia da glicose mediante exposição ao F, sofrendo aumento da sensibilidade à insulina (%S; Tabela 9) mediante doses elevadas de F. Por outro lado, é importante destacar que para a função das células β pancreáticas (%B; Tabela 8), o tratamento dos animais 129P3/J com 15 ppm F levou a aumento na %B, o que fez com que estes animais tivessem uma %B significativamente maior que os animais A/J tratados com 15 ppm F, embora quando comparados com o controle da mesma linhagem a diferença não tenha sido significativa. No estudo de Hu et al. (2012) foi observado, na análise histomorfométrica, um aumento na área positiva à insulina e no tamanho das ilhotas de Langerhans em ratos *Wistar* tratados com 100 ppm F na água de beber por 1 ano, indicando um aumento na secreção de insulina. Entretanto, num experimento *in vitro*, células β pancreáticas tratadas com 25 e 43 ppm F por 12 horas tiveram expressão do RNAm de insulina e subsequente secreção de insulina significativamente na presença de estimulação com glicose significativamente menores (GARCÍA-MONTALVO et al., 2009). Entretanto, as concentrações de F utilizadas para tratar as células β foram muito altas (25 e 43 ppm) no estudo de García-Montalvo et al. (2009), pois, numa condição *in vivo*, após a absorção de F níveis plasmáticos de 25 e 43 ppm F são certamente incompatíveis com a vida. O estudo de

Rigalli et al. (1990) também avaliou a secreção de insulina em ratas *Sprague dawley* expostas a uma dose única de 8 mgF/Kg peso corporal, que levaram a concentrações plasmáticas de F entre 5 e 15 μ M (entre 0,096 e 0,285 μ g/mL). Foi observada uma queda imediata nos níveis de insulina plasmática. Os autores então perfundiram ilhotas de Langerhans isoladas com 5, 10 ou 20 μ M F (0,096, 0,19 ou 0,38 μ gF/mL, respectivamente) e observaram também uma inibição na secreção de insulina. Assim, pode-se dizer que ainda há controvérsia na literatura acerca dos efeitos do F na secreção de insulina. Estudos com *design* adequado, especialmente em relação às doses de F utilizadas, que devem mimetizar os níveis plasmáticos encontrados em situações usuais de exposição ao F, além de estudos mecanísticos são necessários para se esclarecer os feitos da exposição ao F na secreção de insulina.

Apesar de no presente estudo ter sido observada uma diminuição significativa na resistência à insulina em camundongos A/J tratados com 50 ppm F, conforme avaliação pelo índice HOMA2-IR, a ANOVA a 2 critérios não encontrou diferenças significativas entre nenhuma das variáveis estudadas (linhagem e concentração de F na água), talvez por ser um teste menos sensível que as análises da glicemia e insulinemia, refletidas no índice HOMA2-IR.

4.5 TNF- α

Quanto ao TNF- α , não foi observada diferença significativa entre as linhagens (F=0,486, p=0,490), nem entre os tratamentos (F=1,729, p=0,192), sem interação entre ambos (F=0,022, p=0,979). Entretanto, pode-se observar uma tendência para aumento nos grupos tratados com água contendo 15 ppm F, em ambas as linhagens (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração plasmática média de TNF- α (pg/mL, $\pm$ DP) em camundongos das linhagens A/J e 129P3/J tratados com água com diferentes concentrações de F durante 42 dias

[F] na água	A/J	129P3/J
0 ppm	4,30 $\pm$ 3,31 ^a	3,86 $\pm$ 1,86 ^a
15 ppm	6,31 $\pm$ 4,29 ^a	5,51 $\pm$ 2,07 ^a
50 ppm	4,88 $\pm$ 1,90 ^a	4,42 $\pm$ 0,73 ^a

Não houve diferenças significativas entre as linhagens ou tratamentos (ANOVA a 2 critérios, $p > 0,05$). $n=5-9$.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ As massas inicial e final dos animais A/J e 129P3/J não diferiram significativamente nas duas linhagens de camundongos avaliadas e nem mediante tratamento com diferentes concentrações de F;
 - ✓ Foi observada dose-resposta para os resultados da análise de F no plasma. Os animais A/J tratados com 50 ppm F tiveram maior concentração de F no plasma comparados com o grupo controle. Já para os animais 129P3/J, os tratamentos (tanto com 15 ppm F quanto com 50 ppm F) elevaram os níveis plasmáticos de F em relação ao grupo controle, mas não houve diferença significativa entre as linhagens;
 - ✓ Em relação à glicemia, os níveis foram significativamente maiores nos animais da linhagem A/J controle e tratados com 15 ppm F, quando comparados aos animais da linhagem 129P3/J;
 - ✓ Para a insulinemia, a única diferença significativa foi em relação ao grupo A/J tratado com 50 ppm F quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem, sendo significativamente menor para os animais tratados;
 - ✓ A resistência à insulina, avaliada pelo índice HOMA2-IR, foi diferente apenas para os animais A/J tratados com 50 ppm F, sendo menor do que os animais do grupo controle e tratados com 15 ppm F da mesma linhagem;
 - ✓ A % de função das células β foi significativamente menor para os animais A/J do que a dos animais 129P3/J para os grupos tratados com 15 ppm F. O grupo tratado com 15 ppm F da linhagem 129P3/J também diferiu do grupo tratado com 50 ppm F da mesma linhagem, tendo % de função das células β maior do que os animais tratados com 50 ppm F;
 - ✓ Quanto a % de sensibilidade à insulina, houve diferença entre as linhagens apenas para os grupos controle, sendo significativamente maior para os animais 129P3/J. Os
-
-

animais A/J tratados com 50 ppm F tiveram % de sensibilidade à insulina maior que o grupo controle e tratado com 15 ppm F da mesma linhagem;

- ✓ A velocidade de desaparecimento da glicose após estímulo insulínico (Kitt) não foi diferente estatisticamente entre as linhagens e nem entre os tratamentos empregados;
- ✓ Para o TNF- α , não foi encontrada diferença significativa em nenhum dos parâmetros observados, embora os resultados dos grupos tratados com 15 ppm F em ambas as linhagens apresentaram-se ligeiramente maiores que os dos grupos controle e tratado com 50 ppm F.

Em síntese, os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos do F na homeostasia da glicose são linhagem e dose-dependente. Ainda há controvérsias na literatura acerca dos efeitos do F tanto na sensibilidade à insulina quanto na secreção de insulina, de forma que estudos com *design* apropriado e abordagem mecanística devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Bhartmagar M, Dhar V. Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res*, 2009. 20(3).
- Bonora E., Moghetti P., Zancanaro C., Cigolini M., Querena M., Cacciatori V., Corgnati A., Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.68, n.2, p.374-378, Feb. 1989.
- Buzalaf M. Fluoride and the Oral Environment. *Monogr Oral Sci*. Basel Karger. 2011; 22.
- Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res*. 2009; 88(11):1054-8.
- 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.
- Carvalho JB, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v.46, n.4, p.419-425, 2002.
- Centers for Disease Control and Prevention. Achievements in public health, 1900-1999: fluoridation of drinking water to prevent dental caries. *Morb Mort Wkly Rep* 1999; 48(41):933-940.
- Chehoud KA, Chiba FY, Sassaki KT, Garbin CAS, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride*. 2008; 41: 270-275.
- Chiba FY. Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF. Dissertação de mestrado. 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 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.
-
-

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, KHC3011, Mouse TNF- α – Invitrogen.

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.

Everett ET, Mchenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, Martinez-Mier EA, Warrick JM, Stookey GK. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res.* 2002; 81:794-798.

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

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

Garfin DE. One-dimensional gel eletrophoresis. *Methods Enzymol.* 1990, 182:425-441.

Georg AE, 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.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996; 271(5249):665-8.

Hu CY, Ren LQ, Li XN, Wu N, Li GS, Liu QY, Xu H. Effect of fluoride on insulin level of rats and insulin receptor expression in the MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 150(1-3):297-305.

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

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

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, Leite AL, Peres-Buzalaf C, Carvalho JG, Whitford GM, Everett ET, Siqueira WL, Buzalaf MA. Bone response to fluoride exposure is influenced by genetics. *PLoS One*. 2014; 9(12):e114343.

Leite AL. Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2010.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica*. 2002. 3ed.

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, Universidade de São Paulo. 2013.

Lobo JG, 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):990-7.

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; 1;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.

Macgwon EL, Suttie JW. Mechanism of fluoride-induced hyperglycemia in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*. 1977; 83-90.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992; 15:1509-16.

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*.1985; 28:412–419.

Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, Devogelaer JP, Grynpas MD. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone*. 2006 Dec;39(6):1283-9.

Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, Banse X, Devogelaer JP, Grynpas MD. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone*. 2008;43(6):1067-74.

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

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.

Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulo stress pathway. *PNAS*. 2001; 98:10845-10850.

Passos VM, Barreto SM, Diniz LM, Lima-Costa MF. Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community - the Bambuí health and aging study. *Sao Paulo Med. J*. 2005; 123(2):66-71.

Pereira HABS. Análise proteômica em fígado de ratos submetidos à exposição crônica ao flúor. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. 2011.

Prystupa J. Fluorine – A current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011; 21(2)103-170.

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. *Arzneimittelforschung.* 1995. 45:289-92.

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

Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, Turner RC .Understanding “insulin resistance”: both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism.* 1991; 40:908-917.

Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore.

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; 346:802-810.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Números de diabéticos no Brasil. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-brasil/>> Acesso em: 13/10/2015.

Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta.* 1968. 15(10): 1015-23.

Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM. Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. *Diabetologia.* 1993; 36:826-8.

Turner CH, Hasegawa K, Zhang W, Wilson M, Li Y, Dunipace AJ. Fluoride reduces bone strength in older rats. *J Dent Res.* 1995; 74:1475-81.

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.

Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, Rocha DM. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metab vol.43 no.2 São Paulo Mar. 1999.

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

ANEXOS

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 031/2013**

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados com a resistência à insulina em linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades genéticas à fluorose**, de autoria de Isabela Tomazini Sabino e Janete Gualiume Vaz Madureira Lobo, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO** em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Análise e parecer do relator:**Recomendações:**

- a) *Corrigir a idade prevista dos animais para o experimento. No protocolo consta 30 dias, página 5, e no projeto, 21 dias, nas páginas 25 e 26;*
- b) *Especificar o número de animais por grupo experimental na tabela apresentada no 'Protocolo para Uso de Animais em Experimentação', página 6 do processo. Sugestão: utilizar a tabela da página 26 do projeto.*

Diante do exposto, solicitamos as providências necessárias e retorno para nova análise desta Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Rompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo BuzalafDocente do Departamento de Ciências Biológicas - *Bioquímica*

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

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

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

Anexo B – Carta de Aprovação Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais referente ao acréscimo de animais para a pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 031/2013

Bauru, 20 de maio de 2014.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alterações no projeto de pesquisa intitulado **“Efeito dose-resposta do fluoreto em parâmetros relacionados com a resistência à insulina em linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades genéticas à fluorose”**, de autoria de Isabela Tomazini Sabino e Janete Gualiume Vaz Madureira Lobo, sob sua orientação, a saber:

- acréscimo de 50 camundongos da linhagem A/J;
- acréscimo de 50 camundongos da linhagem 129P3/J

informamos que, após análise por um relator, referidas alterações foram consideradas **APROVADAS *ad referendum*** desta Comissão, por não haver impedimentos éticos.

Solicitamos que qualquer outra alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas