

**unesp**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus Araçatuba  
Departamento de Ciências Básicas**

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**AMANDA GOMES PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES ÓSSEOS E SINAL INSULÍNICO EM  
RATAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM FLUORETO DE  
SÓDIO**

**ARAÇATUBA**

**2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**Campus Araçatuba**  
**Departamento de Ciências Básicas**

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**AMANDA GOMES PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES ÓSSEOS E SINAL INSULÍNICO EM  
RATAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM FLUORETO DE  
SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adj. Doris Hissako Sumida.

**ARAÇATUBA**

**2016**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436a      Pereira, Amanda Gomes.  
              Avaliação de marcadores ósseos e sinal insulínico em  
              ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio /  
              Amanda Gomes Pereira. - Araçatuba, 2016  
              58 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

              Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
              Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
              Orientadora: Profa. Doris Hissako Sumida

              1. Fluoreto de sódio 2. Resistência à insulina 3.  
Ovariectomia

              I. Título

CDD 612

## DADOS CURRICULARES

Nascimento: 03/04/1990

Filiação: Dionísio Fernando Pereira

Márcia Gomes Pereira

**2008/2012:** Graduação em Nutrição – Universidade Paulista – UNIP Araçatuba

**2012/2014:** Especialização em Nutrição Clínica – Universidade do Sagrado Coração – USC Bauru

**2014/2016:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia/SBFis – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba/FOA – Araçatuba – SP.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Doris Hissako Sumida, pela orientação, confiança e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes dois anos de mestrado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas.

À todos os amigos e colegas de laboratório, Maria Sara Coutinho Mattera, Thaís Verônica Saori Tsosura, Natália Francisco Scaramele, Rita de Cássia Alves Nunes e em especial Fernando Yamamoto Chiba e Renato Felipe Pereira, que participaram ativamente da execução deste projeto.

Aos meus amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas, Murilo, Simone, Jéssica, Victor, Fernanda, Carluci, por todos os momentos de descontração e pela amizade.

À todos os professores e alunos do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo agradável e pacífico convívio ao longo deste tempo.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FOA/UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Lilian Sayuri Mada, pela atenção dispensada e grande disposição em atender.

Aos funcionários da Biblioteca, Claudio Hideo Matsumoto, Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Denise Haruyo Nakamura, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Luis Claudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Claudia de Castro Benez, sempre prontos para nos ajudar.

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Maurício Hiromi Tutumi, Patrick Santos Nogueira da Silva e Reinaldo Inácio Mendes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

*“Words are, in my not-so-humble opinion, our most  
inexhaustible source of magic. Capable of both  
inflicting injury, and remedying it.”*

*(Albus Dumbledore)*

PEREIRA, A.G. **Avaliação de marcadores ósseos e sinal insulínico em ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

## RESUMO

O flúor é um elemento traço essencial para a manutenção da saúde óssea, devido à capacidade de estimular a proliferação osteoblástica, levando ao aumento da formação óssea. No entanto, a ingestão excessiva de fluoreto de sódio pode prejudicar o metabolismo dos carboidratos, promovendo hiperglicemia, resistência à insulina e alterações no sinal insulínico. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento crônico com NaF no metabolismo ósseo, na sinalização insulínica e nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina, flúor, TNF- $\alpha$  e osteocalcina em ratas ovariectomizadas. Trinta e seis ratas Wistar ovariectomizadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: OVX-C, como grupo controle, e grupo OVX-F, que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg F/L) na água de beber durante 42 dias. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose e insulina, seguido pelo cálculo do HOMA-IR. A fosforilação em serina da Akt foi avaliada pelo método de Western blotting. As tíbias direita e esquerda foram coletadas para análises imuno-histoquímica e histomorfométrica. Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento crônico com NaF promoveu resistência à insulina, diminuição do sinal insulínico, aumento das concentrações plasmáticas de insulina, flúor, osteocalcina e TNF- $\alpha$ ; diminuição da área óssea trabecular da tíbia e alterações nos marcadores do metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas. Esses resultados sugerem cautela no uso de NaF para o tratamento da osteoporose, especialmente em mulheres na pós-menopausa.

**Palavras-chave:** Fluoreto de sódio; resistência à insulina; ovariectomia; TNF-  $\alpha$  marcadores ósseos

PEREIRA, A.G. **Evaluation of bone markers and insulin signalling in ovariectomized rats treated with sodium fluoride.** 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

## **ABSTRACT**

Fluoride is an essential trace element for the maintenance of bone health due its capacity of stimulating the proliferation and osteoblastic activity that can lead to increase bone formation. However, excessive sodium fluoride intake can impair carbohydrate metabolism, promoting hyperglycemia, insulin resistance and change in insulin signal. Thus, this study aimed to evaluate the effect of chronic treatment with NaF in bone metabolism; insulin signaling; plasma concentrations of glucose, insulin, TNF- $\alpha$ , osteocalcin and fluoride in ovariectomized rats. Thirty six ovariectomized Wistar rats were randomly distributed into two groups: OVX-C, as control group, and OVX-F group, undergoing treatment with NaF (50mg F/L) in drinking water for 42 days. Plasma concentration of glucose and insulin were assessed, followed by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). The Akt serine phosphorylation was evaluated by western blotting. The right and left tibias were collected for immunohistochemical and histomorphometric analysis, respectively. The chronic treatment with NaF promoted insulin resistance; decreased insulin signal; increase in the plasma concentration of insulin, fluoride, osteocalcin and TNF- $\alpha$ ; decreased trabecular bone area of the tibia and changes in bone metabolism markers in ovariectomized rats. These results suggest caution in the use of NaF for the treatment of osteoporosis especially in postmenopausal woman.

**Key words:** Fluoride; Insulin resistance; Osteoporosis; Bone loss.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01** - Massa corpórea (g) de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber (50 mg/L) durante 42 dias. Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM de 20 (OVX-C) e 20 (OVX-F) animais..... 30
- FIGURA 02** - Média da ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores estão apresentados como Média  $\pm$  EPM de 20 (OVX-C) e 20 (OVX-F) animais..... 31
- FIGURA 03** - Média da ingestão hídrica de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM de 20 (OVX-C) e 20 (OVX-F) animais..... 32
- FIGURA 04** - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo esponjoso na epífise proximal tibial no grupo controle (A) e no grupo tratado com flúor (B). Abreviações e símbolos: **bt**, trabécula óssea. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200  $\mu$ m..... 33
- FIGURA 05** - Porcentagem de área óssea trabecular da epífise proximal tibial de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo tratado com fluoreto de sódio (50mg/L) administrado na água de beber (OVX-F). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \*p<0,05..... 34
- FIGURA 06** - Imunomarcacão de CASPASE 3, RANKL, OPG, TRAP, RUNX2 e OCN em tíbias de ratas dos grupos OVX-C e OVX-F pela análise imuno-histoquímica (Imunomarcacões indicadas pelas setas) ..... 35
- FIGURA 07** - Avaliação imuno-histoquímica das proteínas: em A: Caspase-3, em B: RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kapa B), em C: OPG (Osteoprotegerina), em D: TRAP (Fosfatase ácida tartarato-resistente), em E: Runx2 (Runt-related transcription factor 2) e em F: Osteocalcina da tíbia de ratas

dos grupos OVX-C e OVX-F. Os valores são apresentados como mediana, n=8. \*p<0,05..... 36

**FIGURA 08 -** Efeito do estímulo insulínico sobre a fosforilação em serina da Akt, em tecido muscular gastrocnêmio (GM) de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F) que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L). Em A, auto-radiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE e processadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Em B, o grau de fosforilação em serina da Akt, após estímulo insulínico, foi expresso em unidades arbitrárias por µg de proteína amostrada. Valores são apresentados como Média ± EPM de 4 experimentos. #p<0,05 OVX-C (-) vs. OVX-C (+); \*p <0,05 OVX-C (+) vs. OVX-F (+) ..... 37

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	Concentração plasmática glicose, insulina, fluoreto, TNF- $\alpha$ e índice HOMA-IR de ratas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C) .....	38
-------------------	--	----

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>21</b>
3.1. ANIMAIS .....	21
3.2. AVALIAÇÃO DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO EM SERINA DA AKT .....	22
3.2.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	22
3.2.2. <i>“Western blotting”</i> .....	22
3.3. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA .....	24
3.4. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	25
3.5. DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA .....	26
3.6. DETERMINAÇÃO DA INSULINEMIA .....	27
3.7. HOMA-IR.....	27
3.8. DETERMINAÇÃO DA OSTEOCALCINA .....	27
3.9. DETERMINAÇÃO DE TNF-A .....	28
3.10. DETERMINAÇÃO DO ÍON FLÚOR .....	28
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. MASSA CORPÓREA (G) .....	30
4.2. INGESTÃO ALIMENTAR (G) .....	30
4.3. INGESTÃO HÍDRICA (ML) .....	31
4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	32
4.5. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	33
4.6. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	34
4.7. AVALIAÇÃO DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO EM SERINA DA AKT EM TECIDO MUSCULAR GASTROCNÊMIO. ....	37
4.8. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE, INSULINA, FLUORETO, OSTEOCALCINA, TNF-A E ÍNDICE HOMA-IR .....	38
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido multifuncional e metabolicamente ativo, que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação pela ação combinada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (KATCHBURIAN; CERRI; 2002). O processo de remodelação óssea se desenvolve com base em dois processos antagônicos, porém acoplados: a formação e a reabsorção óssea. (VIEIRA, 1999). O controle da atividade, proliferação e diferenciação das células ósseas está sob a ação de diversos fatores sistêmicos e locais, cuja ação combinada é indispensável para a manutenção da homeostase do tecido ósseo (RAISZ; RODAN, 1998). A alteração dessa homeostase pode levar à redução e deterioração da massa e da microarquitetura óssea, aumentando a fragilidade esquelética e risco de fraturas, favorecendo o desenvolvimento de osteoporose (PRENTICE, 1997).

A osteoporose é uma doença ósteo-metabólica que atinge especialmente mulheres após a menopausa. Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), uma a cada quatro mulheres com mais de 50 anos desenvolve a doença. No Brasil, a cada ano ocorrem cerca de 2,4 milhões de fraturas decorrentes da osteoporose (SBEM, 2016).

Fisiologicamente a matriz óssea é continuamente depositada por osteoblastos e reabsorvida nos locais onde os osteoclastos estão ativos, normalmente, há equilíbrio entre deposição e reabsorção óssea. Na osteoporose existe desproporção entre atividade osteoblástica e osteoclástica, com predomínio da última (GALI, 2001). Uma forma de avaliar atividade osteoblástica e osteoclástica dos ossos é por meio da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo. Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em marcadores de formação e marcadores de reabsorção óssea (ALLEN *et al.*, 2000). Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da ação destas células; da mesma maneira, os marcadores de reabsorção medem a ação dos osteoclastos (VIEIRA, 1999).

A regulação local da formação e da função das células ósseas sofre influência de fatores autócrinos e parácrinos secretados pelas células, além de fatores da matriz óssea liberados durante a reabsorção. Outras substâncias que representam a classe de fatores locais como fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas atuam sobre as células ósseas (MANOLAGAS, 2000).

Entre os fatores sistêmicos, o estrógeno apresenta grande importância para a homeostase do tecido ósseo regulando a expressão de proteínas nesse tecido (RIGGS, 2000) e a deficiência deste pode causar liberação de citocinas, como interleucina – 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que desempenham papel reabsortivo no tecido ósseo (ZHOU *et al.*, 2009). Sabe-se que a queda nas taxas desse hormônio está relacionada à ocorrência de osteoporose (ZHOU *et al.*, 2009).

Evidências mostram que o estrógeno atua sobre os monócitos promovendo redução dos níveis de IL-1 e TNF- $\alpha$  que estimulam a produção de outras citocinas, como IL-6, Fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), que promovem a fusão de células precursoras de osteoclastos, dessa forma, o estrógeno atua inibindo a formação de osteoclastos (PACIFICI, 1996).

O estrógeno também atua sobre as células T (responsáveis pela imunidade celular) e, após a ovariectomia, ocorre aumento da produção de TNF- $\alpha$  por essas células. Ao se ligar ao receptor p55-TNF- $\alpha$ , o TNF- $\alpha$  induz a liberação de M-CSF e RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear- $\kappa$ B), fatores que promovem a fusão dos progenitores de osteoclastos (CENCI *et al.* 2000).

Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o estrógeno promove redução dos níveis de RANKL e aumento da produção de osteoprotegerina (OPG) – competidor de RANK (BORD *et al.*, 2003). Assim, a OPG, que apresenta níveis aumentados (ROGERS *et al.*, 2002), liga-se ao RANKL e impede a interação deste com o RANK (presente em precursores de osteoclastos), inibindo, conseqüentemente, a fusão dos precursores de osteoclastos (KAWAMOTO *et al.*, 2002) e impossibilitando, dessa forma, que haja reabsorção óssea (SILVA; RIBEIRO-ROTTA; PEREIRA; 2011).

A proteína RANKL está presente em precursores de osteoblastos, bem como pode ser encontrada livremente no microambiente ósseo (LACEY *et al.*, 1998). O RANKL atua em sinergismo com M-CSF, possibilitando a diferenciação dos osteoclastos independentemente da presença de células do estroma ósseo ou de 1,25 diidroxivitamina D3, e ativando osteoclastos maduros a reabsorver matriz óssea mineralizada (BURGESS *et al.*, 1999). O RANKL é secretado por osteoblastos e linfócitos T, e devido a este fato, poderia explicar algumas das anormalidades ósseas observadas em doenças autoimunes (JONES; BHALLA, 1993). Ademais, Takayanagi *et al.* (2002) demonstraram que o RANKL atua na manutenção da homeostasia óssea pela indução de interferon- $\beta$  dependente de c-Fos. Segundo esses pesquisadores, o RANKL ativa o RANK em pré-osteoclastos disparando sua maturação e sua capacidade de reabsorção óssea. (TAKAYANAGI *et al.*, 2002).

Em relação à reabsorção óssea, a enzima fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), especificamente a sua isoforma 5b, é considerada como o biomarcador mais sensível e específico, uma vez que essa glicoproteína é produzida por osteoclastos, macrófagos ativados e células dendríticas (SOUSA *et al.*, 2011). A TRAP é uma enzima não específica, podendo atuar na hidrólise de ésteres fosfato de fosfoproteínas da matriz óssea, como a osteopontina, sialoproteína óssea e osteonectina (EK-RYLANDER *et al.*, 1994). Foi proposto que esse marcador descreve o número de osteoclastos em adição à sua atividade (SOUSA *et al.*, 2011) e, devido a esse fato, essa enzima vem sendo utilizada para identificar osteoclastos em amostras de tecido.

Estudos demonstraram que a diminuição da reabsorção óssea também pode ser consequência do aumento da apoptose de osteoclastos, processo que leva à redução de seu número, promovida pelo estrógeno (GARCIA-MORENO *et al.*, 2004; TOMKINSON *et al.*, 1998). A apoptose é um mecanismo de morte celular (ANDIA *et al.*, 2006) e o resultado final de suas principais vias de ocorrência consiste na ativação da cascata das caspases (ZIMMERMAN; GREEN, 2001), que são proteases cisteínas que funcionam como executoras centrais do processo de apoptose.

As caspases podem ser divididas em iniciadoras e efetoras, com base em sua estrutura e no fim da cascata de morte celular (LOS *et al.*, 1999). As caspases

iniciadoras (caspase - 8 e caspase - 10) ativam as caspases efetoras subsequentes (caspase - 3, caspase - 6, caspase - 7) (LIU *et al.*, 1997). A caspase 3, também conhecida como CPP32, representa a principal caspase efetora na cascata da apoptose no interior das células (HAGUE *et al.*, 2004) e a detecção desta proteína pode ser considerada um indicador sensível e exclusivo da apoptose (GOWN & WILINGHAN, 2002).

Outra proteína importante relacionada ao metabolismo ósseo é a osteocalcina (OC). Essa proteína é secretada pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos e uma de suas funções está relacionada à ligação do cálcio à matriz óssea. O papel exato dessa proteína na remodelação óssea ainda não foi completamente elucidado, no entanto, mostrou-se como uma importante via de ativação da formação óssea por meio do seu efeito sobre os osteoblastos (HAN *et al.*, 2008). A expressão de osteocalcina está sob o controle do fator de transcrição relacionado com Runt 2 (Runx2), que é o mais precoce e específico indicador de osteogênese (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). A osteocalcina é essencial para a diferenciação dos osteoblastos e morfogênese óssea e atua como suporte para os ácidos nucléicos e os fatores de regulação envolvidos na expressão do gene do esqueleto (LIN *et al.*, 2011). Essa proteína também parece exercer um efeito à distância sobre as células  $\beta$ , adipócitos, músculos e outros tecidos periféricos, aumentando a utilização da glicose, reduzindo a gordura visceral e diminuindo a quantidade de triglicerídeos (BARROS, 2011).

Fulzele *et al.* e Ferron *et al.* (2010) apresentaram evidências de que a sinalização da insulina promove a ativação de osteoblastos, aumentando a produção de osteocalcina, a partir da matriz óssea para a circulação. Esse processo aumenta a secreção e a sensibilidade à insulina nos adipócitos.

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, que atua em diferentes tecidos, como o muscular e o adiposo e também no fígado, além de apresentar atividades metabólicas que incluem aumento da captação de glicose, síntese de glicogênio, proteínas e ácidos graxos, entre outros (PAULI *et al.*, 2009).

A sinalização intracelular insulínica inicia-se por meio da interação da insulina com seu receptor – o receptor de insulina (RIns) (ROTH *et al.*, 1975). O



RIns é uma proteína quinase composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes dissulfeto, com atividade quinase intrínseca (KASUGA *et al.*, 1982<sup>a</sup>). A subunidade beta do RIns, quando estimulada pela ação insulínica é capaz de se autofosforilar e ainda fosforilar substratos do receptor de insulina em resíduos de tirosina (KASUGA *et al.*, 1982<sup>a</sup>). Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica (EBINA *et al.*, 1987).

White (1998) descreveu dez substratos do RIns, como o IRS-1 a 4, Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS. Cai *et al.* (2003) descreveram mais dois substratos do receptor de insulina, pertencentes à família das proteínas IRS, o IRS-5 e IRS-6. Esse receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como, por exemplo, a pp185. Esse foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE *et al.*, 1985). Sun *et al.* (1991) observaram que em células transfectadas com o receptor de insulina humano, há um expressivo aumento da fosforilação da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

Sun *et al.*, em 1991, clonaram a pp185 e denominaram-na de IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina). Após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda dessa proteína. Essa nova proteína denominada de IRS-2 (ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995; TAMEMOTO *et al.*, 1994). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas por meio da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos knockout para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (ARAKI *et al.*, 1994). Foi demonstrado que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo knockout de IRS-1 (WITHERS *et al.*, 1998). O camundongo que não expressa o IRS-2 foi gerado em 1998 (WITHERS *et al.*, 1998) e apresenta fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido à ação insulínica anormal nos tecidos e à falência da atividade secretória das células  $\beta$ , além de redução significativa da massa de células  $\beta$  pancreáticas. (WITHERS *et al.*; 1998)

Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2) e ativá-las. Entre essas proteínas, está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-k). De acordo com Alessi *et al.* (1997), essa proteína, uma vez ativada, pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase - 1 dependente de fosfoinositideo (PK-1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). Essa proteína se apresenta em três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3 - e todas são ativadas pela fosforilação em treonina e serina (BELLACOSA *et al.*, 1998; KOHN *et al.*, 1996). A ativação dessa proteína é essencial para síntese de glicogênio (CROSS *et al.*, 1995), ação antiapoptótica (FRANKE *et al.*, 1997), regulação da síntese lipídica (KITAMURA *et al.*, 1999), síntese de proteínas (HAJDUCH *et al.*, 1998), regulação da expressão gênica (VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000) e transporte de glicose estimulado pela insulina (WANG *et al.*, 1999). Uma deficiência desse hormônio e/ ou incapacidade da insulina exercer adequadamente suas funções pode levar a uma hiperglicemia, caracterizando o diabetes mellitus (DM) (WHO, 1999).

No diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o pâncreas é capaz de produzir insulina, porém o corpo é incapaz de responder adequadamente aos seus efeitos, provocando um acúmulo de glicose no sangue (hiperglicemia). Com a progressão da doença pode ocorrer diminuição na secreção de insulina (GABBAY; CESARINI; DIB, 2003).

Rigalli *et al.* (1995) demonstraram que o tratamento agudo ou prolongado com altas doses de fluoreto de sódio (NaF) promove hiperglicemia, evidenciando que a homeostase da glicose sofre influência do NaF e essa alteração é similar à observada em diabetes mellitus.

Vários estudos demonstraram que o consumo de fluoreto em excesso ocasiona hiperglicemia (RIGALLI *et al.*, 1990; RIGALLI *et al.*, 1995; GRUCKA-MAMCZAR *et al.*, 2004; MCGOWN *et al.*, 1977; GRUCKA-MAMCZAR *et al.*, 2005). Entretanto, a maneira como esse fato ocorre ainda não está bem esclarecida.

Segundo CHIBA *et al.* (2012), o tratamento crônico com NaF (4mg/kg de p.c.) promoveu aumento na concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , que ocasiona a fosforilação do IRS-1 em serina, diminuindo o sinal insulínico. Em outro estudo,

foi demonstrado que ratos tratados com NaF apresentaram, após estímulo insulínico, uma diminuição no grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185) no tecido adiposo branco periepídídimo em relação ao grupo controle, que pode ser decorrente do aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (CHIBA *et al.*, 2010)

Uma pesquisa realizada por Trivedi (1993) com 25 pacientes entre 15 e 30 anos de idade com fluorose endêmica mostrou que 40% destes tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém essa anomalia foi revertida com a remoção do excesso do flúor na água consumida (TRIVEDI *et al.*, 1993).

O flúor pode estar presente naturalmente na água e é facilmente absorvido pela parede do estômago e do intestino delgado, e a absorção é mais rápida com o estômago vazio do que com a ingestão associada a outros elementos, ou seja, substâncias como cálcio, magnésio e alumínio reduzem a absorção, em função da formação de compostos complexos insolúveis (EKSTRAND; EHRNEBO, 1979; WHITFORD, 1999).

O fluoreto é um elemento traço essencial para a manutenção da saúde óssea, podendo interagir diretamente com matriz óssea mineral (YANG *et al.*, 2015; MOUSNY *et al.*, 2008)

Além disso, o flúor pode estimular a proliferação e atividade dos osteoblastos e da fosfatase alcalina, o que leva ao aumento da formação óssea (CARVALHO, 2005; YANG *et al.*, 2015). Sabendo-se disso, estudos têm sido realizados para avaliar os possíveis efeitos benéficos do uso do flúor como agente terapêutico para o tratamento da osteoporose (ROSSI *et al.*, 2010; RICH; ENSINCK, 1961; PAK, *et al.*, 1994).

Foi observado que a administração de doses de 50 a 75 mg/dia, aumenta a massa óssea em torno de 4 a 8% por ano durante 4 a 5 anos (CASTELO-BRANCO, 1998), porém alguns estudos demonstraram que a terapia com o flúor aumenta a taxa do osso mineral, mas não diminui a taxa de fraturas (MEUNIER *et al.*, 1998; KLEEREKOPER *et al.*, 1991). Em seu estudo, GUTTERIDGE *et al.* (2002) sugeriram que o aumento da densidade mineral óssea induzido pelo NaF em mulheres na pós-menopausa está associado ao aumento do risco de fraturas, e destacou que os sais de fluoreto, quando utilizados como terapia, devem ser

administrados em baixas dosagens, entre 11,5 mg e 20 mg, pois parecem oferecer maior segurança e eficácia.

BALENA *et al.* (1998) evidenciou que o efeito inconsistente do NaF em aumentar a resistência óssea é, em parte, devido à ineficiência em restaurar a conectividade em pacientes com perda óssea severa e, em parte, devido ao acúmulo substancial de osteóide e que, mesmo em baixas doses, o NaF prejudica a função osteoblástica.

Em relação à utilização do flúor na terapia da osteoporose, os resultados dos estudos são controversos (DAMBACHER *et al.*, 1986) e ainda não existe consenso a respeito da sua utilização, pois ainda não está esclarecido qual a dose ideal para obtenção dos efeitos desejados sem que haja prejuízos para a estrutura óssea.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento crônico com NaF no metabolismo ósseo e sinalização insulínica em ratas ovariectomizadas (OVX).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisas Animais (Protocolo nº 2014-01004). Trinta e seis ratas adultas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com dois meses de idade, pesando em média 200 gramas no início do estudo, foram aclimatadas em condições locais no biotério  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 horas), com acesso à dieta de ratos de laboratório Presença Habitual® (Evalis Indústria do Brasil Ltda, Paulínia, Brasil) e água. Estas ratas foram anestesiadas (cloridrato de cetamina -80 mg/kg- e cloridrato de xilazina -10 mg/kg) e submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) a partir de uma incisão dorsal. Quatorze dias após esse procedimento cirúrgico, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: ratas ovariectomizadas controle (OVX-C) NaCl (153mg/L) e ratas ovariectomizadas tratadas com NaF (OVX-F) na concentração de 50 mg/L (Synth® - Labsynty, Diadema/SP, Brasil) na água de beber durante 42 dias. Foram avaliados três vezes por semana: ingestão de líquidos, consumo de ração e peso corporal dos animais de ambos os grupos. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, sendo quatro gaiolas de cada grupo (controle e tratado). A média de ingestão hídrica e de ração de cada gaiola foi dividida pelo número de ratos contidos em cada uma. Após 42 dias de tratamento, os animais (sob jejum de 12 horas) foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltd., Itapira, Brasil, 3%, 5mg/100g de peso corporal, i.p.) para realização de laparotomia mediana para retirada de amostras do tecido muscular gastrocnêmio, antes e 90s após da injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta), a fim de quantificar o grau de fosforilação em serina da Akt. Em outro grupo (n=10), coletou-se sangue pela veia cava inferior, as amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e centrifugadas (4000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  até as análises das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, osteocalcina, TNF- $\alpha$  e fluoreto. Desses animais, as tíbias foram coletadas para realização de análise histológica e histomorfométrica.

## 3.2 Avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt

### 3.2.1 Preparação das amostras para “Western blotting”

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 segundos) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 minutos, transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (à 4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (1970) (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

### 3.2.2 “Western blotting”

- **“SDS-PAGE”** - (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*):

A primeira etapa do “Western blotting” consistiu na submissão das amostras (185 µg de proteína em cada poço) a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Através desse método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes em sua composição: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 6%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e

inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 minutos. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. EUA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante aproximadamente 2 horas.

Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

- **Transferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany).

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 horas, à 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

- **“Immunoblotting”**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas, desenvolvido por Kruger e Hammond (1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) contendo os anticorpos antifosfoserina - Akt (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA) por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas



em solução (SB + 1% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) com segundo anticorpo contendo peroxidase de "horseradish" ("kit" de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 minutos cada lavagem. Após esses procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) à prova de luz, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil).

A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa *Scion Image* (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

### **3.3 Análise histométrica**

Para a obtenção das lâminas histológicas, oito animais de cada grupo, foram selecionados aleatoriamente. As tíbias direitas dos animais foram recolhidas imediatamente após o período de tratamento, fixada em formalina neutra a 4% por 48 horas, descalcificado em solução de "Plank-Rychlo" (PLANK; RYCHLO, 1952). Séries de fatias com 5 µm de espessura foram feitas sobre os aspectos méso-distais das tíbias direitas e coradas com hematoxilina e eosina como segue:

<b>Desidratação/Diafanização:</b>	<b>Impregnação:</b>
Alcool 70% - 1 hora	Parafina I – 1 hora
Alcool 80% - 1 hora	Parafina II – 1 hora
Alcool 95% - 1 hora	Parafina III – 2 horas
Alcool 100% - 1 hora	Coloração:
Alcool 100% - 1 hora	Hematoxilina
Alcool 100% - 1 hora	Eosina
Alcool 100%/Xilol - 1 hora	
Xilol – 1 hora	
Xilol – 1 hora	
Xilol – 1:30 horas	

Seções equidistantes de cada amostra foram selecionadas e fotografadas usando uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz. Foram obtidas imagens contendo metáfise proximal da tíbia. A análise foi realizada por um “software” de domínio público “Image J” sistema de análise de imagem “IMAGE”. O parâmetro histomorfométrico ósseo seguinte foi medido: B.Ar. Todas as nomenclaturas, símbolos e unidades de histomorfometria óssea foram expressos como recomendado pela American Society for Bone and Mineral Research Histomorphometry - Comissão da Nomenclatura (DEMPSTER *et al.*, 2013).

### 3.4 Análise Imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, foram utilizados oito animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente. As peças selecionadas foram fixadas em formalina 10%, descalcificadas em solução de “Plank-Rychlo” e incluídas em parafina. Posteriormente, foram submetidas a cortes histológicos com 5 µm de espessura, estendidas em lâminas silanizadas (ImmunoSlides Easy Path) e seguiram para desparafinização, que foi realizada em três banhos de xilol 100% durante 4 minutos cada. Em seguida foram hidratadas em uma série decrescente de etanol, a partir do etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 80%, 70% e 50% durante 2 minutos cada. Após esse processo, foram lavadas em PBS por três

vezes. Para o bloqueio endógeno, utilizou-se peróxido de hidrogênio 30%, e, em seguida, as lâminas foram lavadas por três vezes em solução de PBS e triton. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. O bloqueio da biotina foi feito com leite desnatado durante 20 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram: Osteoprotegerina (OPG – código SC21038 – Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA); RANKL (código SC7627 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA); Caspase-3 (código SC 1225 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA); RUNX2 (código SC 8566 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA); Osteocalcina (código SC 18319 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA); Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP – código SC 30832 - Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA). A incubação com o anticorpo primário foi feita por 18 horas. Após esse período, foram incubados com o anticorpo secundário do Kit LSAB por 30 minutos e o amplificador do mesmo Kit por mais 30 minutos. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB), contracorada com Hematoxilina de Harris e montada em resina.

Foi realizada análise quantitativa ordinal e a intensidade da imunomarcação foi quantificada por meio de escores: 0 – ausente, 1 – fraca, 2 – moderada e 3 – intensa.

### **3.5 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)**

A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase, um método enzimático específico para quantificação de glicose (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil). Nesse teste, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em presença de peroxidase, produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, dando origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda.

Para a dosagem de glicemia, foram utilizados 10 µL da amostra de plasma ou de padrão (100 mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As

absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm, acertando o zero com o branco.

Cálculos:

$$\text{Glicose (mg/dl)} = (\text{Absorbância do teste} \div \text{Absorbância do padrão}) \times 100$$

$$\text{Glicose (mmol/L)} = \text{mg/dl} \times 0,0556$$

### 3.6 Determinação da Insulinemia

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIE (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Sinteticamente, trata-se de uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação das massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, mais se formará o complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade do complexo insulina marcada-anticorpo.

### 3.7 HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*/Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue:

HOMA - IR = glicemia de jejum (mmol/L) X insulinemia de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ )/22,5) (LIMA *et al.*, 1998).

### 3.8 Determinação de osteocalcina

A concentração (pg/mL) de osteocalcina plasmática foi determinada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com a utilização de kits, seguindo as instruções do fabricante. O kit comercial utilizado foi SEA471Ra 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for osteocalcin. Usn life science Inc. Houston, USA. A absorbância foi determinada em 450 nm.

### 3.9 Determinação de TNF- $\alpha$

A concentração (pg/mL) do TNF- $\alpha$  plasmático (eBioscience, USA) foi determinada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). No Kit para dosagem de TNF- $\alpha$  (o qual não contém anticorpo específico na placa) os 96 poços foram recobertos e incubados com anticorpo anti TNF- $\alpha$  diluído em tampão de fosfato de cálcio, durante 15-18h a 40°C. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA) durante 1 hora, em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo a seguir, incubada com os padrões e as amostras de plasma durante 2h em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotilado por 1h à 25°C. A placa foi lavada e em seguida adicionou-se o conjugado Streptavidina-HRP e submetida à agitação (300 rpm) durante 30 minutos à 25°C. A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina) de 10 a 15 minutos. Foi acrescentado o tampão “stop” para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450 nm

### 3.10 Determinação do íon flúor

Para a análise do flúor no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO<sub>2</sub>, que teve que ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (60x15 mm) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico a 3 M saturado por hexametil-disiloxano (HMDS - Aldrich) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Essa solução (denominada ácido aquecido) foi previamente aquecida até que seu volume seja reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição de ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO<sub>2</sub>. O volume das mesmas foi completado para 2mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por (TAVES, 1968), modificado por (WHITFORD, 1996). Na tampa dessas placas, foram colocados 50  $\mu$ L de NaOH 0,05 M, distribuídos

em 6 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Tecnal, modelo TE 141) em velocidade 2-3, por 12 horas. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25  $\mu$ L de ácido acético 0,2 M. O volume total foi ajustado para 75  $\mu$ L com água deionizada, usando uma pipeta. A gota final, contendo todo o flúor da amostra, foi analisada com um eletrodo específico para o íon flúor (Orion Research, Cambridge, Mass. USA, modelo 9409) e um microeletrodo de referência calomelano (Accumet, #13-620-79) unidos e acoplados ao potenciômetro (Orion Research, modelo EA 940), que expressou a concentração de flúor em milivolts (mV).

### **3.11 Análise Estatística**

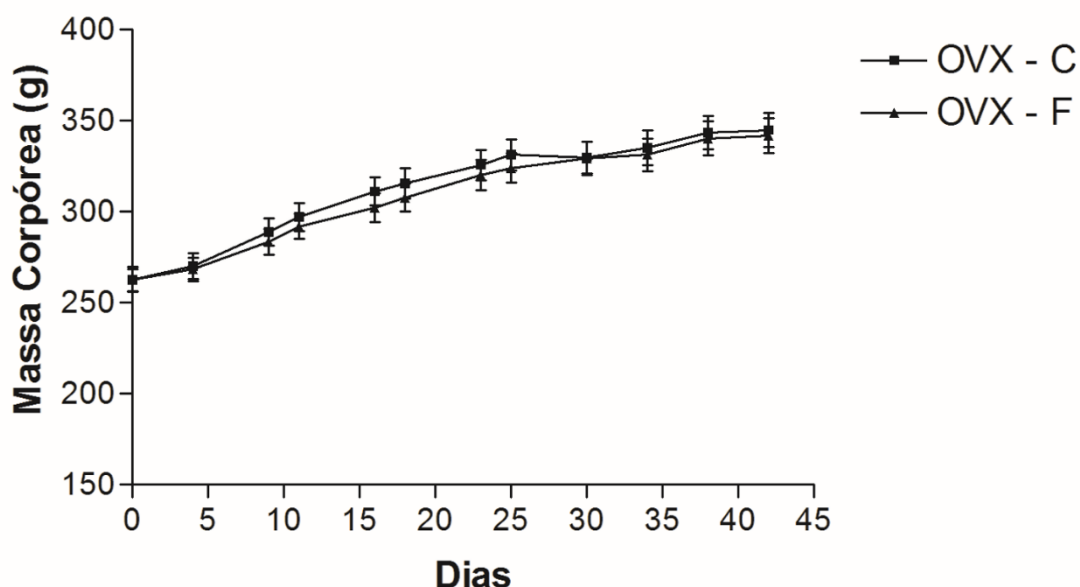
A análise estatística do sinal insulínico foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey. Para análise histomorfométrica e avaliações plasmáticas de glicemia, insulinemia, TNF- $\alpha$ , fluoreto e HOMA-IR, as análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student. A análise estatística da imuno-histoquímica foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. A análise dos dados foi realizada com um programa estatístico (Graph Pad Prism Versão 6.0). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1) Avaliação da Massa Corpórea (g)

A massa corpórea dos grupos controles (OVX – C) e tratados com fluoreto de sódio (OVX – F) foram avaliados semanalmente, durante 42 dias (Figura 1). Os resultados demonstram que o tratamento com fluoreto de sódio (50mg/L) não promoveu diferença estatística nesse parâmetro entre os grupos OVX – F e OVX – C.

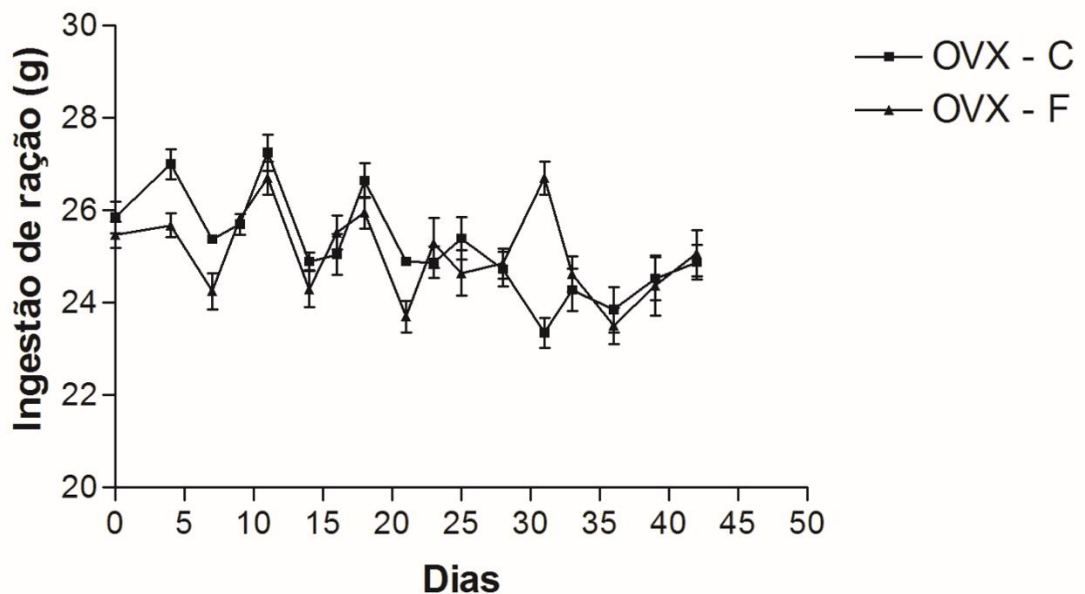
**FIGURA 1** - Massa corpórea (g) de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F) durante 42 dias. Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM de 18 (OVX-C) e 18 (OVX-F) animais.



### 4.2) Ingestão Alimentar (g)

A figura 2 mostra a média da ingestão alimentar dos grupos OVX-C e OVX-F. Observou-se que o tratamento com fluoreto de sódio (50 mg/L) não promoveu durante 42 dias alteração na ingestão alimentar dos animais (OVX-C = 25,1  $\pm$  0,1g vs OVX-F = 25,0  $\pm$  0,1g).

**FIGURA 2** - Ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores estão apresentados como Média  $\pm$  EPM de 18 (OVX-C) e 18 (OVX-F) animais.

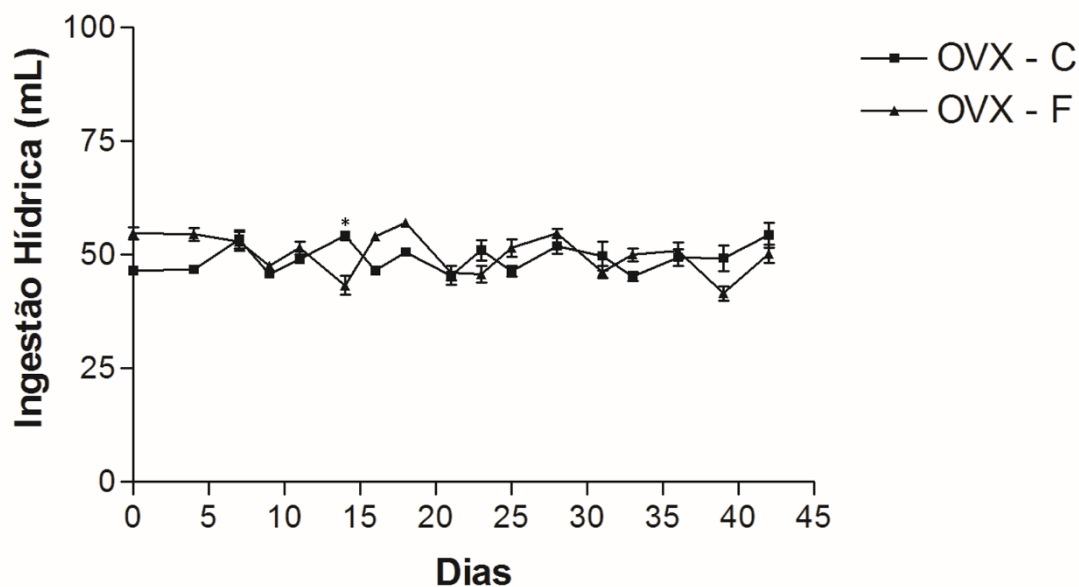


#### 4.3) Ingestão Hídrica (mL)

A figura 3 mostra a média da ingestão hídrica dos grupos OVX-C e OVX-F durante 42 dias. Neste período observou-se diferença entre os dois grupos no dia 6 (OVX-C =  $54,2 \pm 0,9$  mL vs OVX-F =  $43,3 \pm 2,1$  mL). Observou-se que o tratamento com fluoreto de sódio (50 mg/L) não promoveu alteração na ingestão hídrica dos animais (OVX-C =  $49,1 \pm 0,4$  mL vs OVX-F =  $50,1 \pm 0,4$  mL).

**FIGURA 3** - Ingestão hídrica de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM de 18 (OVX-C) e 18 (OVX-F) animais.

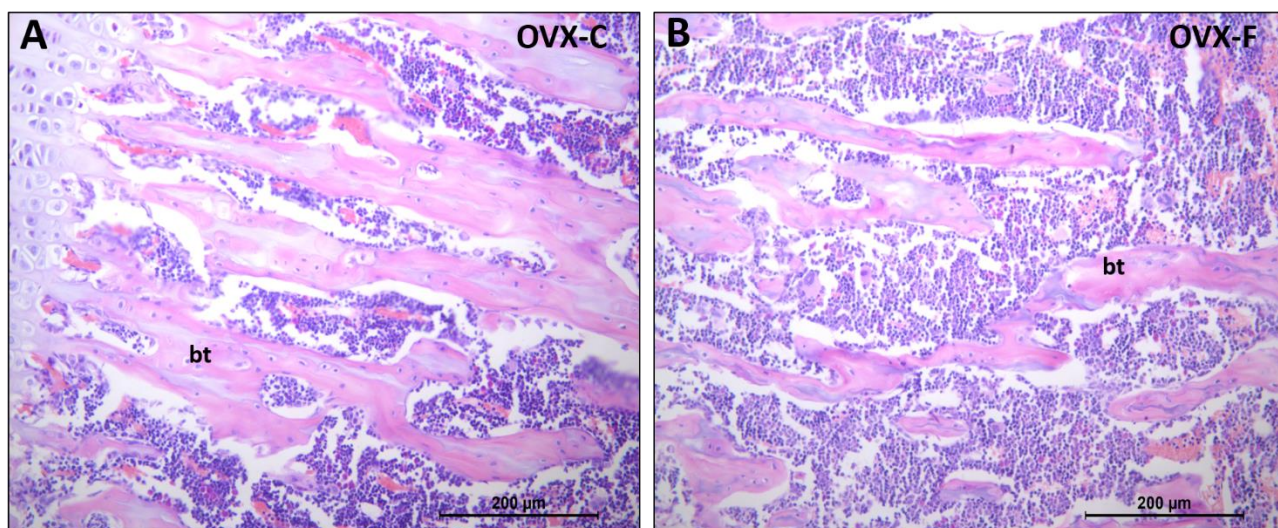




#### 4.4) Análise Histológica

Análise histológica (figura 4) representa em: A) ratas OVX-C e B) ratas OVX-F. A análise qualitativa revela diminuição da espessura trabecular no grupo tratado com fluoreto de sódio e aumento do espaço entre as trabéculas ósseas.

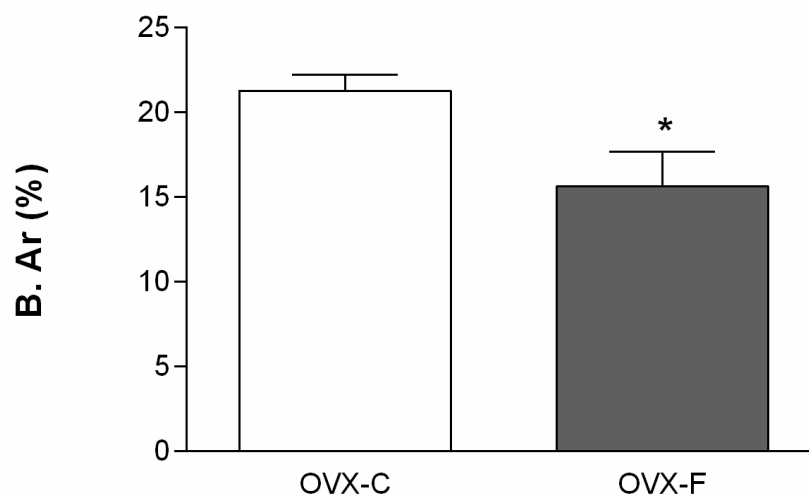
**FIGURA 4** - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo esponjoso na epífise proximal tibial no grupo controle (A) e no grupo tratado com flúor (B). Abreviações e símbolos: **bt**, trabécula óssea. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200  $\mu$ m.



#### 4.5) Análise Histomorfométrica

Na Figura 5 observa-se a porcentagem de área óssea trabecular da epífise proximal tibial dos grupos OVX-C e OVX-F. Os resultados demonstram uma diminuição dessa área óssea no grupo OVX-F em comparação ao grupo OVX-C (OVX-F =  $15,66 \pm 2,014\%$  vs. OVX-C =  $21,28 \pm 0,95\%$ ).

**FIGURA 5** - Porcentagem de área óssea trabecular da epífise proximal tibial de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo tratado com fluoreto de sódio (50mg/L) administrado na água de beber (OVX-F). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=8. \*p<0,05.



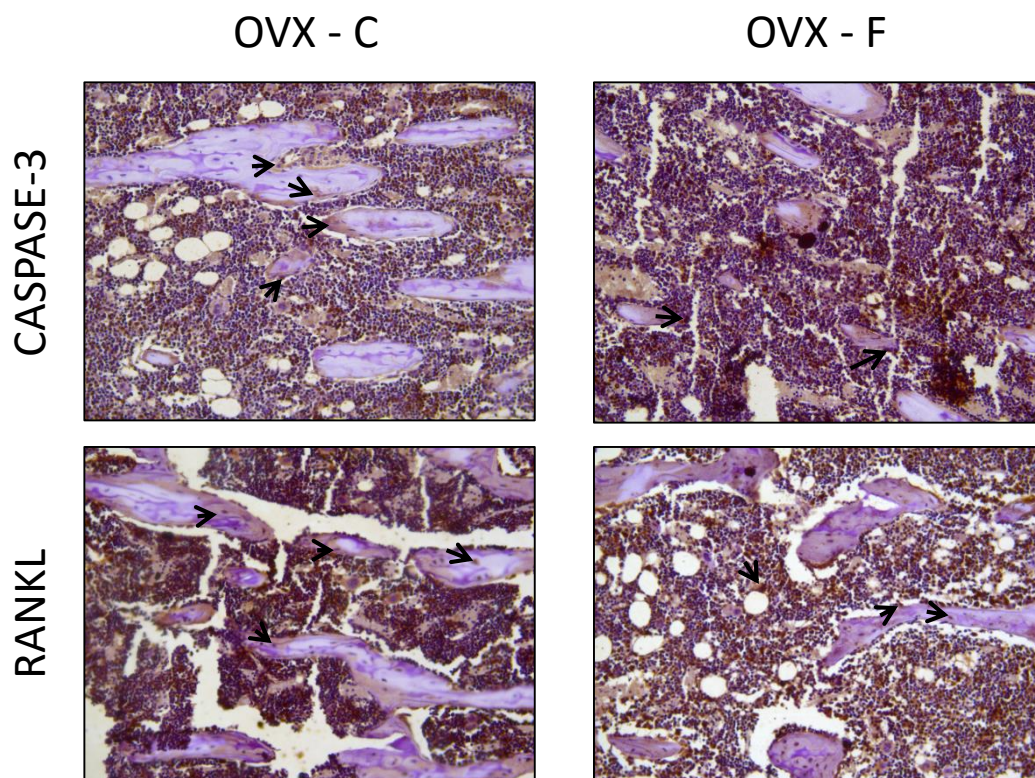
#### 4.6) Análise imuno-histoquímica de marcadores de formação e reabsorção ósseos (RANKL, Caspase-3, TRAP, OCN, OPG e RUNX2) em tíbias de ratas ovariectomizadas

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em tíbias de ratas dos grupos OVX-C e OVX-F utilizando-se anticorpos específicos contra as proteínas RANKL, Caspase-3, TRAP, Osteocalcina, OPG e RUNX2.

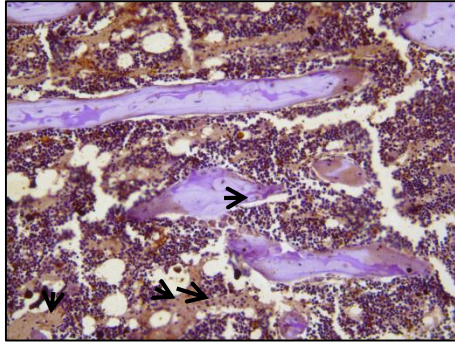
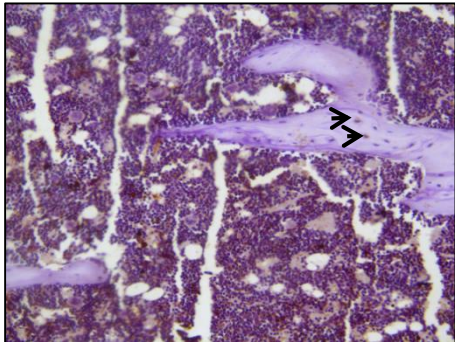
Houve uma imunomarcação mais intensa das proteínas Caspase-3, TRAP, Osteocalcina e RUNX2 no grupo OVX-F em rela o ao grupo controle. Por outro lado, o grupo OVX-F apresentou uma menor imunomarca o da proteína RANKL em compara o com o grupo controle. Em rela o   imunomarca o da proteína OPG, não houve diferença entre os grupos.

Os resultados dos escores obtidos a partir da análise da imunomarca o destes marcadores do metabolismo ósseo encontram-se dispostos na figura 6.

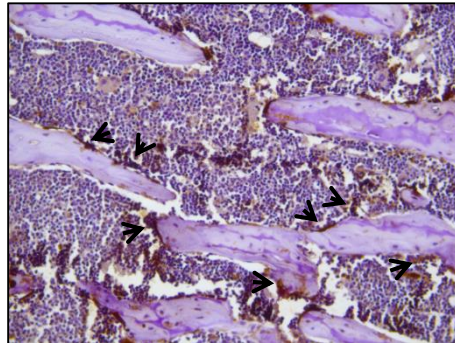
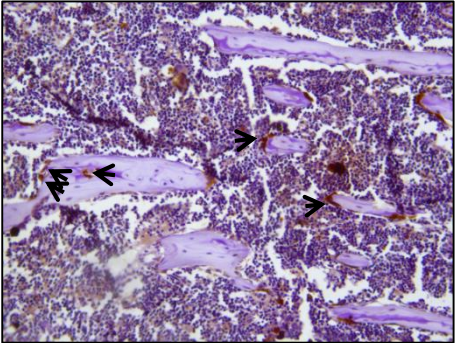
**FIGURA 6.** Imunomarca o de CASPASE 3, RANKL, OPG, TRAP, RUNX2 e OCN em tíbias de ratas dos grupos OVX-C e OVX-F pela análise imuno-histoquímica (Imunomarca es indicadas pelas setas).



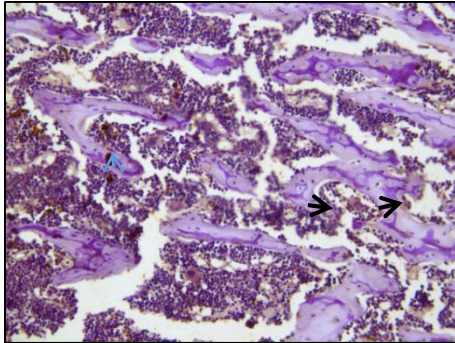
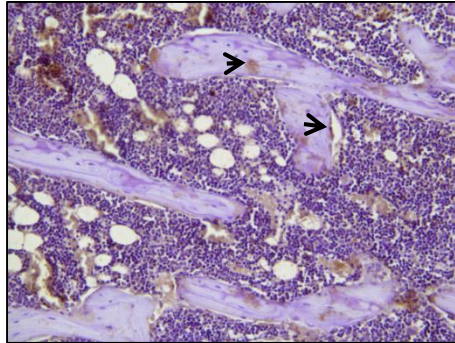
OPG



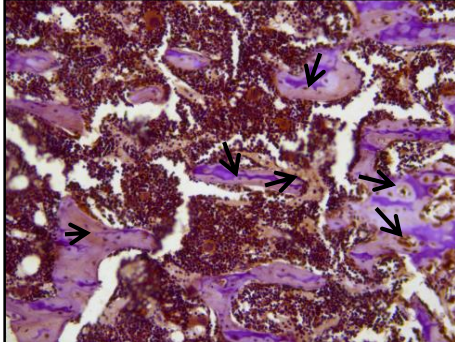
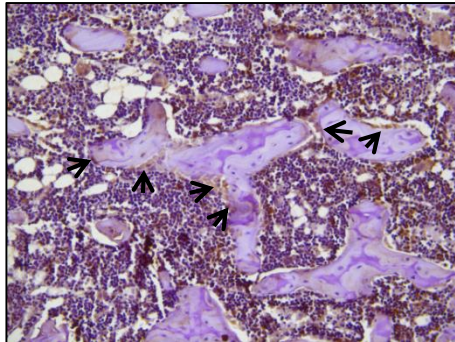
TRAP



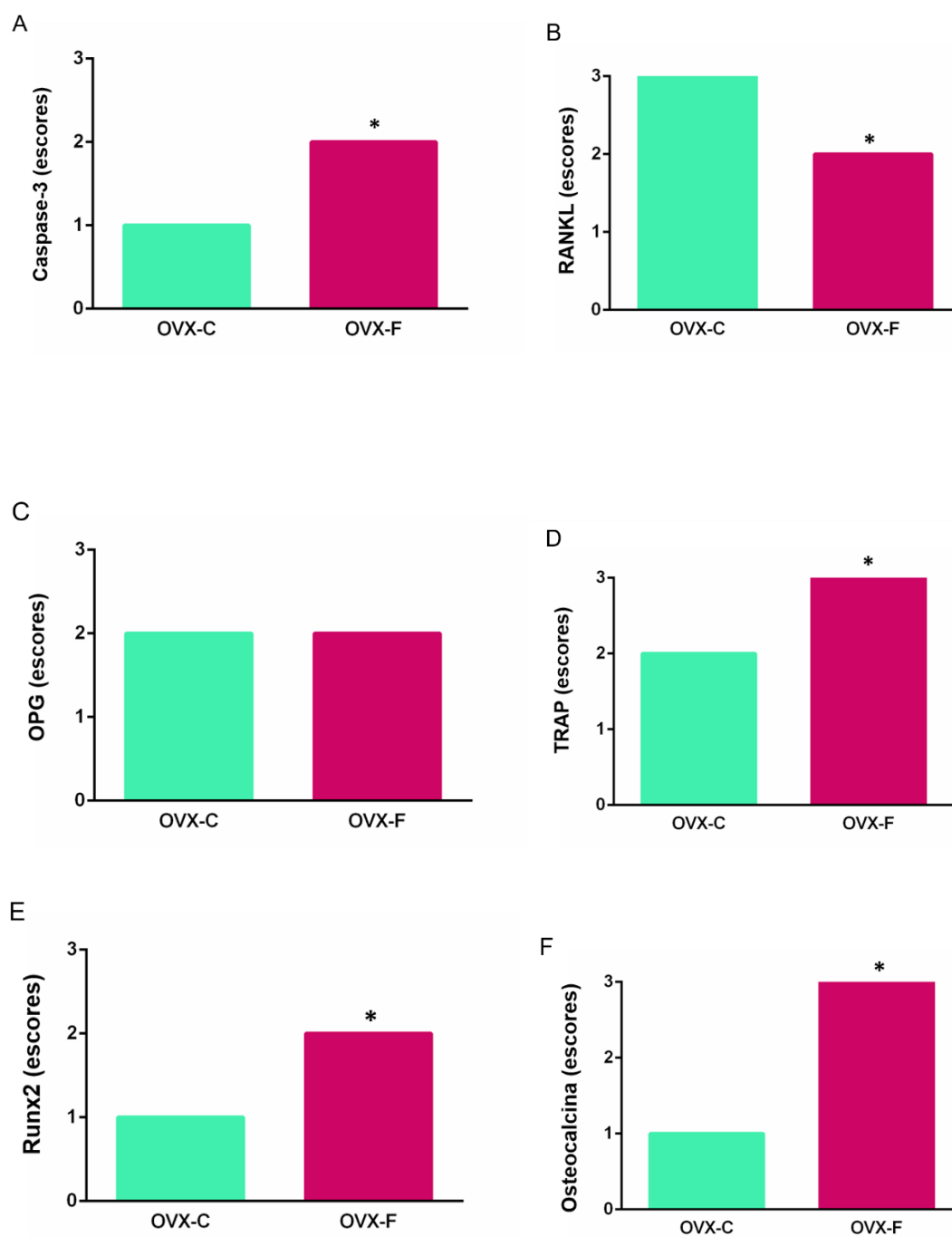
RUNX2



OCN



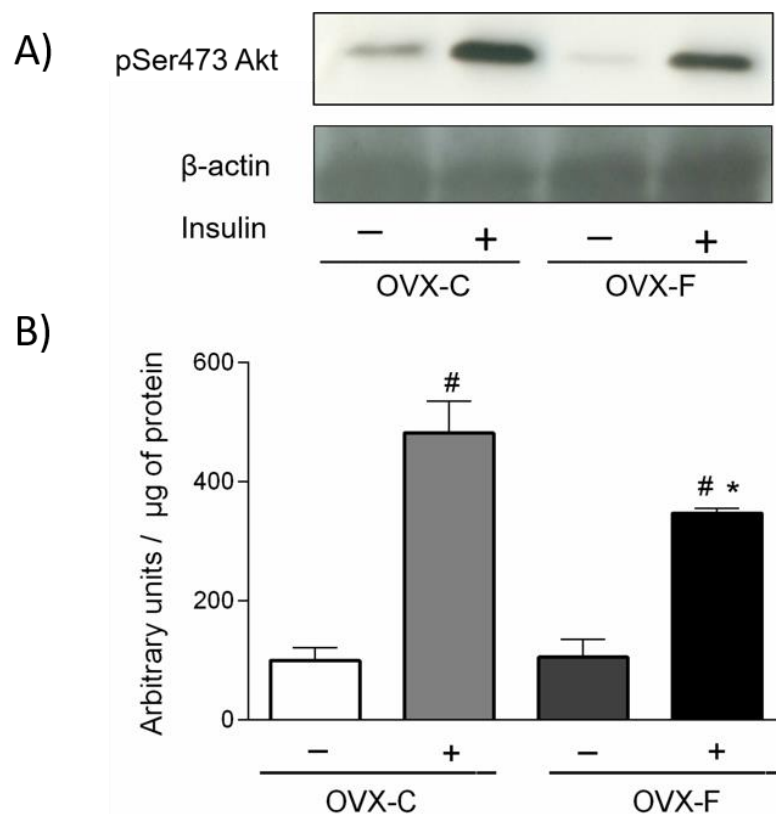
**FIGURA 7.** Avaliação imuno-histoquímica das proteínas: em A: Caspase-3, em B: RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kapa B), em C: OPG (Osteoprotegerina), em D: TRAP (Fosfatase ácida tartarato-resistente), em E: Runx2 (Runt-related transcription factor 2) e em F: Osteocalcina da tíbia de ratas dos grupos OVX-C e OVX-F. Os valores são apresentados como mediana, n=8. \*p<0,05.



#### 4.7) Avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt em tecido muscular gastrocnêmio.

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em serina da Akt, após o estímulo insulínico, em relação ao estado basal em GM ( $p < 0,05$ ). Em análise intergrupos, após estímulo insulínico, houve redução do grau de fosforilação em serina da Akt ( $p < 0,001$ ) no grupo OVX-F em relação ao grupo OVX-C.

**FIGURA 8** – Avaliação do grau de fosforilação da Akt, em tecido muscular gastrocnêmio (G) de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50mg/L) durante 42 dias, antes (-) e após (+) o estímulo insulínico. Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE e processadas conforme Materiais e Métodos. Em B, o grau de fosforilação da Akt foi expresso em unidades arbitrárias por  $\mu\text{g}$  de proteína amostrada. Valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM de 4 experimentos. #  $p < 0,05$  insulina (-) vs. insulina (+); \*  $p < 0,001$  OVX-C (+) vs. OVX-F (+).



#### 4.8) Avaliação das concentrações plasmáticas da glicose, insulina, fluoreto, TNF- $\alpha$ e índice HOMA-IR.

Os valores da glicemia, insulinemia, fluoremia, TNF- $\alpha$  e índice HOMA-IR podem ser observados na tabela 1. Não foi encontrada diferença significativa na glicemia entre os grupos estudados. Entretanto, observou-se aumento significativo nas concentrações plasmáticas de insulina, fluoreto, TNF- $\alpha$  e osteocalcina no grupo OVX-F quando comparado ao grupo OVX-C ( $p < 0,05$ ). A partir dos valores de insulinemia e glicemia, calculou-se o índice HOMA-IR (HOMA-IR = glicemia em jejum (mmol/L) x insulinemia em jejum ( $\mu$ UI/mL) / 22,5). Por meio desse índice, observou-se que o grupo OVX-F apresentou maior resistência insulínica quando comparado ao grupo OVX-C.

**TABELA 1** - Concentração plasmática glicose, insulina, fluoreto, TNF- $\alpha$  e índice HOMA-IR de ratas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C).

PARÂMETROS	OVX-C	OVX-F
Glicemia (mmol/L)	6.30 $\pm$ 0.20	6.47 $\pm$ 0.26
Insulinemia ( $\mu$ U/mL)	11.43 $\pm$ 2.04	18.89 $\pm$ 1.62*
Fluoremia ( $\mu$ g/mL)	0.05 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.03*
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	5.88 $\pm$ 0.15	7.12 $\pm$ 0.45*
Osteocalcina (pg/mL)	68.39 $\pm$ 15.19	134.1 $\pm$ 23.29*
HOMA-IR	3.20 $\pm$ 0.69	5.43 $\pm$ 0.53*

Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=10. \* $p < 0,05$

## 5. DISCUSSÃO

O tratamento crônico com NaF (50mg/mL na água de beber) durante 42 dias, promoveu resistência à insulina, diminuição do sinal insulínico e da área óssea trabecular da tíbia, alterações nos marcadores de metabolismo ósseo e aumento nas concentrações plasmáticas de insulina, flúor, osteocalcina e TNF- $\alpha$  em ratas ovariectomizadas (OVX).

Os resultados do presente estudo revelaram que o tratamento crônico com NaF (50mg/L) durante 42 dias na água de beber não promoveu diferença na massa corporal em relação ao grupo controle (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por Søggaard *et al.* (1995) e Chiba *et al.* (2010) que também não observaram diferença no peso corpóreo de ratas e ratos machos castrados, respectivamente, tratados com diferentes doses de NaF na água de beber, demonstrando que o tratamento com o fluoreto de sódio não interferiu neste parâmetro. Além disso, os resultados do presente trabalho não revelaram diferenças em relação à ingestão hídrica e de ração entre os grupos (Figuras 2 e 3).

Similarmente aos achados do presente estudo, Carvalho *et al.* (2008) avaliaram o efeito da ingestão crônica de fluoreto na formação óssea de ratos jovens e constataram que a administração diária de 50 mg NaF/L por gavagem resultou em uma significativa diminuição da formação óssea. Adicionalmente, estudos demonstraram que em ratos em período de crescimento, o tratamento com fluoreto em doses elevadas reduz a área do osso trabecular (TURNER *et al.*, 1989). Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Fernandes (2010), realizado em ratos tratados com doses variadas de NaF na água de beber, durante 30 dias, que demonstrou que em baixas doses (5 e 15 ppm de F) não houve alterações na formação óssea, enquanto que doses mais elevadas (50 ppm de F) promoveram uma diminuição da neoformação óssea. Ademais, estudos recentes conduzidos por Nunes *et al.* (2016) demonstraram que o tratamento crônico com flúor (50mgF/L) promoveu diminuição significativa na área óssea total, número de trabéculas e espessura das trabéculas em tíbias de ratas OVX. Esses achados reforçam os resultados do presente estudo e alertam



para os efeitos prejudiciais de doses elevadas de flúor sobre o metabolismo e atividade do tecido ósseo.

O presente estudo demonstrou que o tratamento crônico com NaF (50 mg/L) promoveu aumento na atividade de importantes marcadores da atividade osteoclástica (Caspase-3 e TRAP). Esses resultados estão de acordo com um estudo recente conduzido em nosso laboratório (NUNES *et al.*, 2016), que demonstrou que o tratamento crônico com NaF promoveu diminuição da área óssea total, do número de trabéculas, da espessura das trabéculas, tenacidade, da rigidez e da força máxima em tíbias de ratas ovariectomizadas.

Conforme descrito anteriormente, a caspase 3, também conhecida como CPP32, representa a principal caspase efetora na cascata da apoptose celular (HAGUE *et al.*, 2004) e a detecção desta proteína pode ser considerada um indicador sensível e exclusivo da apoptose (GOWN & WILINGHAN, 2002). Anuradha *et al.* (2001) demonstrou pela primeira vez que o NaF induz a apoptose celular mediada pela peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo. A peroxidação lipídica pode levar à uma disfunção da membrana mitocondrial, iniciando a ativação da cascata das caspases. Dessa forma, é possível aventar que, no presente estudo, a diminuição da área óssea trabecular das tíbias das ratas tratadas com NaF pode ser devido a uma maior ocorrência de apoptose das células do tecido ósseo, indicada pela maior imunomarcagem da caspase 3, promovendo o desequilíbrio do metabolismo ósseo.

O sistema OPG/RANK/RANKL é de fundamental importância para manutenção do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (REN *et al.*, 2011). A RANKL, ao se ligar ao RANK, estimula a reabsorção óssea, aumentando a diferenciação, a ativação e a sobrevivência dos osteoclastos. Em contrapartida, a OPG atua inativando o RANKL e, assim, promove inibição da reabsorção óssea (HUMPHREY *et al.*, 2006). Fernandes *et al.* (2012) avaliou a expressão de OPG na reparação óssea alveolar de ratos expostos a doses variadas de fluoreto (0, 5 e 50 ppm na água de beber) e, similarmente aos achados de nosso estudo, demonstrou que não houve diferença estatística na expressão de OPG após o consumo crônico de fluoreto por 60 dias em nenhuma das doses utilizadas. Nossos resultados estão de acordo com estudos recentes conduzidos por Bhawal *et al.* (2015), que avaliaram o efeito de diversas doses de NaF na

expressão de RANKL e OPG em culturas de células obtidas a partir de fêmures de ratos. Foi demonstrado que altas doses de NaF (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) promoveram diminuição na expressão de RANKL e nenhuma diferença na expressão de OPG comparado ao grupo controle. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que o tratamento com baixas doses de NaF promovem um aumento na expressão de OPG (SUN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2011). Essa discordância nos resultados pode ser decorrente da diferença na dose utilizada pelos estudos.

Os resultados da imunomarcação da TRAP observados no presente estudo corroboram os dados de Fernandes *et al.* (2012), que verificaram aumento da expressão de TRAP em células ósseas tratadas com 50 ppm de fluoreto. Achados similares foram observados em estudos “in vivo” recentemente conduzidos em nosso laboratório (NUNES *et al.*, 2016) que demonstraram um aumento na expressão da TRAP no tecido ósseo de ratas OVX tratadas com altas doses de NaF. A imunomarcação da TRAP representa o padrão ouro para a caracterização de osteoclastos e sua maior expressão pode estar relacionada com a diminuição da área óssea observada no presente estudo.

O aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  pode ter contribuído para diminuição da área óssea. O TNF- $\alpha$  leva a uma destruição óssea agindo diretamente na diferenciação e maturação do osteoclasto, ou indiretamente expondo a matriz óssea (KREUTZER *et al.*, 1991). Além disso, estudos realizados com soluções antagonistas, contendo bloqueadores do receptor de TNF- $\alpha$ , observaram uma redução de aproximadamente 60% na perda óssea utilizando essas soluções (ASSUMA *et al.*, 1998).

Com base nessas informações, podemos sugerir que o efeito do TNF- $\alpha$  na promoção da diferenciação de osteoclastos sobrepujou a diminuição da expressão de RANKL, resultando em aumento da diferenciação de osteoclastos e, conseqüentemente, isso promoveu uma diminuição da área óssea trabecular, como descrito anteriormente. De fato, sabe-se que o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  pode promover diferenciação osteoclástica por um mecanismo independente da via da RANKL (KOBAYASHI *et al.*, 2000).

Por outro lado, observou-se que o tratamento crônico com NaF também promove aumento em marcadores da atividade osteoblástica (Runx2 e OCN). Esse resultado parece inicialmente contraditório porque em nossos resultados

houve uma diminuição na área de osso trabecular, ou seja, aumento da reabsorção óssea, embora Runx2 e OCN sejam marcadores de formação óssea, como descrito anteriormente. Novamente, é possível sugerir que os efeitos do TNF- $\alpha$  sobrepujaram os efeitos desses marcadores ósseos.

Estudos de Liu *et al.* (2015) realizados em ratos tratados com fluoreto sugerem que os osteoblastos são mais sensíveis à ação tóxica de altas doses de fluoreto do que os osteoclastos. De fato, a diminuição da área óssea da epífise proximal tibial observada no grupo OVX-F evidencia o fato de que o tratamento com fluoreto não melhora a qualidade do tecido ósseo.

Os achados do presente estudo estão de acordo com os resultados de Sun *et al.* (2014) que realizaram um estudo com roedores submetidos ao tratamento com alta doses NaF em tempos variados (1, 2 e 3 meses) e verificaram que a exposição ao flúor aumenta a expressão de marcadores osteoblásticos, como a Runx2. Essa proteína é um fator de transcrição essencial para diferenciação de osteoblastos e formação óssea. No presente estudo, foi observado maior imunomarcagem para Runx2 no grupo OVX-F em relação ao controle. Pan *et al.* (2014) observaram que o fluoreto aumenta a expressão de Runx2 e de outros genes fenotípicos de formação óssea, incluindo fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteonectina, que controlam a diferenciação de osteoblastos por meio da ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Ademais, estudos demonstraram que Runx2 estimula diretamente a transcrição de genes relacionados à osteoblastos, como a osteocalcina (KOMORI, 2010; PRINCE *et al.*, 2001). De fato, no presente estudo foi observado aumento da expressão de OCN possivelmente devido ao aumento de RUNX2.

Os resultados do presente estudo revelaram imunomarcagem mais intensa de OCN no grupo OVX-F (figura 7F). Esses dados corroboram os achados de Sun *et al.* (2014) que observaram maior expressão de OCN em tecido ósseo de ratos expostos a 20mg F/kg/dia durante dois meses.

Estudos recentes conduzidos em cultura de células ósseas de fêmures de ratos tratados com fluoreto, sugerem que o flúor pode estimular a expressão de OCN por meio da ativação da via de sinalização do receptor de insulina em osteoblastos (Liu *et al.* 2015).

Esse aumento na expressão de OCN pode ser devido ao aumento na concentração plasmática de insulina, pois sabe-se que a insulina estimula a expressão de OCN (LIU *et al.* 2016; KANAZAWA *et al.* 2015).

Em nosso estudo, realmente observamos que o tratamento com NaF promoveu aumento das concentrações plasmáticas de insulina em ratas OVX. Nossos resultados também demonstraram que o grupo OVX-F apresentou redução na sensibilidade à insulina, avaliada pelo índice HOMA-IR, porém não foi observada diferença na glicemia entre os grupos (Tabela 1). Esse aumento da insulinemia pode ser decorrente de uma resposta do organismo à resistência insulínica, promovendo uma elevação compensatória da concentração plasmática de insulina, com o objetivo de manter a glicemia dentro dos parâmetros normais. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Yang *et al.* (2015), que avaliaram a concentração insulínica plasmática e a secreção nas ilhotas pancreáticas após um mês de tratamento com diferentes doses de NaF (10 e 20 mg F/kg/dia). Os autores revelaram que o tratamento com 20 mg F/kg/dia foi capaz de aumentar significativamente a insulinemia e a função das ilhotas pancreáticas.

O aumento nos níveis plasmáticos de insulina no grupo OVX-F pode ter induzido um aumento na expressão de OCN pela ativação dos receptores de insulina localizados nos osteoblastos. Interessantemente, estudos demonstraram que a fração decarboxilada da OCN circulante está associada ao aumento da secreção e sensibilidade à insulina (PATTI *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2016). Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento crônico com NaF (50 mgF/L) promoveu resistência à insulina e diminuição do sinal insulínico. Dessa forma, é possível sugerir que os efeitos benéficos da OCN não foram suficientes para compensar os efeitos deletérios do tratamento com flúor sobre o sinal insulínico.

Nossos resultados também corroboram os estudos de Chiba *et al.* (2010), que verificaram um aumento da resistência à insulina por meio da avaliação do índice de HOMA-IR em ratos castrados tratados cronicamente com NaF.

O tratamento crônico com NaF (50mgF/L) durante 42 dias na água de beber promoveu diminuição do grau de fosforilação da Akt em serina, após estímulo insulínico, no tecido muscular gastrocnêmio de ratas OVX, resultando

em diminuição do sinal insulínico. A análise desse parâmetro é de fundamental importância, pois a Akt apresenta papel fundamental no processo de captação de glicose por meio da estimulação da translocação da proteína transportadora de glicose GLUT4 para membrana plasmática, ao passo que a inibição da atividade da Akt bloqueia parcialmente a translocação de GLUT4 em tecido adiposo e muscular, resultando em resistência à insulina (WATANABE *et al.*, 2011; KRISTENSEN *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2014). Além disso, como mencionado anteriormente, nossos resultados demonstraram que o grupo OVX-F apresentou aumento da concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , e sabe-se que o aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  leva à redução da autofosforilação do receptor da insulina estimulada pela própria insulina e inibição subsequente da fosforilação de IRS-1 (FEINSTEIN *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994, 1996; KRODER *et al.*, 1996). O TNF- $\alpha$  também induz modificação do IRS-1 por fosforilação em serina, o que torna essa molécula inibitória para a capacidade sinalizadora do receptor de insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; KANETY *et al.*, 1995). Essa fosforilação em serina é um dos fatores chave que interrompe a sinalização insulínica, levando a um quadro de resistência à insulina (TILG & MOSCHEN, 2008).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com NaF (50 mg/L na água de beber) em ratas OVX promoveu importantes alterações no metabolismo ósseo e transdução do sinal insulínico, evidenciando que esse tratamento induziu diminuição na qualidade óssea, na sensibilidade à insulina e na etapa posterior do sinal insulínico em ratas OVX tratadas com NaF. Em decorrência disto, o uso do flúor como elemento terapêutico no tratamento de alterações no metabolismo ósseo deve ser revisto para não promover um prejuízo não só nesse metabolismo ósseo, como também na sensibilidade à insulina, principalmente em mulheres na pós menopausa, que devido ao avanço da idade podem apresentar alterações nessa sensibilidade hormonal.

## **6. CONCLUSÃO**

Concluimos que esses resultados sugerem cautela na utilização do NaF para o tratamento da osteoporose, especialmente em mulheres, pois sabe-se que a resistência à insulina piora com o envelhecimento.

## REFERÊNCIAS

ALESSI, D.R.; JAMES, S.R.; DOWNES, C.P.; HOLMES, A.B.; GAFFNEY, P.R.; REESE, C.B.; COHEN, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr. Biol.*, v.7, n.4, p.261-269, Abr. 1997.

ALLEN, L.C., ALLEN, M.J., BREUR, G.J., HOFFMANN, W.E., RICHARDSON, D.C. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Research Veterinary Science* v. 68, p.231-235, 2000.

ANURADHA, C.D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p. 367-373, 2001.

ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.A.; BRUNING, J.C.; HAAG, B.; JOHNSON, R.S.; KAHN, C.R. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, v.372, n.6502, p.186-190, Nov. 1994.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol.*, v.160, n.1, p. 403-409, 1998.

BALENA, R.; KLEEREKOPER, M.; FOLDES, J.A.; SHIH, M.S.; SUDHAKER RAO, D.; SCHÖBER, H.C.; PARFITT, A.M. Effects of Different Regimens of Sodium Fluoride Treatment for Osteoporosis on the Structure, Remodeling and Mineralization of Bone. *Osteoporosis Int.*, v.8, p.428-435, 1998.

BARROS, J.M. O osso como órgão endócrino. Porto, Maio, 2011.

BELLACOSA, A.; CHAN, T.O.; AHMED, N.N.; DATTA, K.; MALSTROM, S.; STOKOE, D.; MCCORMICK, F.; FENG, J.; TSICHLIS, P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of PH domain. *Oncogene*, v.17, n.3, p.313-325, Jul. 1998.

BHAWAL, U.K.; LEE, H.J.; ARIKAWA, K.; SHIMOSAKA, M.; SUZUKI, M.; TOYAMA, T.; SATO, T.; KAWAMATA, R.; TAGUCHI, C.; HAMADA, N.; NASU, I.; ARAKAWA, H.; SHIBUTANI, K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *Int. J. Oral Sci.*, v.18, n.7, p. 242-9, 2015.

BORD S.; IRELAND D.C.; BEAVAN S.R.; COMPSTON J.E. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, v.32, p.136-41, 2003.

BURGESS, T.L. et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell. Biol.*, v.145, p. 527-38, 1999.

CAI, D.; PAGANON, S.D.; MELENDEZ, P.A.; LEE, J.; SHOELSON, S.E. Two new substrate in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.28, p.25323-25330, May 2003.

CARVALHO, J.G.; CESTARI, T.M.; DE OLIVEIRA, R.C.; BUZALAF, M.A. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v.30, p. 287-94, 2008.

CASTELO-BRANCO, C. Management of osteoporosis. An overview. *Drugs Aging*, v. 12, p.25-32, 1998.

CENCI S.; WEITZMANN M.N; ROGGIA C.; NAMBA N.; NOVACK D; WOODRING J., PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . *J Clin. Invest.*, v.106, p.1229-37, 2000.

CHIBA, F.Y.; COLOMBO, N.H.; SHIRAKASHI, D.J.; GOMES, W.D.S.; MOIMAZ, S.A.S.; GARBIN, C.A.S.; SILVA, C.A.; SUMIDA, D.H. 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.

CHIBA, F.Y.; COLOMBO, N.H.; SHIRAKASHI, D.J.; SILVA, V.C.; MOIMAZ, S.A.S.; GARBIN, C.A.S.; ANTONIALI, C.; SUMIDA, D.H. NaF treatment increases TNF- $\alpha$  and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. *J. Fluor. Chem.*, v.136, p. 3-7, Apr. 2012.

CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, v.378, n.6559, p.785-789, Dec. 1995.

DAMBACHER, M.A.; ITTNER, J.; RUEGSEGGER, P. Long-term fluoride therapy of postmenopausal osteoporosis. *Bone*, v.7, p. 199:205, 1986.

DEMPSTER, D.W.; COMPSTON, J.E.; DREZNER, M.K.; GLORIEUX, F.H.; KANIS, J.A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P.J.; OTT, S.M.; RECKER, R.R.; PARFITT, A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J. Bone Miner. Res.*, v.28, p. 1-16, 2013.

EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M. SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of insulin receptor abolishes insulin and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.84, n.3, p.704-708, Feb. 1987.

EK-RYLANDER, B.; FLORES, M.; WENDEL, M.; HEINEGÅRD, D.; ANDERSSON, G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol. Chem.*, v.269, p.14853-6, 1994.



EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M. Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v.16, n.3, p.211-215, Sep. 1979.

FALONI, A.P.S.; CERRI, P.S. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.36, n. 2, p.181-88, 2007.

FEINSTEIN R.; KANETY H.; PAPA M.Z.; LUNENFELD B.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.*, v.268, n.35, p.26055 – 26058, 1993.

FERNANDES, M.S.; YANAI, M.M.; MARTINS, G.M.; IANO, F.G.; LEITE, A.L.; CESTARI, T.M.; TAGA, R.; BUZALAF, M.A.; DE OLIVEIRA, R.C. Effects of fluoride in bone repair: an evaluation of RANKL, OPG and TRAP expression. *Odontology*, v.102, p. 22-30, 2014.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIKAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R.A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell*, p.296–308, 2010.

FULZELE, K.; RIDDLE, R.C.; DIGIROLAMO, D.J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D.; FAUGERE, M.C.; AJA, S.; HUSSAIN, M.A.; BRÜNING, J.C.; CLEMENS, T.L. Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell*, p. 309–319, 2010.

GABBAY, M.; CESARINI, P.R.; DIB, S.A. Diabetes mellito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. *Jornal de Pediatria*, v. 79, n. 3, 2003.

GALI, J.C. Osteoporose. *Acta. Ortop. Bras.* v. 9, n. 2, p. 3-12, 2001.

GARCIA-MORENO, C.; CATALÁN, M.P.; ORTIZ, A.; ALVAREZ, L.; DE LA PIEDRA, C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone*, v.35, p.170-7, 2004.

GARFIN, D.E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, v.182, p.425-441, 1990.

GOWN, A.M.; WILLINGHAM, M.C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem. Cytochem.*, v.50 (4), p.449-54, 2002.

GRUCKA-MAMCZAR, E.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, S. Lipid Balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. *Fluoride*, v.37, n. 3, p.195-200, 2004.

GRUCKA-MAMCZAR, E.; BIRKNER, E.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; MACHOY, Z. Disturbances of kidney function in rats with fluoride-induced hyperglycemia after acute poisoning by fluoride. *Fluoride*, v.38, n. 1, p.48-51, 2005.

GUTTERIDGE, D. H.; STEWART, G.O.; PRINCE, R.L.; PRICE, R.I.; RETALLACK, R.W.; DHALIWAL, S.S.; STUCKEY, B.G.; DRURY, P.; JONES, C.E.; FAULKNER, D.L.; KENT, G.N.; BHAGAT, C.I.; NICHOLSON, G.C.; JAMROZIK, K. A Randomized Trial of Sodium Fluoride (60 mg) - Estrogen in Postmenopausal Osteoporotic Vertebral Fractures: Increased Vertebral Fractures and Peripheral Bone Loss with Sodium Fluoride; Concurrent Estrogen Prevents Peripheral Loss, But Not Vertebral Fractures. *Osteoporosis Int.*, v.13, p.158–170, 2002.

HAGUE, A.; EVESON, J.W.; MACFARLANE, M.; HUNTLEY, S.; JANGHRA, N.; THAVARAJ, S. Caspase 3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally differentiated normal oral epithelium but increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumor stage. *J Pathol.*, v.204, n. 2, p.175-82, 2004.

HAJDUCH, E.; ALESSI, D.R.; HEMMINGS, B.A.; HUNDAL, H.S. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*, v.47, n.7, p.1006-1013, Jul. 1998.

HAN, X.; GUO, J.; DENG W.; ZHANG, C.; DU, P.; SHI, T.; MA, D. High-throughput cell-based screening reveals a role for ZNF131 as a repressor of ERalpha signaling. *BMC Genomics*, v.4, p. 476, 2008.

HOTAMISLIGIL, G.S.; MURRAY, D.L.; CHOY, L.N.; SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, n.11, p.4854 – 4858, 1994.

HOTAMISLIGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M.F.; SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science*, v.271, n.5249, p.665– 668, 1996.

HUMPHREY, E.L.; WILLIAMS, J.H.; DAVIE, M.W.; MARSHALL, M.J. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone*, v.38, p. 652-661, 2006.

JONES, S.M.; BHALLA, A.K. Osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v.11, p.557-62, 1993.

KANAZAWA, I. Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. *World J. Diabetes*, v. 6, n. 18, p. 1345-54, 2015.

KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M.Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, 1995.

KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. Structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.*, v.257, n.17, p.10392-10399, Sep. 1982<sup>a</sup>.

KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves, E.A.N. *Periodontia/cirurgia/cirurgia para implantes*. São Paulo: Artes Médicas, p. 437-45, 2002.

KAWAMOTO S.; EJIRI S.; NAGAOKA E.; OZAWA H. Effects of estrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Arch. Oral Biol.*, v.47, p.67-73, 2002.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. *Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia*. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Inc. cap. 4, p. 140, 2012.

KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; KURODA, S.; HINO, Y.; ANDO, M.; KOTANI, K.; KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; KIKKAWA, U.; OGAWA, W.; KASUGA, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase3B by the serine-treonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.*, v.19, n.9, p.6286-6296, Sep. 1999.

KLEEREKOPER, M.; PETERSON, E.L.; NELSON, D.A.; PHILLIPS, E.; SCHORK, M.A.; TILLEY, B.C.; PARFITT, A.M. A randomized trial of sodium fluoride as a treatment for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.*, v.1, n. 3, p.155-61, 1991.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T.J.; SUDA, T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.*, v.191, n.2, p. 275-286, 2000.

KOHN, A.D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R.A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, v.271, n.36, p.21920-21926, Sep. 1996.

KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.*, v.339, p. 189-195, 2010.

KRISTENSEN, J. M.; TREEBAK, J. T.; SCHJERLING, P.; GOODYEAR, L.; WOJTASZEWSKI, J. F. Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 306, n. 10, p. 1099-109, 2014.

KRODER, G.; BOSSENMAIER, B.; KELLERER, M.; CAPP, E.; STOYANOV, B.; MUHLHOFER, A.; BERTI, L.; HORIKOSHI, H.; ULLRICH, A.; HARING, H. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance.

Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J. Clin. Invest.*, v.97, n.6, p.1471 – 1477, 1996.

KRUGER, N.J.; HAMMOND, J.B.W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using <sup>125</sup>I labeled protein A. In: WALKER, J.M. *New Protein Techniques*. New Jersey: Humana Press, p.409-417, 1988.

LACEY, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v.93, p.165-76, April, 1998.

LIANG, Y.; TAN, A.; LIANG, D.; YANG, X.; LIAO, M.; GAO, Y.; JIANG, Y.; YAO, Z.; LIN, X.; LU, Z.; WU, C.; ZHANG, S.; HU, Y.; QIN, X.; MO, Z.; LI, H.; ZHANG, H. Low osteocalcin level is a risk factor for impaired glucose metabolism in a Chinese male population. *J. Diabetes Investig.*, v. 7, p. 522–528, 2016.

LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; MORAES, S.M.; HELL, N.S.; OKAMOTO, M.M.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 6, p. E934-E941, Dec. 1998.

LIN, W.; LIN, S.; WANG, C.; TSAI, Y.; CHEN, C.; TSAI, F. RUNX2 mutations in Taiwanese patients with cleidocranial dysplasia. *Genetics and Molecular Biology*, v.34, n. 2, p.201-204, 2011.

LIU, Q.; LIU, H.; YU, X.; WANG, Y.; YANG, C.; XU, H. Analysis of the role of insulin signaling in bone turnover induced by fluoride. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2015.

LIU, X.L.; SONG, J.; LIU, K.; WANG, W.; XU, C.; ZHANG, Y.; LIU, Y. Role of inhibition of osteogenesis function by Sema4D/Plexin-B1 signaling pathway in skeletal fluorosis in vitro. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, v.35, p. 712-715, 2015.

LIU, X.S.; ZOU H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X.D. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, v.89, p.175, 1997.

LOS, M.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The Role of Caspases in Development, Review Immunity, and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice. *Cell Press.*, v.10, p. 629-639, June 1999.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, v.21, p.115-37, 2000.

MCGOWN, E.L; SUTTIE, J.W. Mechanism of Fluoride Induced Hyperglycemia in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.40, p.83-90, 1977.

MELO, A. M.; BENATTI, R. O.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; TORSONI, A. S.; MILANSKI, M.; VELLOSO, L.A.; TORSONI, M. A. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism.*, v. 63, n. 5, p. 682-92, 2014.

MEUNIER, P.J.; SEBERT, J.L.; REGINSTER, J.Y.; BRIANCON, D.; APPELBOOM, T.; NETTER, P.; LOEB, G.; ROUILLON, A.; BARRY, S.; EVREUX, J.C.; AVOUAC, B.; MARCHANDISE, X. Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the FAVOStudy. *Osteoporos Int.*, v.8, n. 1, p. 4-12, 1998.

MOUSNY, M.; OMELON, S.; WISE, L.; EVERETT, E.T.; DUMITRIU, M.; HOLMYARD, D.P.; BANSE, X.; DEVOGELAER, J.P.; GRYNPAS, M.D. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone*, v.43, p.1067-1074, 2008.

NUNES, R.C.A.; CHIBA, F.Y.; PEREIRA, A.G.; PEREIRA, R.F.; MATTERA, M.S.L.C.; ERVOLINO, E.; LOUZADA, M.J.Q.; BUZALAF, M.A.R.; SILVA, C.A.; SUMIDA, D.H. Effect of sodium fluoride on bone biomechanical and histomorphometric parameters and on insulin signaling and insulin sensitivity in ovariectomized rats. *Biol Trace Elem Res.*, 2016.

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner. Res.*, v.11, p.1043-8, 1996.

PAK, C.Y.; SAKHAE, K.; PIZIA, V.; PETERSON, R.D.; BRESLAU, N.A.; BOYD, P.; POINDEXTER, J.R.; HERZOG, J.; HEARD-SAKHAE, A.; HAYNES, S.; ADAMS-HUET, B.; REISCH, J.S. Slow-release sodium fluoride in the management of postmenopausal osteoporosis - a randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, v.120, p. 625-632, 1994.

PAN, L.; SHI, X.; LIU, S.; GUO, X.; ZHAO, M.; CAI, R.; SUN, G. Fluoride promotes osteoblastic differentiation through canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Toxicol. Lett.*, v.225, p. 34-42, 2014.

PATTI, A.; GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; DOTTA, F.; NUTI, R. Endocrine Actions of Osteocalcin. *Int. J. Endocrinol.*, v. 2013, 2013.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, p. 53-4, 2009.

PLANK, J.; RYCHLO, A. A method for quick decalcification. *Zentralbl. Allg. Pathol.*, v. 89, n. 8, p. 252-254, Dec. 1952.

PRENTICE, A. Is nutrition important in osteoporosis? *Proc. Nutr. Soc.*, v.56, p. 357-367, 1997.

PRINCE, M.; BANERJEE, C.; JAVED, A.; GREEN, J.; LIAN, J.B.; STEIN, G.S.; BODINE, P.V.; KOMM, B.S. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J. Cell Biochem.*, v.80, p. 424-440, 2001.

RAISZ, L.G; RODAN, G.A. Embryology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Academic Press., p.1-22, 1998.

REN, G.; WANG, K.; CHANG, R.; SU, Y.; WANG, J.; SU, J.; HAN, B. Simultaneous administration of fluoride and selenite regulates proliferation and apoptosis in murine osteoblast-like MC3T3-E1 cells by altering osteoprotegerin. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.144, p.1437-1448, 2011.

RICH, C.; ENSINCK, J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature*, v.191, p.184-5, 1961.

RIGALLI, A.; ALLOATTI, R.; MENOYO, I.; PUCHE, R.C. Comparative study of effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung*, v.45, n. 3, p.189-92, 1995.

RIGALLI, A.; BALLINA, J.C.; ROVERI, E.; PUCHE, R.C. Inhibitory Effect of Fluoride on the Secretion of Insulin. *Calcified Tissue International*, v.46, p.333-38, 1990.

RIGGS, B.L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J. Clin. Invest.*, v.106, p.1203-4, 2000.

ROGERS, A.; SALEH, G.; HANNON, R.A; GREENFIELD, D.; EASTELL, R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, p.4470-5, 2002.

ROSSI, A.C.; FREIRE, A.R.; DORNELLES, R.C.M. Osteoporose:considerações sobre terapêuticas atuais e metabolismo ósseo. *Int. J. Dent.*, v.9, p. 210-214, 2010.

ROTH, J.; KAHN, C.R.; LESNIAK, M.A.; GORDEN, P.; DE MEYTS, P.; MEGYESI, K.; NEVILLE, D.M.; GAVIN JR, R.D.; SOLL, A.H.; FREYCHET, P.; GOLDFINE, I.D.; BAR, R.S.; ARCHER, J.A. Receptors for insulin, NSILA-s, and growth hormone: applications to disease states in man. *Recent ProgHorm Res.*, v.31, p.95-139, 1975.

SILVA, D.C.; PEREIRA, A.C.; BATISTA, A.C.; RIBEIRO-ROTTA, R.F. Correlação entre a expressão de osteocalcina e a de marcadores de reabsorção óssea (Rank, Rankl e OPG) em sítios implantáveis das maxilas e mandíbulas. Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Odontologia. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Osteoporose. Disponível em <<http://www.endocrino.org.br/10-coisas-que-voce-precisa-saber-sobre-osteoporose>> Acesso em 25 de junho de 2016.

SØGAARD, C. H.; MOSEKILDE, L.; SCHWARTZ, W.; LEIDIG, G.; MINNE, H. W.; ZIEGLER, R. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. *Bone*, v.16, n. 1, p. 163-169, 1995.

SOUSA, C.P.; NERY, F.; AZEVEDO, J.T.; VIEGAS, C. A.; GOMES, M.E.; DIAS, I.R. Tartrate-resistant acid phosphatase as a biomarker of bone turnover in dog. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.1, p.40-45, 2011.

SUN, F.; LI, X.; YANG, C.; LU, P.; LI, G.; XU, H. A role for PERK in the mechanism underlying fluoride-induced bone turnover. *Toxicology*, v.325, p. 52-66, 2014.

SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C. R; BACKER, J.M.; ARAKI, E.; WILDEN, P.A.; CAHILL, D.A.; GOLDSTEIN, B.J.; WHITE, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, v.352, n.6330, p.73-77, Jul. 1991.

SUN, X. J.; WANG, L. M.; ZHANG, Y.; YENUSH, L.; MYERS, M.G. JR.; GLASHEEN, E.; LANE, W.S.; PIERCE, J.H.; WHITE, M.F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, v.337, n. 6545, p.173-177, Sep. 1995.

TAKAYANAGI, H.; KIM, S.; MATSUO, K.; SUZUKI, H.; SUZUKI, T.; SATO, K.; YOKOCHI, T.; ODA, H.; NAKAMURA, K.; IDA, N.; WAGNER, E.F.; TANIGUCHI, T. RANKL maintains bones homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, v.416, p.744-9, 2002.

TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.; HAYAKAWA, T.; TERAUCHI, Y.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; SATOH, S.; SEKIHARA, H.; YOHIOKA, S.; HORIKOSHI, H.; FURUTA, Y.; IKAWA, Y.; KASUGA, M.; YAZAKI, T.; AIZAWA, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking, insulin receptor substrate-1. *Nature*, v.372, n.6502, p.182-186, Nov. 1994.

TAVES, D. R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta*, v. 15, n. 9, p. 969-974, Sep. 1968.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol. Med.*, v. 14, p. 222-231, 2008.

TOMKINSON, A.; GEVERS, E.F.; WIT, J.M.; REEVE, J.; NOBLE, B.S. The role of estrogen on the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.1243-50, 1998.

TRIVEDI, N.; MITHAL, A.; GUPTA, S.K.; GODBOLE, M.M.; GODBOLE FOR THE FLUORIDE COLLABORATIVE STUDY GROUP: Reversible impairment of

glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. *Diabetologia*, v.36, n. 9, p.826-8, 1993.

TURNER, C. H.; HINCKLEY, W.R.; WILSON, M.E.; ZHANG, W.; DUNIPACE, A. J. Combined effects of diets with reduced calcium and phosphate and increased fluoride intake on vertebral bone strength and histology in rats. *Calcif. Tissue Int.*, v. 69, n. 1, p. 51-57, Jul. 2001.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D.R. The PI3K- PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.*, v.346, p.561-576, Mar. 2000.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 43, n.6, p.415-22, 1999.

WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P.J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J.R.; KLIP, A. Protein Kinase B/ Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.*, v.19, n.6, p.4008-4018, Jun. 1999.

WATANABE, K.; IIZUKA, T.; ADELEKE, A.; PHAM, L.; SHLIMON, A.E.; YASIN, M.; HORVATH, P.; UNTERMAN, T.G. Involvement of toll like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. *J. Periodontal Res.* v. 46, n. 1, p. 21-30, 2011.

WHITE, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell Biochem.*, v.182, p.3-11, 1998.

WHITE, M.F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C.R. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, v.260, n.16, p.9470-9478, Agosto, 1985.

WHITFORD, G. Fluoride metabolism and excretion in children. *J. Public. Health Dent.*, v.59, n.4, p.224-228, 1999.

WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr. Oral Sci.*, v. 16, Rev 2, p. 1-153, 1996.

WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWER, H. et al: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, v.391, p.900-4, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1999.

YANG, C.; ZHANG, M.; LI, Y.; WANG, Y.; MAO, W.; GAO, Y.; XU, H. Streptozotocin aggravated osteopathology and insulin induced osteogenesis through co-treatment with fluoride. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 168, p.453-461, 2015.



YELLON, R.F.; LEONARD, G.; MARUCHA, P.T.; CRAVEN, R.; CARPENTER, R.J.; LEHMANN, W.B.; BURLESON, J.A.; KREUTZER, D.L. Characterization of cytokines present in middle ear effusions. *Laryngoscope*, v.101, p. 165-69, 1991.

ZHOU, L.; CHEN, H.; XU, P.; CONG, L.; SCIACCHITANO, S.; LI, Y.; GRAHAM, D.; JACOBS, A.R.; TAYLOR, S.I.; QUON, M.J. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT-4 in rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.*, v.13, p.505-14, 1999.

ZIMMERMAN, K.C.; GREEN, D.R. How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.108, p.99-103, 2001.

## ANEXO A

Parecer de aprovação da Comissão de Ética  
Na Experimentação Animal da Faculdade de  
Odontologia do *Campus* De Araçatuba -  
UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação de marcadores ósseos e sinal insulínico em ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio**", Processo FOA nº 2014-01004, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Setembro de 2014.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 03 de Agosto de 2016.


**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 03 de Setembro de 2016.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of bone markers and insulin signaling in ovariectomized rats treateds with sodium fluoride**", Protocol FOA nº 2014-01004, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 24, 2014.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 03, 2016.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** September 03, 2016.

  
**Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira**  
Coordenadora da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br