

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JULIANA SANCHES TREVIZOL

**Fluoride effect on parameters related to glucose homeostasis in
NOD mice: using proteomic analysis of liver and gastrocnemius
muscle to unravel the underlying mechanisms**

**Efeito do fluoreto em parâmetros relacionados à homeostasia da
glicose em camundongos NOD: uso da análise proteômica do
fígado e músculo gastrocnêmio para revelar os mecanismos
envolvidos**

BAURU

2020

JULIANA SANCHES TREVIZOL

Fluoride effect on parameters related to glucose homeostasis in NOD mice: using proteomic analysis of liver and gastrocnemius muscle to unravel the underlying mechanisms

Efeito do fluoreto em parâmetros relacionados à homeostasia da glicose em camundongos NOD: uso da análise proteômica do fígado e músculo gastrocnêmio para revelar os mecanismos envolvidos

Dissertation presented to the Bauru School of Dentistry of the University of São Paulo to obtain the degree of Master in Science in the Applied Dental Science Program, Oral Biology, Stomatology, Radiology and Imaging concentration area.

in the Applied Dental Sciences Program, Stomatology and Oral Biology concentration area.

Supervisor: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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, área de concentração Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientadora: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU

2020

Trevizol, Juliana Sanches

Fluoride effect on parameters related to glucose homeostasis in NOD mice: using proteomic analysis of liver and gastrocnemius muscle to unravel the underlying mechanisms /Juliana Sanches Trevizol – Bauru, 2020.

62 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Animais da FOB-USP

Protocolo nº: 013/2017

Data: 20/11/2018

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação de mestrado à minha família e amigos:

A minha **mãe**

MÃE, muito obrigada por todo apoio, toda ajuda e todo suporte durante a minha vida, sei que não foi fácil chegar até aqui, mas com você sempre ao meu lado eu consegui ir até o final.

Ao meu **pai** e sua **esposa**

Muito obrigada **Pai** e **Leila**, mesmo longe vocês tentam estar o mais próximo possível para me ajudar e estar sempre presente, e a presença de vocês na minha vida é essencial, porque vocês são meu alicerce.

Aos meus irmãos **Tatiane, Abner e Arthur**

Vocês são a razão do meu viver, trazem alegria, felicidade e muito amor para os meus dias, sem o apoio e carinho de vocês não teria chegado até aqui.

Ao meu **Marido**

Eu sei que sem você eu não seria nada, porque você me completa. Muito obrigada por todo amor e incentivo durante esses anos, não foi fácil, passamos muitas coisas, mas sempre superamos tudo, e ao seu lado eu me sinto confiante para alcançar cada vez mais nossos sonhos juntos.

Aos amigos do **Laboratório de Bioquímica**

Eu sei que sem vocês eu não teria chegado até aqui, muito obrigada por todas as risadas, choros, desesperos e também todo apoio e incentivo para nunca desistir, mas sempre acreditar que no final tudo já deu certo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus pela força, amor e oportunidade de estar concretizando um sonho na minha vida, pois a sua presença todos os dias tem me tornado uma mulher mais forte, perseverante e de muita fé, acreditando que Deus está realizando seus planos perfeitos para a minha vida e a do meu esposo.

Á minha família, muito obrigada **mãe** porque a sua força é a minha força também, e assim caminhamos juntas nos apoiando sempre, além de todo amor e carinho de todos os dias. Obrigada por sonhar os meus sonhos e acompanhar todas as minhas conquistas. Obrigada **pai** porque os seus conselhos me direcionaram até aqui e me ajudam sempre á conquistar novos objetivos, também agradeço por sonhar os meus sonhos e me apoiar durante todo esse processo de novas conquistas, mesmo a saudade sendo grande, a sua voz durante as nossas horas de conversas são preciosas, me trazendo alegria, surpresas e me faz estar mais perto de você.

Aos meus **Avós, Vilma, Gerônimo, Cristovão e Gertrudes**, obrigada por todo amor.

Á minha irmã **Tatiane**, eu sei que mesmo morando longe sempre está perto e sempre posso contar com você, estou ao lado para te incentivar, te amar e ver e poder te ajudar nos seus sonhos, onde Deus tem preparado lindos planos para a sua vida.

Á **Leila e Arthur**, por todo apoio, amor e carinho durante todas as minhas conquistas e principalmente por estarem presente nessa etapa da minha vida.

Eu não poderia esquecer do meu companheiro de todas as horas, o meu irmão **Abner** que sempre está ao meu lado trazendo alegria, compartilhando dificuldades e também muitas risadas. Você apenas me traz o lado bom da vida.

Aos meus sogros **João e Lucia** por todo cuidado e carinho durante todos esses anos, vocês me acolheram como filha com muito amor, sempre estando presentes e buscando o meu bem.

Aos meus cunhados **Richard e Priscila** vocês proporcionaram a maior e melhor experiência da minha vida, ser tia de uma princesa. É **Bia** acompanhei seus passos, seus choros, cada centímetro que você crescia durante os anos, e ainda pretendo participar das suas grandes conquistas.

Ao meu esposo **João**, é amor chegou o grande dia, durante todos esses anos foram conquistas, lutas e também muita alegria ao seu lado. Você é a minha melhor escolha, não existe no mundo coração igual ao seu, você coloca os meus sonhos como prioridade, busca me proporcionar os melhores momentos e é a pessoa que mais me incentiva a correr atrás daquilo que almejo. Obrigada por estar ao meu lado, por incentivar todas os meus sonhos e contruir muitos planos juntos. Deus tem feito grandes milagres na nossa vida, um deles é a **Mel**, nossa arteira e destruidora Mel. São 9 anos juntos e durante todos esses anos eu cresci, amadureci e continuo me transformando como mulher, buscando ser a melhor esposa para o melhor esposo. Eu te amo muito e vou estar para sempre ao seu lado.

Aos funcionários do **Biotério**, muito obrigada **Erasmu, Luís e Richard** por todo trabalho e cuidado com os animais e por toda ajuda durante a minha pesquisa, sem vocês esse projeto não seria possível.

Professor Bosqueiro obrigado por toda orientação durante as minhas visitas á UNESP, aprendi muito com o senhor, um jeito simples e extrovertido de fazer pesquisa. Agradeço também ao seu aluno **Aislan** por toda ajuda durante a coleta das amostras, obrigada por me fazer sentir acolhida no laboratório.

As Técnicas do laboratório de Histologia: **Dani e Paty**, muito obrigada pelo excelente trabalho, vocês foram essenciais para a realização desta pesquisa.

Agradeço a **Tânia** por toda ajuda para elaborar e desenvolvimento desse projeto.

Muito Obrigada **Lari e Thelma** pelo empenho e amor por todos no laboratório, desde “Bom Dia” até o “Tudo bem ?” que vocês oferecem com um lindo sorriso todos os dias, vocês fazem parte dessa conquista.

Aos meus amigos da bioquímica durante todo esse processo, foram muitas noites sem dormir e muitos dias correndo atrás de resultados, mas vocês estavam todos os dias preparados para me ajudar, incentivar e trazer muitas, muitas e muitas risadas. Obrigada **Adriano, Vanessa, Ana, Tamara, Cintia, João, Bia, Thalita, Thamyris, Samanta, Tati, Isa, Vinicius, Helo, Flavia, Even, Natara, Gabi, Mari** e muitos outros, vocês sempre acreditaram e estiveram ao meu lado, dividindo experiências, duvidas e também muitas conquistas.

Á minha amiga **Aline**, eu precisei deixar um agradecimento totalmente especial para você, não tenho palavras para agradecer todo amor e dedicação, você me ensina a ser uma pessoa totalmente independente, corajosa e determinada. Obrigada por me responder 5h00 da manhã, obrigada por me ensinar e obrigada por ser tão essencial na minha vida. Você sempre esteve e está ao meu lado, e me faz ser uma pessoa cada vez melhor, muito obrigada por toda ajuda e amizade durante esses anos.

Aos professores da Bioquímica: **Carol** e **Rodrigo**, obrigada por todo conhecimento e dedicação que vocês entregam e sempre estão prontos para nos ajudar.

Á minha aluna de Iniciação Científica **Nathalia**, obrigada por toda dedicação neste projeto.

Agradeço á Deus pela minha Orientadora, porque não seria possível chegar aqui sem ela. **Professora Marília**, a senhora é uma pessoa completamente iluminada, que mostra sua dedicação e amor por tudo aquilo que faz. É incrível como eu cresci estando ao seu lado, comecei á fazer tudo por amor, escrever artigo, relatórios e perder horas e horas sem ver o tempo passar realizando projetos. Obrigada por todo ensinamento de humildade, humanidade e simplicidade durante esses anos. Obrigada por me conceder a confiança em realizar esse projeto e poder fazer parte de uma equipe extraordinária. Estar ao seu lado é querer ser uma mulher forte, persistente e que nunca desiste. Quanto conhecimento e quanto ensinamento eu pude obter estando ao seu lado. Obrigada por me transformar em uma nova Juliana, obrigada por me ensinar á ser determinada e dedicada. Obrigada por perder almoços, jantares ou horas de sono para compartilhar tantos ensinamentos. Obrigada por ser uma orientadora incrível.

Agradecimentos institucionais

Agradeço a **Faculdade de Odontologia de Bauru-USP** pela oportunidade de estar realizando mestrado em umas das melhores Universidades do mundo, com uma infraestrutura totalmente equipada e prepara para acolher os alunos que buscam realizar pesquisa. Comecei em 2015 a minha iniciação científica nessa instituição, sendo bolsista FAPESP, e desde então nunca mais parei, sabia que a melhor escolha seria uma pós-graduação nessa universidade.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira do Santos**, e a presidente da Comissão de Pós-Graduação, **Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**, pela oportunidade em realizar pós-graduação em nível de Doutorado nesta instituição.

Às secretárias da pós-graduação por toda dedicação e ajuda.

À **Dalva** e **Marista** por toda dedicação, suporte e carinho, é gratificante poder contar com toda ajuda de vocês durante todo o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)** – Código de financiamento 001

*“ Em todo o universo não há nada que possa nos
separar do amor de Deus, que é nosso por
meio de Cristo Jesus, o nosso Senhor”.*

Romanos 8:39

ABSTRACT

Fluoride effect on parameters related to glucose homeostasis in NOD mice: using proteomic analysis of liver and gastrocnemius muscle to unravel the underlying mechanisms

Water fluoridation is an important public health measure for the control of dental caries. Recent animal studies have shown that low doses of fluoride (F) in the drinking water, similar to those found in public water supplies, increase insulin sensitivity and reduce blood glucose. In the present study we evaluated the effects of low-level F exposure through the drinking water on glucose homeostasis in female NOD mice. Seventy-two 6-week mice were randomly divided into 2 groups according to the concentration of F in the drinking water (0-control, or 10 mg/L) they received for 14 weeks. After the experimental period the blood was collected for analyses of plasma F, glucose and insulin. Liver and gastrocnemius muscle were collected for proteomic analysis. Plasma F concentrations were significantly higher in the F-treated than in the control group. Despite treatment with fluoridated water reduced plasma levels glucose by 20% compared to control, no significant differences were found between the groups for plasma glucose and insulin. In the muscle, treatment with fluoridated water increased the expression of proteins related to muscle contraction, while in the liver, there was an increase in expression of antioxidant proteins and in proteins related to carboxylic acid metabolic process. Remarkably, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was found exclusively in the liver of control mice. The reduction in PEPCK, a positive regulator of gluconeogenesis, thus increasing glucose uptake, might be a probable mechanism to explain the anti-diabetic effects of low doses of F, which should be evaluated in further studies.

Keywords: Diabetes Mellitus, Type 1.Sodium Fluoride. Proteomics

RESUMO

Efeito do fluoreto em parâmetros relacionados à homeostasia da glicose em camundongos NOD: uso da análise proteômica do fígado e músculo gastrocnêmio para revelar os mecanismos envolvidos

A fluoretação da água é uma importante medida de saúde pública para o controle da cárie dentária. Estudos recentes em animais mostraram que baixas doses de flúor (F) na água potável, semelhantes às encontradas no abastecimento público de água, aumentam a sensibilidade à insulina e reduzem a glicose no sangue. No presente estudo, avaliamos os efeitos da exposição de baixo nível de F através da água potável na homeostase da glicose em camundongas NOD fêmeas. Setenta e dois ratos de 6 semanas foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, de acordo com a concentração de F na água potável (controle 0 ou 10 mg / L) que receberam por 14 semanas. Após o período experimental, o sangue foi coletado para análises de plasma F, glicose e insulina. Fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados para análise proteômica. As concentrações plasmáticas de F foram significativamente maiores no grupo tratado com F do que no grupo controle. Apesar do tratamento com água fluoretada ter reduzido os níveis plasmáticos de glicose em 20% em comparação ao controle, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para glicose plasmática e insulina. No músculo, o tratamento com água fluoretada aumentou a expressão de proteínas relacionadas à contração muscular, enquanto no fígado houve aumento na expressão de proteínas antioxidantes e de proteínas relacionadas ao processo metabólico do ácido carboxílico. Notavelmente, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foi encontrada exclusivamente no fígado de camundongos controle. A redução do PEPCK, um regulador positivo da gliconeogênese, aumentando assim a captação de glicose, pode ser um mecanismo provável para explicar os efeitos antidiabéticos de baixas doses de F, que devem ser avaliadas em estudos futuros.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 1. Fluoreto de Sódio. Proteômica.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUCTION | 13 |
| 2 | ARTICLE | 21 |
| 3 | DISCUSSION..... | 45 |
| | REFERENCES | 51 |
| | ANNEX | 61 |

*I***NTRODUCTION**

1 INTRODUCTION

Fluoride (F) has a fundamental role in maintaining the oral health, because of its potential to control the development of dental caries lesions (Fukushima *et al.*, 2011). Dental caries is considered a chronic worldwide prevalent multifactorial disease, becoming a serious public health problem in developed countries, affecting 2.4 billion individuals, about 35.5% of the total population (Barrington *et al.*, 2019), including around 60- 90% of school-age children (Iheozor-Ejiofor *et al.*, 2015). In addition, one of the most important public health measures aimed at controlling tooth decay is the use of F, mainly through water and fluoridated toothpaste, which has resulted in dramatic reductions in tooth decay over the years (Bratthall, 1996; Mcdonagh *et al.*, 2000; Iheozor-Ejiofor *et al.*, 2015).

When ingested, F is absorbed by the gastrointestinal system. It is mainly deposited in calcified tissues, such as bones and teeth, and what is not retained in the body is excreted through the urine. Several factors affect the metabolism of F, such as acid-base status, physical exercise, nutritional status, age, altitude and genetic *background*. These factors alter the retention of F in the body, and, consequently, its toxicity (Buzalaf e Whitford, 2011). As a result of the avidity of F for calcified tissues, the most common manifestation due to chronic excessive intake of F is dental fluorosis, whose prevalence has increased in recent years (Khan *et al.*, 2005; Ramires *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2018).

Although, when excessive or chronic exposure to F occurs, this ion can interfere with important metabolic pathways in the biological systems, functioning as a potent inhibitor of many enzymes, including some of the glycolytic pathway (Barbier *et al.*, 2010). *In vivo* studies with animal conducted by our group have shown that chronic intake of F through drinking water can alter protein expression in the kidneys, liver, muscle and intestin of rats or mice (Kobayashi *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Lima Leite *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2017; Dionizio *et al.*, 2018; Araujo, T. T. *et al.*, 2019). Among the effects of chronic ingestion of excessive levels of F in soft tissues, both increased glucose intolerance and impaired insulin secretion have been reported (Rigalli *et al.*, 1990). The insulin resistance induced by F may be caused by a decrease in tyrosine phosphorylation, and an increase in phosphorylation

of pp185 serine (IRS-1 / IRS-2) in the substrates of the insulin receptor in adipocytes, which results in reduced insulin signaling (Chiba *et al.*, 2010; Chiba *et al.*, 2012). However, it has been reported by our group that the chronic treatment of rats with diabetes previously induced by streptozotocin with a low concentration of F (10 ppm, which is equivalent to the concentration of 1 ppm for humans, which is similar to artificially fluoridated water (Dunipace *et al.*, 1995)) increases insulin sensitivity, possibly by increasing the expression of liver proteins that form a complex with GRP-78 (Nakatsuka *et al.*, 2012), present in the endoplasmic reticulum, thus manifesting favorable effects on the signs of glucose intolerance (Lobo, J. G. V. M. *et al.*, 2015). These results are extremely important, as they open a new perspective for the investigation of the beneficial effects of naturally or artificially fluoridated water to control the development of type 1 diabetes (T1D). Moreover, a recent systematic review and meta-analysis showed that the prevalence of dental caries in children and adolescents with TD1 was highest in South America (84%) (Wang *et al.*, 2019). Due to this link between T1D and dental caries, it would be of high interest the implementation of a public health measure that could control both diseases at the same time.

DM1 is one of the most important public health problems, representing 10% of diabetes cases worldwide. It is an autoimmune disease characterized by the destruction of the β cells in the pancreas, reducing its ability to secrete insulin, which may lead to ketoacidosis in the absence of exogenous insulin (Dumont-Driscoll, 2012; Acharjee *et al.*, 2013). Although insulin administration can correct hyperglycemia, this treatment is still insufficient to prevent complications that can occur in the long term (Li *et al.*, 2016), such as retinopathies, nephropathies, vasculopathies and neuropathies that reduce life expectancy in 12 years (Nathan *et al.*, 2005; De Ferranti *et al.*, 2014; Harding *et al.*, 2016).

Several animal models have been used to understand the mechanisms involved in the development of DT1, providing tools to understand the autoimmune damage to islets, facilitating the early detection, prevention and treatment of DT1. These models have contributed to the understanding of important advances in TD1 therapy. The most used models involve the induction of diabetes by the administration of streptozotocin, as well as rodents that develop diabetes spontaneously, such as the Non Obese Diabetic (NOD) mice and the Bio-Breeding (BB) mice (Acharjee *et al.*, 2013; Mullen,

2017). The NOD and BB models better mimic the development of diabetes in humans than the models that involve the use of streptozotocin, as they develop diabetes spontaneously through an autoimmune disorder, similar to what occurs in humans, although they still show some differences in development of insulinitis, diabetes, characteristics of insulinitis and immune response, as well as influence of different environmental factors between rodent and human models (Table 1) (Mullen, 2017).

Table 1. Characteristics of type 1 diabetes and insulinitis in humans, NOD mice and BB rats (Mullen, 2017)

| | Humans | NOD mice | BB mice |
|---|---|--|--|
| Development of insulinitis and diabetes | <ul style="list-style-type: none"> - Slightly higher in males - more common in young | <ul style="list-style-type: none"> - Higher in female - Insulinitis starts at 2-4 week in female and at 5-7 week in males - Hyperglycemia develops at 12-30 week - At 30 weeks, 90-100% of females and 50-80% of males become diabetic | <ul style="list-style-type: none"> - No sex difference - insulinitis is detected in the fifth week - Hyperglycemia and ketoacidosis develop from 8-17 weeks |
| Features of insulinitis | <ul style="list-style-type: none"> - Contains fewer infiltrates, predominantly CD8⁺ T cells - Common infiltrated inside the islet - Number of infiltrated cells is not large | <ul style="list-style-type: none"> - Often starts with peri-insulinitis and then the cells infiltrate the islets - Various islet infiltrates consist of dendritic cells, macrophages, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, B cells and NK cells | <ul style="list-style-type: none"> - Immune cells infiltrate the islets, but to a lesser extent on their peripheries - Peri-insulinitis is not severe - infiltrating cells are similar to those of NOD mice |
| Immune characteristics | <ul style="list-style-type: none"> - Reduced suppression of autologous CD4⁺ T cells by CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ cells in newly diagnosed patients with long-standing DT1 | <ul style="list-style-type: none"> - Imbalance between autoreactive T cells and FoxP3⁺ Treg cell - Reduced ability of Treg cells to suppress T cell proliferation | <ul style="list-style-type: none"> - Specific T-cell lymphopenia - Impaired Treg cell function |
| Autoantibodies | <ul style="list-style-type: none"> - Present in 70% of recently diagnosed TD1 cases, including IAA, GAD-65A, IA-2nd | <ul style="list-style-type: none"> - Presence of IAA, GAD76A, absence of IA-2A | <ul style="list-style-type: none"> - Presence of IAA, GAD-65A, but levels are lower than in humans, absence of IA-2A |
| Environmental factors | <ul style="list-style-type: none"> - The incidence of viral infection - influence of environmental factors | <ul style="list-style-type: none"> - Increased incidence in Specific Pathogen Free conditions and is reduced by viral infection | <ul style="list-style-type: none"> - excellent model for testing various environmental factors |

The NOD mice are widely used in studies involving DT1 due to the excellent genetic characterization, development of monoclonal antibodies and congenic strains (Kachapati *et al.*, 2012; Pearson *et al.*, 2016; Mullen, 2017). The NOD mouse model was developed in Japan in the 1970s, becoming well established in the 1980s (Makino *et al.*, 1980). Diabetes is caused by the selective destruction of β cells in the pancreatic islets after the infiltration of autoreactive immune cells. In NOD mice, the cellular infiltrate begins with macrophages and dendritic cells invading the outside of the islets. CD45⁺ cells are present around the islets in 4 weeks and expand into the islets quickly between 8 and 14 weeks. When insulinitis is well established (12-14 weeks), lymphocytes become the dominant cells, while macrophages CD11b⁺ and F4⁸⁰⁺ are found in fewer numbers (Magnuson *et al.*, 2015). Cytokines and soluble mediators produced by activated macrophages accelerate the recruitment of dendritic cells, being essential for the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Young *et al.*, 1989; Jun *et al.*, 1999; Yoon e Jun, 2001). Natural killer cells (NK), which are normally associated with defenses against viruses and cells affected by intracellular pathogens, also infiltrate the islets and contribute to β cell apoptosis, both directly through perforin and granzyme-mediated cytotoxicity, and indirectly through the release of pro-inflammatory cytokines (Pearson *et al.*, 2016; Mullen, 2017).

In comparison to rodents, insulinitis in humans is detected less frequently and in a relatively lower percentage (about 10%) in the islets of patients with T1D. The number of infiltrating cells is also lower. Insulinitis appears more frequently in individuals who early develop T1D and can be seen soon after the onset of DT1 (Imagawa *et al.*, 2001; Willcox *et al.*, 2009). Positive insulinitis in humans is defined as more than 3 islets containing more than 15 lymphocytes in the islet or peri-islet (Morgan *et al.*, 2014). This small number of lymphocyte infiltrates is significant, because the islets of non-diabetic individuals rarely contain more than 5 lymphoid cells in a single section (Morgan *et al.*, 2014). The infiltrates are generally dominated by CD8⁺ and CD4⁺ cells with a variable frequency of B lymphocytes (Willcox *et al.*, 2009; Coppieters *et al.*, 2012; Arif *et al.*, 2014). The differences between human and rodent insulinitis may reflect fluctuations over time or merely the much faster progression of diabetes in rodents (Morgan *et al.*, 2014).

Thus, studies using an animal model of diabetes more similar to what occurs in humans (Kachapati *et al.*, 2012; Mullen, 2017) are important to provide additional

subsidies to our previous findings (Lobo, J. G. V. M. *et al.*, 2015), as well as to clarify the mechanisms involved. Our group recently completed a study in which NOD mice aged 35 to 60 days were treated for 21 days with water containing 0, 10 or 50 mgF/L. It was observed that the animals that received water containing 10 mgF/L had a significantly lower glycemia and a significantly higher % β cell function in relation to the control animals. The exposure of the animals to the low concentration of F (10 mgF/L) significantly altered the expression of proteins in the liver and gastrocnemius muscle of the animals. Among the proteins with altered expression in the liver of animals treated with 10 mgF/L, the presence of glutathione S-transferase P2 exclusively in this group was highlighted, as well as of heat shock-related 70 kDa protein 2, which are proteins involved in the antioxidant defense, in the liver (Malvezzi *et al.*, 2019). These results indicate that the exposure to water containing 10 mgF/L would increase the antioxidant defense in the liver of mice, which had already been described by our group in rats treated with 15 mgF/L (Iano *et al.*, 2014). It has been reported that the lower expression of genes associated with antioxidant defense mechanisms contributes to damage to β cells and to the development of diabetes in BB rats, which show an underexpression in the islets of several genes involved in the metabolism of reactive species of oxygen, including members of the glutathione S-transferase (GST) family, superoxide dismutases, peroxidases and peroxiredoxins. BB rats still have significantly lower plasma GST activity. In addition, systemic administration of the antioxidant N-acetylcysteine to BB rats reduces the severity of insulinitis and delays (but does not prevent) the onset of diabetes (Bogdani *et al.*, 2013). Thus, it was hypothesized that the increased antioxidant defense induced by F, thus delaying or preventing T1D, could possibly help to explain the lower plasma glucose levels observed in the mice treated with water containing 10 mgF/L, which should be better investigated.

However, in our recent study (Malvezzi *et al.*, 2019), male NOD mice were used because they are more easily available. In addition, the animals were killed between 9 and 12 weeks of age. However, it is known that female NOD mice develop insulinitis earlier (between 2-4 weeks) and become 90-100% diabetic with 30 weeks of ages, while male NOD mice develop insulinitis between 5-7 weeks and only 50-80% become diabetic (Mullen, 2017). Therefore, further studies using female NOD mice and longer treatment times are needed to provide more evidence about the potential of fluoridated water to prevent or delay the onset of diabetes. These data, if confirmed in humans,

are relevant from the point of view of Public Health, as water fluoridation is considered one of the 10 best Public Health measures of the 20th century in the control of dental caries (Centers for Disease e Prevention, 1999) and has excellent cost-benefit ratio (Ran *et al.*, 2016), in addition to being an important agent in the prevention of dental caries in patients with diabetes (Wang *et al.*, 2019).

This dissertation is presented in the form of an article, in which we evaluated in female NOD mice the effect of exposure to F through drinking water on parameters related to glucose homeostasis. Proteomic analysis of the liver and gastrocnemius muscle was employed as a tool to unravel the possible mechanisms involved in this effect.

*R*EFERENCES

REFERENCES

ACHARJEE, S. et al. Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 269-276, Aug 2013. ISSN 1499-2671. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339417400012 >.

AMARAL, S. L. et al. Effect of chronic exercise on fluoride metabolism in fluorosis-susceptible mice exposed to high fluoride. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3211, Feb 16 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453343> >.

ARAUJO, T. T. et al. Changes in energy metabolism induced by fluoride: Insights from inside the mitochondria. **Chemosphere**, v. 236, p. 124357, Dec 2019. ISSN 1879-1298 (Electronic) 0045-6535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31325826> >.

ARAUJO, T. T. et al. Changes in energy metabolism induced by fluoride: insights from inside the mitochondria. **Chemosphere**, v. in press, 2019.

ARIF, S. et al. Blood and Islet Phenotypes Indicate Immunological Heterogeneity in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3835-3845, Nov 2014. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000343966100032 >.

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 319-33, Nov 5 2010. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650267> >.

BARRINGTON, G. et al. Obesity, dietary sugar and dental caries in Australian adults. **Int Dent J**, v. 69, n. 5, p. 383-391, Oct 2019. ISSN 1875-595X (Electronic) 0020-6539 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31157414> >.

BOGDANI, M. et al. Biobreeding rat islets exhibit reduced antioxidative defense and N-acetyl cysteine treatment delays type 1 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 111-123, Feb 2013. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315733400003 >.

BRATTHALL, D. Dental caries: intervened--interrupted--interpreted. Concluding remarks and cariography. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 4 (Pt 2), p. 486-91, Aug 1996. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8930602> >.

BUZALAF, M. A. R. Review of Fluoride Intake and Appropriateness of Current Guidelines. **Adv Dent Res**, v. 29, n. 2, p. 157-166, Mar 2018. ISSN 1544-0737 (Electronic) 0895-9374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29461104> >.

BUZALAF, M. A. R.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism. **Monogr Oral Sci**, v. 22, p. 20-36, 2011. ISSN 0077-0892 (Print) 0077-0892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701189> >.

CARVALHO, J. G. et al. Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53261, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308176> >.

CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Ten great public health achievements--United States, 1900-1999. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 48, n. 12, p. 241-3, Apr 2 1999. ISSN 0149-2195 (Print) 0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220250> >.

CHIBA, F. Y. et al. NaF treatment increases TNF-alpha and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 136, p. 3-7, Apr 2012. ISSN 0022-1139. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302976900001 >.

CHIBA, F. Y. et al. Insulin Signal Decrease in Muscle but Not in the Liver of Castrated Male Rats from Chronic Exposure to Fluoride. **Fluoride**, v. 43, n. 1, p. 25-30, Jan-Mar 2010. ISSN 0015-4725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278509600005 >.

COPPIETERS, K. T. et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J Exp Med**, v. 209, n. 1, p. 51-60, Jan 16 2012. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213807> >.

DABROWSKA, E.; LETKO, R.; BALUNOWSKA, M. Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. **Adv Med Sci**, v. 51 Suppl 1, p. 91-5, 2006. ISSN 1896-1126 (Print) 1896-1126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17458067> >.

DE FERRANTI, S. D. et al. Type 1 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association and American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 37, n. 10, p. 2843-2863, Oct 2014. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000343582400040 >.

DIONIZIO, A. S. et al. Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: insights from proteomics and enteric innervation analysis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3180, Feb 16

2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453425> >.

DUMONT-DRISCOLL, M. C. Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research Foreword. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 42, n. 10, p. 267-268, Nov-Dec 2012. ISSN 1538-5442. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312169800001 >.

DUNIPACE, A. J. et al. Correlation of Fluoride Levels in Human Plasma, Urine and Saliva. **Journal of Dental Research**, v. 74, p. 134-134, 1995. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QA00800976 >.

FUKUSHIMA, R. et al. Factors associated with fluoride concentrations in whole and parotid ductal saliva. **Caries Res**, v. 45, n. 6, p. 568-73, 2011. ISSN 1421-976X (Electronic) 0008-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142657> >.

HARDING, J. L. et al. Age-Specific Trends From 2000-2011 in All-Cause and Cause-Specific Mortality in Type 1 and Type 2 Diabetes: A Cohort Study of More Than One Million People. **Diabetes Care**, v. 39, n. 6, p. 1018-1026, Jun 2016. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000376980500029 >.

HUGHES, R. N. Sex does matter: comments on the prevalence of male-only investigations of drug effects on rodent behaviour. **Behav Pharmacol**, v. 18, n. 7, p. 583-9, Nov 2007. ISSN 0955-8810 (Print) 0955-8810 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912042> >.

IANO, F. G. et al. Effects of chronic fluoride intake on the antioxidant systems of the liver and kidney in rats. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 168, p. 212-217, Dec 2014. ISSN 0022-1139. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347019300032 >.

IHEOZOR-EJIOFOR, Z. et al. Water fluoridation for the prevention of dental caries. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 6, p. CD010856, Jun 18 2015. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092033> >.

IMAGAWA, A. et al. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type I diabetes - Close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1269-1273, Jun 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168961900006 >.

JUN, H. S. et al. Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice.

Diabetes, v. 48, n. 1, p. 34-42, Jan 1999. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892220> >.

JUNG, D. W. et al. A Unique Small Molecule Inhibitor of Enolase Clarifies Its Role in Fundamental Biological Processes. **Acs Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 1271-1282, Jun 2013. ISSN 1554-8929. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320979300022 >.

JUNG, D. W.; KIM, W. H.; WILLIAMS, D. R. Chemical genetics and its application to moonlighting in glycolytic enzymes. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, p. 1756-1761, Dec 2014. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000345427100046 >.

KACHAPATI, K. et al. The non-obese diabetic (NOD) mouse as a model of human type 1 diabetes. **Methods Mol Biol**, v. 933, p. 3-16, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893397> >.

KHAN, A.; MOOLA, M. H.; CLEATON-JONES, P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. **SADJ**, v. 60, n. 10, p. 418-21, Nov 2005. ISSN 1029-4864 (Print) 1029-4864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438356> >.

KOBAYASHI, C. A. et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. **Chem Biol Interact**, v. 180, n. 2, p. 305-11, Jul 15 2009. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497429> >.

LEITER, E. H.; PROCHAZKA, M.; COLEMAN, D. L. The non-obese diabetic (NOD) mouse. **Am J Pathol**, v. 128, n. 2, p. 380-3, Aug 1987. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303953> >.

LI, L. R. et al. Infusion with Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Improves beta-cell Function in Patients and Non-obese Mice with Severe Diabetes. **Scientific Reports**, v. 6, Dec 1 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000388979100001 >.

LIMA LEITE, A. et al. Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106646, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25180703> >.

LOBO, J. G. et al. Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. **J Dent Res**, v. 94, n. 7, p. 990-7, Jul 2015. ISSN 1544-0591

(Electronic) 0022-0345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861800> >.

LOBO, J. G. V. M. et al. Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 7, p. 990-997, Jul 2015. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000356621000018 >.

MAGNUSON, A. M. et al. Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 5, p. 1511-1516, Feb 3 2015. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000349087700069 >.

MAKINO, S. et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**, v. 29, n. 1, p. 1-13, Jan 1980. ISSN 0007-5124 (Print) 0007-5124 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6995140> >.

MALVEZZI, M. et al. Low-level fluoride exposure reduces glycemia in NOD mice. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 168, p. 198-204, Oct 30 2018. ISSN 1090-2414 (Electronic) 0147-6513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388537> >.

_____. Low-level fluoride exposure reduces glycemia in NOD mice. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 168, p. 198-204, Jan 30 2019. ISSN 1090-2414 (Electronic) 0147-6513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388537> >.

MCDONAGH, M. S. et al. Systematic review of water fluoridation. **BMJ**, v. 321, n. 7265, p. 855-9, Oct 7 2000. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-8138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021861> >.

MELO, C. G. S. et al. Enteric innervation combined with proteomics for the evaluation of the effects of chronic fluoride exposure on the duodenum of rats. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1070, Apr 21 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432311> >.

MORGAN, N. G. et al. Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. **IUBMB Life**, v. 66, n. 11, p. 723-34, Nov 2014. ISSN 1521-6551 (Electronic) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25504835> >.

MULLEN, Y. Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes. **Pancreas**, v. 46, n. 4, p. 455-466, Apr 2017. ISSN 0885-3177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000397725100007 >.

NAKATSUKA, A. et al. Vaspin Is an Adipokine Ameliorating ER Stress in Obesity as a Ligand for Cell-Surface GRP78/MTJ-1 Complex. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2823-2832, Nov 2012. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312041600020 >.

NATHAN, D. M. et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2643-2653, Dec 22 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234094400005 >.

PEARSON, J. A.; WONG, F. S.; WEN, L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. **J Autoimmun**, v. 66, p. 76-88, Jan 2016. ISSN 1095-9157 (Electronic) 0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403950> >.

PEREIRA, H. et al. Proposed mechanism for understanding the dose- and time-dependency of the effects of fluoride in the liver. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 358, p. 68-75, Nov 1 2018. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217653> >.

PEREIRA, H. A. et al. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75343, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069403> >.

RAMIRES, I. et al. Prevalence of dental fluorosis in Bauru, Sao Paulo, Brazil. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 2, p. 140-3, Apr 2007. ISSN 1678-7765 (Electronic) 1678-7757 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089118> >.

RAN, T.; CHATTOPADHYAY, S. K.; COMMUNITY PREVENTIVE SERVICES TASK, F. Economic Evaluation of Community Water Fluoridation: A Community Guide Systematic Review. **Am J Prev Med**, v. 50, n. 6, p. 790-796, Jun 2016. ISSN 1873-2607 (Electronic) 0749-3797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26776927> >.

REUS, G. Z. et al. Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 8637970, 2019. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30944699> >.

RIGALLI, A. et al. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. **Calcif Tissue Int**, v. 46, n. 5, p. 333-8, May 1990. ISSN 0171-967X (Print) 0171-967X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2110856> >.

SMARR, B. L. et al. Sex differences in variability across timescales in BALB/c mice. **Biol Sex Differ**, v. 8, p. 7, 2017. ISSN 2042-6410 (Electronic) 2042-6410 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28203366> >.

WANG, Y. et al. Prevalence of dental caries in children and adolescents with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Bmc Oral Health**, v. 19, n. 1, Sep 14 2019. ISSN 1472-6831. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000486144600001 >.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Insulation and crystallisation of the fermenting process of Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, n. 6, p. 384-421, Feb 1942. ISSN 0366-0753. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000200763000008 >.

WILLCOX, A. et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 155, n. 2, p. 173-181, Feb 2009. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262282400007 >.


YOON, J. W.; JUN, H. S. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 928, p. 200-11, Apr 2001. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795511> >.

YOUNG, L. H. et al. In vivo expression of perforin by CD8+ lymphocytes in autoimmune disease. Studies on spontaneous and adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol**, v. 143, n. 12, p. 3994-9, Dec 15 1989. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480383> >.

ZUO, H. et al. Toxic effects of fluoride on organisms. **Life Sciences**, v. 198, p. 18-24, Apr 1 2018. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000428179300003 >.

ANNEX

ANNEX 1



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso Animais

CEEPA-Proc. Nº 013/2017.

Bauru, 20 de novembro de 2018.

Senhora Professora,

Em atenção à sua solicitação para o acréscimo de um grupo controle de camundongos C57BL/6J, de 16 (dezesesseis) animais, e também a alteração da eutanásia para deslocamento cervical, com justificativas baseadas na literatura científica, no projeto de pesquisa denominado **"Efeito do fluoreto em parâmetros relacionados à sensibilidade à insulina e na expressão de proteínas no fígado, músculo e ilhotas de Langerhans"** tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), após análise ética por um relator, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, nesta data.

| | |
|----------------------|---|
| Vigência do projeto: | <i>Fevereiro/2018 a Dezembro/2018</i> |
| Espécie/Linhagem1: | <i>Camundongo C57BL/6J = 16</i> |
| Espécie/Linhagem: | <i>Camundongo Isogênico/NOD/Unib (Non Obese Diabetic)</i> |
| Nº de animais: | <i>40 (iniciais) + 20 (10/05/2018) + 13 (26/06/2018) = 73</i> |
| Peso/Idade | <i>25g / 5 semanas</i> |
| Sexo: | <i>Fêmeas</i> |
| Origem: | <i>Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP</i> |

Carla

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Professora do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: ceua@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso Animais

(Cont. 2/2)

Esta CEUA solicita que ao final da pesquisa 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,

Cassia Maria Fischer Rubira
Profª Drª Cassia Maria Fischer Rubira

Vice-Presidente no exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais