

KEILA AZIZ CHEHOUD DE MORAES

Efeitos decorrentes da
ingestão do fluoreto na
sensibilidade à insulina
e transdução do sinal
insulínico

ARAÇATUBA

2006

KEILA AZIZ CHEHOUD DE MORAES

Efeitos decorrentes da ingestão
do fluoreto na sensibilidade à
insulina e transdução do sinal
insulínico

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia
Preventiva e Social da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE.

Orientadora: Prof^a Ass. Dr^a. Doris Hissako Sumida

ARAÇATUBA

2006



Dedicatória

Dedicatória

À Deus pela força, amor, coragem e todos os cuidados e bênçãos que Ele me proporcionou no decorrer deste curso.

À minha mãe que sempre foi muito dedicada e exemplo de garra e perseverança, e me ensinou a lutar pelos meus objetivos.

Às minhas irmãs Karine, Kênia e Kelly, que sempre me acompanharam e torceram por mim.



Agradecimentos
especiais

Agradecimentos

especiais

À minha orientadora Doris Hissako Sumida e toda sua família Bráulio, Bruna e Lucas, pela paciência, apoio, companheirismo, ensinamentos e por me ajudar nos momentos difíceis.

À professora Nemre Adas Saliba e Prof. Orlando Saliba pela oportunidade e por terem me acolhido com carinho.

Às professoras Cléa Adas Saliba Garbin e Suzely Adas Saliba Moimaz pelo apoio e por serem exemplos de garra e profissionalismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social e professores, pela colaboração e oportunidade de aprendizado.

Aos professores Doutores Artênio José Isper Garbin, Eliel Soares Orenha, Maria Lúcia Mazza Sundefeld e Renato Moreira Arcieri.

Aos professores Doutores Alberto Carlos Botazzo Delbem e Kikue Takebayashi Sassaki e todos os professores e alunos do departamento de fisiologia,

bioquímica e pediatria, pela disposição e colaboração com esta pesquisa.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social, Neusa Martins Rovina Antunes, Nilton César Souza, Sônia Maria Batista de Souza Costa e Valderez Freitas Rosa, que estão sempre presentes para nos auxiliar.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araçatuba: Helena, Ana Cláudia, Izabel, Izamar, Cláudio, Ivone, Luzia, Marina, Maria Claudia e Alexandra, pela gentileza com que nos atendem.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araçatuba: Marina Midori Sakamoto Kawagoe e Valéria de Queiroz Zagatto, pela atenção e carinho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e ao Prof. Dr. Célio Percinoto, Diretor e Vice-diretor da Faculdade de Odontologia do *Campus* da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Aos colegas do Curso de pós-graduação Wanilda, Cláudio, Alessandra, Lívia, Patrícia, Nelly, Alessandro, Nino, Andréia, Antônio, Cezar, Eduardo, Fabíola, Giancarlo, Natanael, Ricardo, Ana Paula, Daniela, Karina, Ronald, Ana Valéria, Jeidson, Maria de Lourdes, e Joildo pela amizade, fidelidade e paciência durante esta caminhada.

À Fundação Mirim de Araçatuba e a Cirurgiã-dentista Dr^a. Neusa Keiko Minatogawa.

Aos professores Valdir, Letícia, Jet, Nancy, Perin, Carlos, Rossana e Marília, por sempre me apoiarem.

Aos meus queridos amigos Carú, Cléa, Karina, Gisele, Glauco, Totonho, Rafaela, Rose, Juliana, Priscila, Alexandre, Júlio, Jéssica, Neuzinha e tantos outros que sempre torceram por mim.

Aos queridos amigos Alfredo, Telma, Willian e Carla pelo amor e carinho.

À minha vovó Maria, que está sempre ao meu lado.

Aos meus lindos sobrinhos Bruno e Gabriel pela alegria e por serem tão lindos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

A todos, especialmente...

... muito obrigada!



Epígrafe

Epígrafe

"Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu:

Tempo de nascer e tempo de morrer,
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou,
tempo de matar e tempo de curar,
tempo de derrubar e tempo de construir,
tempo de chorar e tempo de rir,
tempo de prantear e tempo de dançar,
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las,
tempo de abraçar e tempo de se conter,
tempo de procurar e tempo de desistir,
tempo de guardar e tempo de jogar fora,
tempo de rasgar e tempo de costurar,
tempo de calar e tempo de falar,
tempo de amar e tempo de odiar,
tempo de lutar e tempo de viver em paz..."

(Eclesiastes 3:1-8)



Resumo

Resumo

Chehoud KA. Efeitos decorrentes da ingestão do fluoreto na sensibilidade à insulina e transdução do sinal insulínico. [Dissertação] Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2006.

Nos últimos anos tem ocorrido uma redução acentuada nos índices de cárie dentária em diversas regiões do planeta, fato que tem se atribuído ao consumo de produtos fluoretados. Entretanto, o flúor, quando ingerido em excesso, causa intoxicação crônica ou aguda, como a fluorose dentária e distúrbios na homeostase da glicose. As crianças se tornam foco de preocupação, principalmente às portadoras de diabetes mellitus (DM), pois geralmente ingerem grandes quantidades de dentifrício fluoretado durante a escovação, ultrapassando a dose preconizada como limite de ingestão diária de flúor de 0,05 a 0,07mg/F/kg de peso corpóreo. Este trabalho, que foi dividido em duas partes, pretende realizar uma breve revisão de literatura sobre os efeitos decorrentes da ingestão de NaF no metabolismo de carboidratos e avaliar os efeitos da ingestão do fluoreto na sensibilidade à insulina e na transdução do sinal insulínico. A primeira parte, baseada em artigos científicos

publicados, procura discorrer sobre os efeitos da ingestão de flúor no metabolismo de carboidratos, na tolerância à glicose e no sinal insulínico, e algumas considerações sobre o diabetes mellitus e sobre as possíveis complicações que a ingestão de NaF pode ocasionar às crianças portadoras desta doença. Estes trabalhos demonstraram que o tratamento agudo ou prolongado com altas doses de fluoreto de sódio interfere na homeostase da glicose. Convém salientar que esta alteração é similar à observada em casos de diabetes mellitus. Além do mais, o flúor quando ingerido em excesso, também ocasiona diminuição da secreção de insulina, inibição da glicólise e depleção de glicogênio. Muitas dessas respostas sugerem que o NaF pode promover resistência à insulina. Portanto, a ingestão em excesso de NaF pode prejudicar a saúde, principalmente de crianças portadora de DM. Sabendo-se que o flúor pode interferir no metabolismo de carboidratos, tornou-se fundamental para a segunda parte do presente estudo, averiguar o efeito agudo do NaF sobre a sensibilidade à insulina e fosforilação da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecidos sensíveis à insulina. Para tanto, foram utilizados para esta pesquisa ratos Wistar com um mês de idade. Após 21 dias da castração, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (CN), o qual foi submetido a uma gavagem com uma solução de NaCl 3,2 mg/kg p.c., sem NaF, mas contendo a mesma

quantidade de sódio que a administrada para outro grupo; 2) grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido à gavagem com NaF (1,0 mg F/kg). Após 30 minutos da gavagem, foram realizados os experimentos de teste endovenoso de tolerância à insulina (dose de 0,75U/ kg p.c.) e avaliação do grau de fosforilação do substrato do receptor de insulina (pp 185 – IRS-1/IRS-2). O tratamento agudo com NaF promoveu um aumento na glicemia, porém não houve alteração na sensibilidade à insulina e no grau de fosforilação da pp185 tanto no tecido muscular como no adiposo branco. Sabendo-se que o fluoreto pode promover hiperglicemia, é recomendável utilizar dentifrícios com baixo teor de flúor, principalmente por crianças diabéticas, para as quais o excesso no consumo de flúor pode levar à piora na situação de saúde das mesmas.

Palavras – chave: Sensibilidade à insulina. Sinal insulínico. Flúor Insulina. Diabetes mellitus. Receptor de insulina.



Abstract

Abstract

Chehoud KA. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. [Dissertation] Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2006.

Over the last few years there has been a significant reduction in the incidence of dental caries in several regions of the world. This has been attributed to the consumption of fluoridated products. However, excess of fluoride intake can cause chronic or acute intoxication, such as dental fluorosis and impaired glucose homeostasis. Concern is focused on children, especially those with diabetes mellitus, because children usually swallow large amounts of fluoridated dentifrice during tooth brushing, in excess of the maximum recommended daily fluoride dose of 0.05 to 0.07 mg/F/kg of body weight. This report, divided into two parts, intends to make a brief literature review about effects of NaF intake on glucose metabolism, and to determine the effects of this intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. The first part, based on published scientific articles, endeavors to describe the effects of NaF intake on glucose metabolism, glucose tolerance and insulin signal, and put forward considerations

concerning diabetes mellitus (DM), and the possible complications that NaF intake could cause in children with DM. These reports demonstrated that the acute or chronic treatment with high sodium fluoride dose interferes in glucose homeostasis, resulting in conditions such as hyperglycemia. This alteration is similar to that observed in DM. Furthermore, NaF ingestion in high doses can produce abnormalities in insulin secretion, glycolysis inhibition, and glycogen depletion. Many of these evidences suggest that NaF can induce insulin resistance. Thus, excessive fluoride consumption could worsen health, particularly of diabetic children. Based on that fluoride can interfere in the glucose metabolism, it is important for the second part of this report to determine the acute effect of fluoride on insulin sensitivity and pp185 (IRS-1/IRS-2) phosphorylation in insulin sensitive tissues. For this study, four-week-old male Wistar rats were used. Twenty-one days after castration, the animals were randomly divided in two groups: 1) control group (CN) that received a solution without NaF (administered by gavage), but with a NaCl solution (3,2 mg/kg b.w.) that had the same amount of sodium administered to the other group; 2) group NaF (FN) that had a single dose of a solution containing 1.0 mg F/kg of body weight, administered by gavage. After 30 min, the following experiments were conducted: intravenous insulin tolerance test (0.75U/ kg b.w., i.v.) and

determination of the insulin receptor substrate phosphorylation status (pp 185 – IRS-1/IRS/2). The acute treatment with NaF promoted increased blood glycemia, but there were no significant changes in the insulin sensitivity and in the pp185 phosphorylation status in the muscular or in the white adipose tissues. Therefore, based on studies that showed fluoride is capable of changing carbohydrate metabolism, it is important to reinforce the use of low fluoride-containing dentifrice, especially by diabetic children, for whom excessive fluoride consumption could worsen the condition of their health.

Keywords: Insulin sensitivity. Insulin signal. Fluorine. Insulin. Diabetes mellitus. Receptor, insulin.

Lista de figuras

Capítulo 2

- Figura 1 Fluoremia (μg de F/mL) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com NaF (FN), na dose de 1mg F/ kg. Valores apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animais. 57
- Figura 2 Teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg. As amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 5 experimentos. 58
*p<0,05
- Figura 3 Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 5 experimentos. 59
- Figura 4 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido muscular gastrocnêmio de ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Em **A**, autorradiografia típica. Em **B**, os resultados do grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, expressos em 60

unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

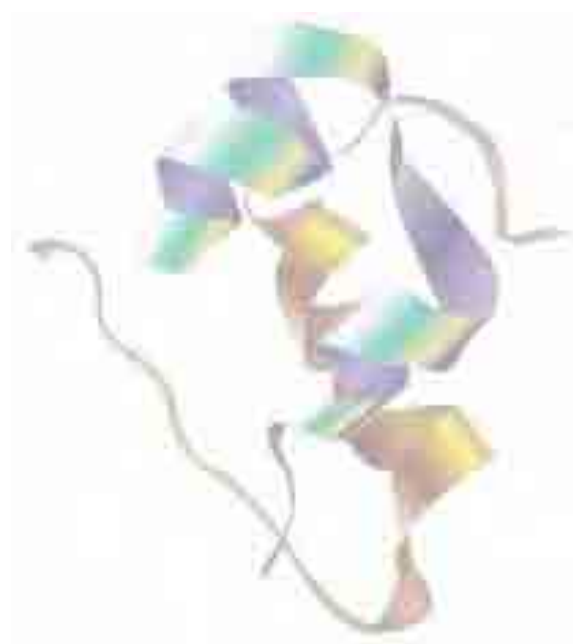
Figura 5 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da 61
pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido muscular
adiposo de ratos castrados submetidos a uma
gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de
1,0 mg F/kg, antes (-) e após (+) infusão de
insulina. Em **A**, autorradiografia típica. Em **B**, os
resultados do grau de fosforilação da pp185,
após o estímulo insulínico, expressos em
unidades arbitrárias por μg de proteína
amostrada. Valores são apresentados como
média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

Lista de abreviaturas

HMDS	hexametildisiloxano
F	flúor, íon flúor, fluoreto
DM	diabetes mellitus
OMS	Organização Mundial da Saúde
NaF	fluoreto de sódio
IRS	substrato do receptor de insulina
IRS-1	substrato do receptor de insulina 1
IRS-2	substrato do receptor de insulina 2
AMPc	adenosina-3', 5'-monofosfato cíclica
ITT	teste endovenoso de tolerância à insulina
K_{itt}	velocidade de desaparecimento da glicose
CN	grupo controle
FN	grupo tratado com fluoreto de sódio

Sumário

1 Efeito da ingestão de flúor no metabolismo de carboidratos, tolerância à glicose e sinal insulínico	23
1.1 Resumo	24
1.2 Abstract	25
1.3 Introdução	26
1.4 Aspectos fisiológicos da ação insulínica	28
1.5 Características do diabetes mellitus	31
1.6 Características do consumo e absorção do fluoreto e sua influência na homeostase da glicose	33
1.7 Referências	39
2 Efeitos decorrentes da ingestão do fluoreto na sensibilidade à insulina e transdução do sinal insulínico	49
2.1 Resumo	50
2.2 Abstract	51
2.3 Introdução	52
2.4 Materiais e métodos	53
2.4.1 Animais	53
2.4.2 Determinação da concentração de íon flúor no plasma sanguíneo	54
2.4.3 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	55
2.4.4 Avaliação do grau de fosforilação do substrato do receptor de insulina (pp185-IRS-1/IRS-2)	55
2.4.5 Análise estatística	56
2.5 Resultados	57
2.6 Discussão	62
2.7 Referências	68
Anexos	75



1

1 Capítulo 1

***EFEITO DA INGESTÃO DE FLÚOR NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, TOLERÂNCIA À GLICOSE E SINAL INSULÍNICO**

Effect of fluoride intake on carbohydrate metabolism, glucose
tolerance and insulin signal

1.1 RESUMO

Nos últimos anos, tem havido uma redução acentuada nos índices de cárie dentária em diversas regiões do mundo, fato que tem se atribuído ao consumo de produtos fluoretados. Entretanto, o flúor, quando ingerido em excesso, causa intoxicação crônica ou aguda, como a fluorose dentária e distúrbios na homeostase da glicose. O NaF, quando consumido em altas doses, pode ocasionar diminuição da secreção de insulina, inibição da glicólise, depleção de glicogênio e hiperglicemia. Muitas dessas respostas sugerem que o NaF pode promover resistência à insulina. As crianças se tornam foco de preocupação, principalmente as portadoras de

* Normalização de acordo com a REVISTA CHILENA DE PEDIATRIA - ISSN 0370-4106 (Anexo A)

diabetes mellitus, pois geralmente ingerem grandes quantidades de dentifrício fluoretado durante a escovação, ultrapassando a dose preconizada como limite de ingestão diária de flúor de 0,05 a 0,07mg/F/kg de peso corpóreo. Sabendo-se que o fluoreto pode alterar o metabolismo de carboidratos, é recomendável utilizar dentifrícios com baixo teor de flúor, principalmente por crianças diabéticas, para as quais o excesso no consumo de flúor pode levar à piora na situação de saúde das mesmas.

Palavras – Chave: sensibilidade à insulina, sinal insulínico, flúor, insulina, diabetes mellitus.

1.2 ABSTRACT

Over the last few years there has been significant reduction in the incidence of dental caries in several regions of the world. This has been attributed to the consumption of fluoridated products. However, excess of fluoride ingestion can cause chronic or acute intoxication, such as dental fluorosis and impaired glucose homeostasis. NaF ingestion in high doses can produce abnormalities in insulin secretion, glycolysis inhibition, glycogen depletion and hyperglycemia. These evidences suggest that NaF

can induce insulin resistance. Concern is focused on children, especially those with diabetes mellitus, because children usually swallow large amounts of fluoridated dentifrice during tooth brushing, in excess of the maximum recommended daily fluoride dose of 0.05 to 0.07 mg/F/kg of body weight. Based on studies that showed fluoride was capable of changing carbohydrate metabolism, it is important to reinforce the use of low fluoride-containing dentifrice, especially by diabetic children, for whom excessive fluoride consumption could worsen their health.

Keywords: insulin sensitivity, insulin signal, fluorine, insulin, diabetes mellitus.

1.3 INTRODUÇÃO

Uma epidemia de diabetes mellitus (DM) vem sendo observada, com tendência de crescimento na próxima década (1,2). As complicações do DM, tanto micro como macrovasculares, são consideradas como uma das maiores ameaças à saúde em todo mundo, com imensos custos econômicos e sociais (3). O aumento da glicose intra-celular é o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que pode ser reversível quando restaurada a condição de normoglicemia, ou irreversível, mesmo

que revertida a hiperglicemia, pois originou-se de alterações acumulativas em macro-moléculas de vida longa (4). Hiperglicemia também pode ocorrer por tratamento agudo ou prolongado com altas doses de fluoreto de sódio (5-9), evidenciando que a homeostase da glicose sofre influência do fluoreto de sódio (NaF) e esta alteração é similar à observada em diabetes mellitus. O fluoreto tem sido usado de diversas maneiras na prevenção da cárie dental. Entre os vários métodos de utilização do flúor, o uso do dentifrício associado a outros métodos, como a água de abastecimento público, tem sido os grandes responsáveis pelo declínio desta doença (10). Entretanto observa-se que algumas crianças estão expostas ao fluoreto em níveis acima da dose preconizada como limite, somente pelo uso de dentifrício fluoretado (11,12). Além disso, o flúor está presente em quantidades significativas nos chocolates em barra, bolachas (13), cereais matinais e salgadinhos (14), que são guloseimas altamente apreciadas pelas crianças. Os objetivos da presente revisão são: 1) comentar sobre os efeitos da ingestão de flúor no metabolismo de carboidratos, na tolerância à glicose e no sinal insulínico; 2) discorrer brevemente sobre o diabetes mellitus, pois a ingestão em excesso de NaF pode prejudicar a saúde, principalmente de crianças portadora de DM.

1.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA AÇÃO INSULÍNICA

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Este hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (15). A insulina exerce seu efeito através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. Este hormônio regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (15).

O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto(16). A subunidade alfa é inteiramente extracelular, com peso molecular de 135 kDa, e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade beta é uma proteína transmembrânica (95 kDa) responsável pela transdução do sinal insulínico (16,17). KASUGA *et al* (17,18) descreveram que a subunidade beta do receptor de insulina é uma

proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica (19).

O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar vários substratos protéicos em tirosina, tais como, IRS 1 a 6, Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (20-22). Quando os IRSs estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo a porção SH2 e ativá-las. Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas através 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 (23). 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. O camundongo que não expressa o IRS-2 apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretora das células β acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas (24). Em contraste, camundongos

knockout para o IRS-3 e IRS-4 têm crescimento e metabolismo de glicose quase normal (25). Por outro lado, os camundongos sem *Gab1* apresentam um aumento na sensibilidade insulínica no fígado, glicemia reduzida e uma melhora na tolerância à glicose (26).

Em suma, a ação insulínica envolve uma seqüência de interações covalentes e não covalentes centralizadas, em primeiro nível, nos substratos do receptor de insulina. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação destes substratos. Estes servem, então, como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais. Portanto, os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação de insulina presentes na resistência à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e ou curativo para o diabetes mellitus.

1.5 CARACTERÍSTICAS DO DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é considerado um problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto de vista social e econômico e com potencial reconhecido para prevenção (3). É uma doença crônica causada por uma deficiência do pâncreas na produção de insulina, ou por incapacidade da insulina exercer adequadamente suas funções (27).

Atualmente, existe uma epidemia de diabetes em curso. Em 1985, eram 30 milhões de pacientes no mundo todo. Uma década mais tarde, o número triplicou (135 milhões). No ano de 2000, existiam 177 milhões de pessoas portadoras de DM, porém este quadro deverá aumentar para 370 milhões até 2030.

Aproximadamente quatro milhões de mortes ao ano são atribuídas a complicações do diabetes no mundo. Os países com maior número de pessoas portadoras de DM são Índia, China, Estados Unidos e Indonésia. Os custos de atenção ao diabetes variam de 2,5% a 15% dos orçamentos anuais da saúde, dependendo da prevalência local do diabetes e do nível de complexidade dos tratamentos disponíveis (27).

Existem dois tipos principais de diabetes, que são o diabetes tipo 1 (DM1) e o diabetes tipo 2 (DM2). O DM1 é quando o pâncreas não produz a insulina essencial à sobrevivência. Esse

tipo de diabetes ocorre mais freqüentemente nas crianças e nos adolescentes, mas também pode ocorrer em pessoas com mais idade (27). O DM1, segundo a Organização Mundial da Saúde, é uma das mais importantes doenças crônicas da infância (28). O DM1 está associado com o desenvolvimento de doenças micro e macrovasculares em crianças e adolescentes. Estes problemas estão representados principalmente pela angiopatia, caracterizada por alterações estruturais no olho, glomérulos renais e nervos periféricos. Intervenções terapêuticas, particularmente um controle metabólico excelente, podem ser efetivas na prevenção de complicações iniciais ou para retardar a progressão da doença (29).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) resulta da incapacidade do corpo de responder adequadamente à ação da insulina produzida pelo pâncreas. A maioria dos diabéticos apresenta este tipo da doença. O DM2 ocorre com maior freqüência nos adultos, mas está sendo observado cada vez mais nas crianças e nos adolescentes (27). A resistência à insulina no tecido e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum, alterações bastante freqüentes em indivíduos obesos, parecem ser os primeiros sinais para o desenvolvimento do DM2. Este tipo de diabetes tem contribuído com mais de 30% dos novos casos desta doença, mostrando uma possível relação do aumento da prevalência de obesidade infantil com o desenvolvimento desta doença (30). Na infância, a

resistência à insulina associada com hiperinsulinemia são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da diminuição da tolerância à glicose em crianças obesas (31).

A presença de uma doença crônica degenerativa, como o diabetes mellitus, gera sentimentos diversos como angústia, temor e incerteza nos diabéticos e em seus familiares. Os aspectos psicológicos estão diretamente relacionados com o controle metabólico do paciente (32).

Baseado nesses relatos, tornou-se imprescindível realizar estudos e pesquisas na busca de mecanismos preventivos ou curativos para o DM. Sabe-se que esta doença promove alterações principalmente no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Verificou-se que dentre os elementos químicos, o flúor pode interferir no metabolismo de lipídeos e de carboidratos (5,8,9,33-35).

1.6 CARACTERÍSTICAS DO CONSUMO E ABSORÇÃO DO FLUORETO E SUA INFLUÊNCIA NA HOMEOSTASE DA GLICOSE

Vários estudos demonstraram que o consumo de fluoreto em excesso ocasiona hiperglicemia (5, 8, 9, 36-38). Entretanto, a maneira como este fato ocorre ainda não está bem esclarecida (9). Uma pesquisa realizada em 25 pacientes (15 a 30 anos de idade)

com fluorose endêmica, mostrou que 40% destes tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém esta anomalia foi revertida com a remoção do excesso do flúor na água consumida (39).

O flúor 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 (40,41).

Durante o seu trajeto no trato gastrintestinal, o flúor atravessa as membranas celulares por difusão passiva e alcança a corrente sanguínea. A maior parte do flúor absorvido é captada por tecidos calcificados e excretados pela urina (42). A porcentagem de flúor excretada em relação à ingerida e absorvida, depende da idade do indivíduo, e as crianças absorvem mais flúor que os adultos (43).

Nas últimas décadas tem-se observado, devido ao amplo uso de produtos fluoretados, um declínio na prevalência de cárie dentária, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento (10). Entretanto, concomitantemente tem sido relatado um aumento na prevalência de fluorose dentária. Este aumento é devido à ingestão em excesso de flúor a partir de suas várias fontes, durante o período crítico de formação dentária,

que abrange dos 11 meses aos 7 anos de vida para a dentição permanente (44).

Fluorose é uma alteração do esmalte dental (hipomineralização), caracterizada por manchas de aspecto variado de acordo com a severidade. Tem sido considerado que as manchas dentais fluoróticas, tipos muito leve e leve não tem significado estético e não se constituem em problema de saúde pública. Entretanto, tem sido recomendado que sejam realizados estudos para avaliar a percepção pública a respeito dos níveis nos quais a fluorose dental e outras opacidades do esmalte são percebidas como problema (45).

A pasta dental deve ser considerada uma importante fonte de exposição sistêmica ao flúor. A ingestão de flúor a partir do dentifrício fluoretado pode variar de 14% a 98% (idade 2 a 3 anos) e 0% a 76% (idade 4 a 7 anos) da quantidade colocada na escova (11, 12, 46). Outros trabalhos também confirmam que a ingestão de F é inversamente proporcional à idade da criança (47, 48, 49). A associação de água de abastecimento e dentifrícios fluoretados seria uma das explicações para a tendência de aumento da prevalência da fluorose dental (50).

Contudo, deve-se determinar corretamente a dose apropriada para produzir o máximo de redução de cáries, com o mínimo de fluorose dental (46). Para tanto, foram desenvolvidas pesquisas no

intuito de determinar uma dose ideal de exposição ao flúor. O limite de ingestão deste, capaz de evitar graus indesejáveis de fluorose dental, está estimado em torno de 0,05 a 0,07 mg F/kg/dia de peso corpóreo (51).

Estudos realizados em crianças (20 a 30 meses de idade) mostraram que os dentifrícios fluoretados contribuíram com 55% para a dose total de exposição diária a flúor. Os dados deste trabalho mostram que, em média de 0,052 mg F/kg/dia p.c., as crianças estão expostas pelo dentifrício a uma dose próxima ao limite, conforme descrito acima. Entretanto, há crianças expostas a doses excessivamente altas (por exemplo, 0,185 mg F/Kg/dia p.c.). Isto poderia estar relacionado à ingestão de até 90% do dentifrício colocado na escova (12). Pessan *et al* (11) observaram que em crianças de 4 a 7 anos, o dentifrício foi sua principal fonte de flúor ingerida, com percentuais de 57% e em média de 0,037 mg F/kg/dia p.c., com variabilidade de 0,000 a 0,155 mg de F/kg/dia p.c.

Rigalli *et al* (5) constataram uma diminuição da secreção de insulina tanto em pacientes como em ratas após ingerirem 0,84 e 16,8 mg/kg de NaF, respectivamente. Estas ratas receberam uma dose de NaF 20 vezes maior a que foi administrado nestes voluntários humanos. Esta significativa diferença na dose administrada foi necessária para atingir um pico plasmático

similar em ambos os modelos, isto provavelmente deve-se à grande diferença na taxa de “turnover” do osso. Em estudos posteriores com ratos, Rigalli *et al* (8) demonstraram que NaF difundido no plasma afeta a homeostasia da glicose quando estiver acima de $5\mu\text{mol/l}$. Além disso, o fluoreto ocasiona inibição da glicólise (34) e hiperglicemia e depleção de glicogênio hepático, muscular e baço (33-35). Muitas destas respostas sugerem que o fluoreto pode ocasionar resistência à insulina.

Segundo Allamann e Kleiner (37), o mecanismo pelo qual o NaF induz hiperglicemia pode ser devido a um ou mais fatores como: a) aumento da glicogenólise devido a um aumento do AMPc; b) aumento da liberação de epinefrina; c) ativação ou inibição de certas enzimas. MacGowen e Suttie (36) propuseram que a hiperglicemia induzida pelo NaF seria decorrente do seu efeito positivo sobre a liberação de epinefrina que poderia aumentar a glicogenólise. Por outro lado, Allamann e Kleiner (37) acreditam que esta hiperglicemia poderia ser resultado de uma via dependente de AMPc. Estes autores observaram que o aumento de AMPc induzido por NaF poderia fosforilar e ativar o glicogênio.

O estudo da regulação das etapas iniciais da ação insulínica em modelos animais pode ser realizado *in vitro*, através de receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou *in vivo*, após a infusão de insulina. Pesquisas

realizadas por Viñals *et al* (52, 53), em receptores de insulina isolados de tecido muscular de ratos e placenta humana, demonstraram que o fluoreto promoveu uma diminuição na autofosforilação induzida por insulina e na fosforilação dos substratos exógenos usados. Sabe-se que uma diminuição na fosforilação do receptor de insulina tem sido bem correlacionada com situações de resistência à insulina (17, 19).

Convém salientar que além do abastecimento público e dentifrício fluoretado, o flúor também é consumido através das bebidas e alimentos. O flúor está presente em quantidades significativas nos chocolates em barra, bolachas (13) cereais matinais e salgadinhos (14), que são guloseimas altamente apreciadas pelas crianças.

Concentrações significativas de flúor também foram encontradas no chá preto e em bebidas a base de chá com potencial de expor uma criança a doses mais altas do que a dose limite de 0,07mg F/kg/dia (54) de peso corpóreo. Buzalaf *et al* (55), em sua revisão de literatura enfatizaram que o leite em pó é considerado um fator de risco para fluorose dental, principalmente em áreas fluoretadas, devido o uso de água fluoretada para reconstituir este alimento. Portanto há uma necessidade que haja um controle ou até mesmo uma diminuição de produtos fluoretados em locais com fluoretação da água de abastecimento,

pois pode ocasionar ingestão de fluoreto acima da dose limite, principalmente por crianças e adolescentes portadores de diabetes mellitus, no qual o flúor poderá potencializar o efeito da doença, se for consumido em doses excessivas. Além do mais, os resultados de Negri e Cury (56) sugerem que o dentifrício com metade da concentração (500 mg/L) pode ter a mesma eficácia terapêutica que uma pasta convencional com 1100 mg/l, a qual será mais segura em termos de fluorose dental.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve auxílio FAPESP (nº. do processo 05/53301-1).

1.7 REFERÊNCIAS

- 1 *Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al:* Diabetes trends in the U.S. *Diabetes Care* 2000;23:1278-83.
- 2 *Schaan BD:* O Papel da Proteína Quinase C no Desenvolvimento das Complicações Vasculares do Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabo* 2003;47(6):654-62.
- 3 *Georg AE, Duncan BB, Toscano CM, et al:* Análise econômica de programa para rastreamento do diabetes mellitus no Brasil. *Rev Saúde Pública* 2005;39 (3):452-60.

- 4 *Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M*: The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International* 2000;58 Suppl 77:S26-S30.
- 5 *Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC*: Inhibitory Effect of Fluoride on the Secretion of Insulin. *Calcified Tissue International* 1990;46:333-38.
- 6 *Sakurai T, Suzuki K, Taki T, Suketa Y*: The mechanism of changes in metabolism and transport of glucose caused by fluoride administration to rats [abstract]. *Fluoride* 1993;26(3):210.
- 7 *Appleton J*: Changes in the plasma electrolytes and metabolites of the rat following acute exposure to sodium fluoride and strontium chloride. *Arch Oral Biol* 1995;40:265-8.
- 8 *Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC*: Comparative study of effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung* 1995;45(3):189-92.
- 9 *Grucka-Mamczar E, Birkner E, Kasperczyk S, et al*: Lipid Balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. *Fluoride* 2004;37(3):195-200.
- 10 *Narvai PC, Frazão P, Castellanos RA*: Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no

final do século XX. *Odontologia e Sociedade* 1999;1(1/2):25-29.

- 11 *Pessan JP, Silva SMB, Buzalaf MAR*: Avaliação da ingestão total de flúor de crianças entre 4 e 7 anos de idade através da dieta e dentifrício. *J. Appl. Oral. Sci* 2003;11(2):150-6.
- 12 *Lima YBO, Cury JA*: Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. *Rev. Saúde Pública* 2001;35(6):576-581.
- 13 *Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Cardoso VES, Silva TL, Olympio KPK*: Fluorine content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(2):223-7.
- 14 *Cardoso VES, Olympio KPK, Granjeiro, JM, Buzalaf, MAR*: Fluoride content of several breakfast cereals and snacks found in Brazil. *Journal of Applied Oral Science*, 2003;11(4).
- 15 *Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA*: Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(2):419-25.
- 16 *Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR*: Structure of insulin receptor and its subunits. *J. Biol. Chem.* 1982a;257:10392-9.
- 17 *Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR*: Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982b;215:185-7.

- 18 *Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR*: Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in cell-free system. *Nature* 1982c;298: 667-9.
- 19 *Ebina Y, Araki E, Taira M, et al*: 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. Nat. Acad. Sci. Usa.* 1987;84: 704-8.
- 20 *Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA*: Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 1996;271:22100-4.
- 21 *Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, et al*: Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001;500:119-24.
- 22 *Pessin JE, Saltiel AR*: Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:165-9.
- 23 *Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al*: Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;372:186-90.
- 24 *Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al*: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-4.

- 25 *Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR*: Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E127-33.
- 26 *Bard-Chapeau EA, Hevener AL, Long S, Zhang EE, Olefsky JM, Feng GS*: Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med.* 2005;11(5):567-71.
- 27 *Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde*: Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde: Brasília, 2003.
- 28 *Zanetti ML, Mendes IAC*: Análise das dificuldades relacionadas às atividades diárias de crianças e adolescente com diabetes mellitus tipo1: Depoimento de mães. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*.2001;9(6): 25-30.
- 29 *Verrotti A, Trotta D, SalladinI C, Laura M, Chiarelli F*: Preventing microvascular diabetic complications in children and adolescents: looking beyond glycaemic control. *Expert. Opin. Pharmacother*.2003;4(4):525-32.
- 30 *Oliveira CL, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M*: Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. *Revista de Nutrição* 2004;17(2):237-245.

- 31 *Sinha R, Fisch G, Teague B*: Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med* 2002;346(11):802-10.
- 32 *Maia FFR, Araújo LR*: Aspectos psicológicos e controle glicêmico de um grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 em Minas Gerais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48:261-266.
- 33 *Handler P, Herring H, JR, Hebb JH*: The effects of insulin in fluoride – poisoned rats. *J. Biol. Chem.* 1946;162:679-683.
- 34 *Dost FN, Knaus RM, Johnson DE, Wang CH*: Fluoride impairment of glucose utilization: nature of effect in rats during and after continuous NaF infusion. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1977;41:451-458.
- 35 *Shashi, JP, Singh, Thapar, SP*. Changes in glycogen content in same tissues during fluorosis – an experimental study on rabbits. *Fluoride* 1988;21:82-86.
- 36 *McGown EL, Suttie JW*: Mechanism of Fluoride Induced Hyperglycemia in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1977;40:83-90.
- 37 *Allmann DW, Kleiner HS*: Effect of NaF on Rat Tissue cAMP levels *in vivo*. *Pharmacology and Therapeutics in Dentistry* 1980;5:73-78.

- 38 *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*
2005;38(1):48-51.
- 39 *Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM, Godbole for the*
Fluoride Collaborative Study Group: Reversible impairment of
glucose tolerance in patients with endemic fluorosis.
Diabetologia 1993;36(9):826-8.
- 40 *Ekstrand J, Ehrnebo M:* Influence of milk products on fluoride
bioavailability in man. *Eur. J.Clin. Pharmacol.* 1979;16
(3):211-5.
- 41 *Whitford G:* Fluoride metabolism and excretion in children. *J.*
Public Health Dent. 1999;59(4):224-28.
- 42 *Whitford G:* The metabolism and toxicity of fluoride: New
York: Karger, 1989.
- 43 *Ekstrand J, Koch G, Lindgren LE, Petterson LG:*
Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults.
Caries Res 1981;15:213-20.
- 44 *Ishii T, Suckling G:* The severity of dental fluorosis in children
exposed to water with a high fluoride content for various
periods of time. *J Dent Res* 1991; 70:952-6.

- 45 *Bawden JW, Crenshaw MA, Wright JT, LeGeros RZ:* Consideration of possible biologic mechanisms of fluorosis. *J Dent Res* 1995;74:1349-52.
- 46 *Paiva SM, Cury JA:* Dentifrício Fluoretado e risco de fluorose dentária. *RPG* 2001;8 (4): 322-328.
- 47 *Richards A, Banting DW:* Fluoride toothpastes: In: Fejerskov O, Burt BA, editors: Fluoride in dentistry: Copenhagen, Munksgaard, 1996.
- 48 *Barnhart WE, Hiller LK, Leonard GJ, Michaels SE:* Dentifrice usage and ingestion among four age groups. *J Dent Res* 1974;53(6):1317-1322.
- 49 *Baxter PM:* Toothpaste ingestion during toothbrushing by school children. *Br Dent J* 1980;148(5):125-128.
- 50 *Pendrys DG, Katz RV, Morse DE:* Risk factors for enamel fluorosis in a fluoridated population. *Am. J. Epidemiol.* 1996;143:808-15.
- 51 *Burt BA:* The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res* 1992;71(5):1228-37.
- 52 *Viñals F, Testar X, Palacin M, Zorzano, A:* Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochem. J.* 1993;291:615-622.
- 53 *Viñals F, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A:* Effects of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor:

Inhibition by fluoride is magnesium dependent. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997;171:69-73.

54 *Hayacibara MF, Queiroz CS, Tabchoury CPM, Cury JA:* Fluoride and aluminum in teas and tea-based beverages. *Rev. Saúde Pública* 2004;38(1):100-105.

55 *Buzalaf MA, Granjeiro JM, Damante CA, de Ornelas F:* Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. *ASDC J Dent Child.* 2001;68(1):37-41.

56 *Negri HMD, Cury JA:* Efeito dose-resposta de uma formulação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto – estudo in vitro. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16(4):361-365.



Capítulo 2

2 Capítulo 2

***EFEITOS DECORRENTES DA INGESTÃO DO FLUORETO NA SENSIBILIDADE À INSULINA E TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO**

Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal
transduction

2.1 RESUMO

Foram utilizados para esta pesquisa ratos Wistar com um mês de idade. Após 21 dias da castração, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (CN), o qual foi submetido a uma gavagem com uma solução de NaCl 3,2 mg/kg, sem NaF, mas contendo a mesma quantidade de sódio que a administrada para o outro grupo; 2) grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido a uma gavagem com NaF (1,0 mg F/kg). Após 30 minutos, foram realizados em ambos os grupos os seguintes experimentos: teste endovenoso de tolerância à insulina (dose de 0,75U/kg p.c.) e avaliação do grau de

* Normalização segundo a revista FLUORIDE - ISSN 0015-4725 (Anexo B)

fosforilação do substrato do receptor de insulina (pp 185 – IRS-1/IRS-2). O tratamento agudo com NaF promoveu um aumento na glicemia, porém não houve alteração significativa na sensibilidade à insulina e no grau de fosforilação da pp185 tanto no tecido muscular como no adiposo branco.

Palavras-chave: Sensibilidade à insulina, Sinal insulínico, Flúor, Insulina, Receptor de insulina.

2.2 ABSTRACT

Four-week-old male Wistar rats were used in this research. Twenty-one days after castration, the animals were randomly divided in two groups: 1) control group (CN) that received a solution without NaF (administered by gavage), but with a NaCl solution (3,2 mg/kg) that had the same amount of sodium administered to the other group; 2) group NaF (FN) that had a single dose of a solution containing 1.0 mg F/kg of body weight, administered by gavage. After 30 min, the following experiments were performed: intravenous insulin tolerance test (0.75U/kg BW, i.v.) and determination of the insulin receptor substrate phosphorylation status (pp 185 – IRS-1 / IRS-2). The acute treatment with NaF promoted increased blood glycemia, but there

were no significant changes in the insulin sensitivity and in the pp185 phosphorylation status in the muscular or in the white adipose tissues.

Keywords: Insulin sensitivity, Insulin signal, Fluorine, Insulin, Receptor, insulin.

2.3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma redução acentuada nos índices de cárie dentária em diversas regiões do planeta, fato que tem se atribuído ao consumo de produtos fluoretados¹. No entanto, ao ser ingerido em excesso, o flúor provoca intoxicação aguda ou crônica, como a fluorose dental² e alterações no metabolismo de carboidratos^{3, 4, 5}

Trivedi *et al*³ demonstraram que 40% dos pacientes com fluorose endêmica tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém esta anomalia foi revertida com a remoção do excesso do flúor na água consumida.

Rigalli *et al*⁴ constataram uma diminuição da secreção de insulina tanto em pacientes como em ratas que ingeriram NaF em doses altas. Em estudos posteriores, Rigalli *et al*⁵, demonstraram

que o NaF difundido no plasma de ratos afeta a homeostasia da glicose quando estiver acima de $5\mu\text{M/l}$. Além disso, o NaF ocasiona inibição da glicólise⁶ e depleção de glicogênio hepático, muscular e do baço^{6, 7}. Muitas dessas respostas sugerem que o fluoreto pode ocasionar resistência à insulina.

A ligação da insulina com seu receptor induz à fosforilação dos substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo, a pp185⁸. Este substrato foi clonado e denominado de IRS-1⁹. Posteriormente, demonstrou-se que outra proteína migrava na altura desta proteína, sendo denominada IRS-2¹⁰. Estes substratos fosforilados podem ligar-se a outras proteínas citoplasmáticas. Essas interações proteína-proteína são essenciais para a determinação de múltiplos sinais na cascata da ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais. Portanto os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação da insulina presentes na resistência à insulina, representam um passo importante na busca de alternativas preventivas e curativas para o diabetes mellitus. Sabendo-se que o flúor pode interferir no metabolismo de carboidratos, tornou-se fundamental para o presente estudo averiguar o efeito do consumo agudo de NaF sobre a sensibilidade à insulina e fosforilação da pp185 (IRS-1/IRS-2).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Animais: Ratos Wistar (60 animais) de 1 mês de idade, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP) foram mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, com livre acesso à ração (Guabi, 26,3 mg F/kg) e água de torneira (0,3mg de F/L). Os ratos foram castrados e após 21 dias foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (CN), o qual foi submetido a uma gavagem com uma solução de NaCl 3,2 mg/kg, sem NaF, mas contendo a mesma quantidade de sódio que a administrada para o outro grupo; 2) grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido a uma gavagem com NaF (1,0 mg F/kg). Trinta minutos após a gavagem, parte dos ratos de cada grupo foi anestesiada com Tiopental Sódico (Thiopentax® 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.) e, sob anestesia, foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se o sangue pela veia cava inferior. O plasma foi armazenado a -20°C até o dia da quantificação do flúor. Uma outra parte de cada grupo foi submetida ao teste endovenoso de tolerância à insulina (0,75U de insulina/ kg p.c., i.v.), sendo anestesiada, conforme descrito acima e, sob esta anestesia, amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção

de insulina e a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicemia (One Touch Ultra; Johnson & Johnson, USA). Uma terceira parte de cada grupo foi utilizada para quantificar o grau de fosforilação do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico em tecidos sensíveis à insulina. Neste experimento, os animais foram anestesiados, conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta) em tempos variáveis (90s para o gastrocnêmio, 120s para o tecido adiposo branco periepididimal). Esta pesquisa atende aos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal em reunião de 21/09/2004, de acordo com o protocolo nº. 49/04 (Anexo C).

2.4.2 Determinação da concentração do íon flúor no plasma sanguíneo: Para a análise do flúor no plasma foi feita uma pré-difusão com HMDS-H₂SO₄ aquecido para remover o CO₂. As concentrações de flúor no plasma foram determinadas, após 12 horas de difusão facilitada por hexametil-disiloxano (HMDS)¹¹ modificado por Withford¹² utilizando-se um eletrodo específico para o íon flúor (Orion Research, Cambridge, Mass., USA, modelo

9409) e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, # 13-620-79) unidos e acoplados ao potenciômetro (Orion Research, modelo EA 940), conforme descrito por Buzalaf *et al*¹³ (Anexo D) .

2.4.3 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto: Os testes foram realizados pela manhã após jejum de 12 horas. Os animais foram anestesiados, e, sob esta anestesia, realizou-se a canulação da veia jugular direita (cânula de “Sylastic”), introduzindo-se a mesma até a proximidade do átrio (veia cava superior). Esta cânula serviu para a injeção de insulina que foi ministrada na dose de 0,75U / kg p.c.. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12 e 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicemia (One Touch Ultra Johnson&Johnson – USA). A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose¹⁴.

2.4.4 Avaliação do grau de fosforilação do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2): Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) 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), e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 min, transferidos para gelo, e então centrifugados 16000 g durante 40 min (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 de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%). Conhecidas as concentrações protéicas das diferentes amostras de tecidos, estas foram submetidas ao método de “Western Blotting” para a quantificação do grau de fosforilação da pp185, de acordo com descrito por Carvalho *et al*¹⁵ (Anexo E).

2.4.5 Análise estatística: Todos os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi feita pelo método do teste t de Student para amostras não pareadas, e as diferenças entre os dois grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.5 RESULTADOS

O resultado da concentração do íon flúor no plasma sanguíneo encontra-se na Figura 1. O grupo FN apresentou um aumento ($p < 0,0004$) na fluoremia em comparação ao grupo CN.

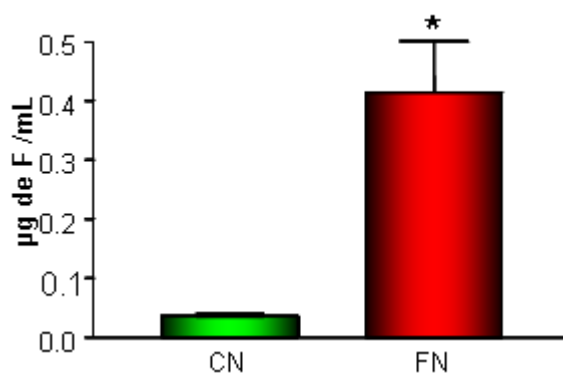


Figura 1. Fluoremia (µg de F/mL) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com NaF (FN), na dose de 1mg F/kg p.c.. Valores apresentados como média $\pm$ EPM de 10 animais.

* $p < 0,0004$

Na comparação de glicemias (Figura 2) a cada período de tempo, notou-se que o grupo tratado com fluoreto de sódio (FN) apresenta glicemias significativamente maiores em relação ao grupo controle (CN), exceto no tempo de 8 minutos.

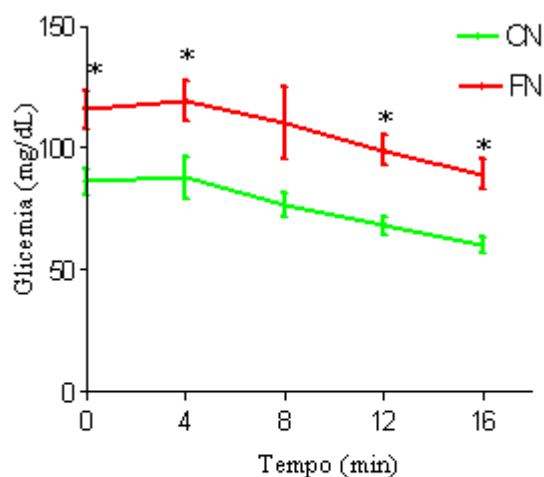


Figura 2. Teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg. As amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

* $p < 0,05$

A Figura 3 mostra, graficamente, a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}), durante o teste de tolerância à insulina, realizado nos primeiros 16 minutos após a infusão do hormônio, nos animais CN e FN. Do ponto de vista estatístico, não foram constatadas diferenças significativas inter-grupos nos valores do K_{itt} .

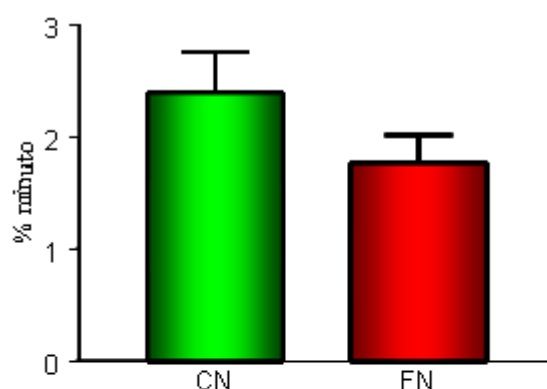


Figura 3. Velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina. O K_{itt} foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

A Figura 4A mostra uma auto-radiografia típica referente ao grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio. A Figura 4B mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. Verifica-se que não há alteração na fosforilação deste substrato entre os grupos CN e FN.

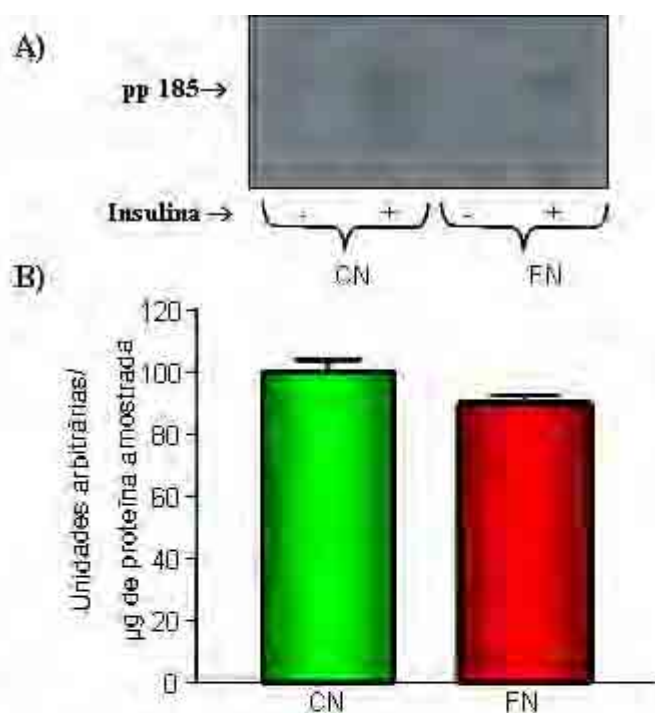


Figura 4. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido muscular gastrocnêmio em ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg, antes (-) e após (+) infusão de insulina. Em **A**, autorradiografia típica. Em **B**, os resultados do grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, expressos em unidade arbitrárias por μg de proteína amostrada. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

Na Figura 5A, pode ser vista uma típica imagem referente ao grau de fosforilação da pp 185, após o estímulo insulínico, no tecido adiposo branco periepídidimo. A Figura 5B mostra os resultados expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. Observa-se o grau de fosforilação da pp185 semelhante em CN e FN.

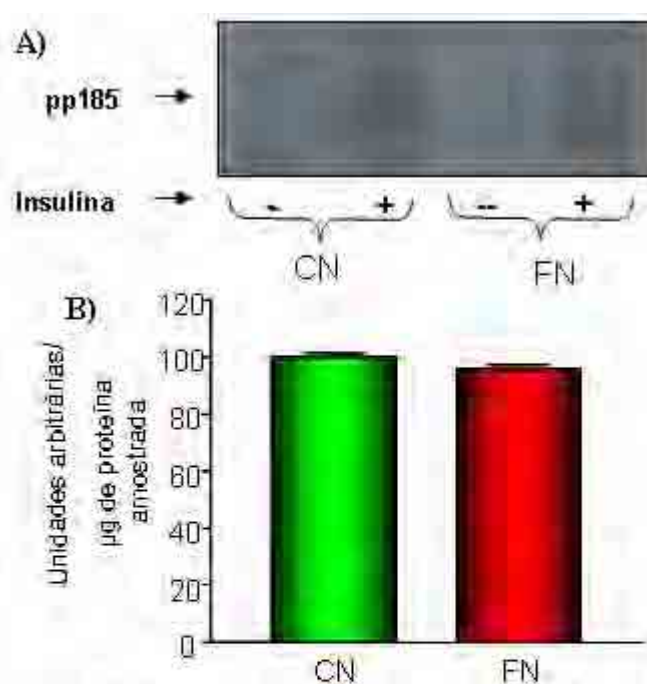


Figura 5. Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido adiposo de ratos castrados submetidos a uma gavagem sem NaF (CN) ou com (FN), na dose de 1,0 mg F/kg., antes (-) e após (+) infusão de insulina. Em **A**, autorradiografia típica. Em **B**, os resultados do grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, expressos em unidade arbitrárias por μg de proteína amostrada. Valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

2.6 DISCUSSÃO

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos potentes. Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina são específicos e estritamente regulados. Definir as etapas que levam à especificidade deste sinal representa um desafio para as pesquisas bioquímicas, todavia podem resultar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para pacientes que sofrem de resistência à insulina, inclusive o diabetes tipo 2¹⁶.

Nos últimos anos, uma epidemia de diabetes mellitus (DM) vem ocorrendo, com tendência de crescimento na próxima década¹⁷. As complicações do DM, tanto micro como macrovasculares, são consideradas como uma das maiores ameaças à saúde em todo mundo, com grandes custos econômicos e sociais¹⁸. O aumento de glicose intra-celular é o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que pode ser reversível quando restaurada a condição de normoglicemia, ou irreversível, mesmo que revertida a hiperglicemia, pois originou-se de alterações acumulativas em macro-moléculas de vida longa¹⁹.

A hiperglicemia também ocorre por tratamento agudo ou prolongado com altas doses de fluoreto de sódio^{4,5,20-22} evidenciando que a homeostase da glicose sofre influência do NaF e

esta alteração é similar a do observado em diabetes mellitus. Os resultados da Figura 2 demonstraram que o grupo NaF apresentou hiperglicemia: 1) 30 min após a gavagem com NaF (tempo zero); 2) após a infusão de insulina (exceto no tempo de 8 min). O item 1 está de acordo com os resultados de outros pesquisadores^{23,24}. Segundo Allamann e Kleiner²⁴, o mecanismo que o NaF induz hiperglicemia pode estar aliado a um ou mais fatores como: a) aumento da glicogenólise devido a um aumento do AMPc; b) aumento da liberação de epinefrina; c) ativação ou inibição de certas enzimas. McGowen e Suttie²³ propuseram que a hiperglicemia induzida pelo NaF seria decorrente do seu efeito positivo sobre a liberação de epinefrina que poderia aumentar a glicogenólise. Por outro lado, Allamann e Kleiner²⁴ acreditam que esta hiperglicemia poderia ser resultado de uma via dependente de AMPc. Estes autores observaram o aumento de AMPc induzido por NaF poderia fosforilar e ativar a glicogênio fosforilase α , e isto aumentaria a quebra do glicogênio. Entretanto, o tratamento agudo com NaF não ocasionou alteração na sensibilidade à insulina, demonstrada pela inalteração da velocidade de decaimento da glicose, durante o teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT).

Ao analisar-se as concentrações do íon flúor no plasma (Figura 1), observamos um aumento estatisticamente significativo

no grupo NaF em relação ao grupo CN. Isso confirma a relação entre o flúor ingerido e a absorção pelo organismo. Neste estudo, os experimentos se iniciaram 30 minutos após a gavagem com NaF. Roldi e Cury²⁵ também observaram aumento significativo de flúor no plasma sanguíneo em humanos, no mesmo tempo, após a ingestão de dentifrício fluoretado. Porém a absorção depende de como este flúor é ingerido. Compostos insolúveis podem se formar de acordo com a dieta, principalmente na presença de substâncias como cálcio, magnésio e alumínio, que reduzem a absorção do fluoreto²⁶. A porcentagem de flúor excretada em relação à ingerida e absorvida, depende da idade do indivíduo e as crianças absorvem mais flúor do que os adultos²⁷.

O fluoreto tem sido usado de diversas maneiras na prevenção da cárie dental. Entre os vários métodos de utilização do flúor, o uso do dentifrício fluoretado associado a outros métodos, como a água de abastecimento público, tem sido os grandes responsáveis pelo declínio desta doença²⁸. Paralelamente observa-se uma tendência ao aumento da fluorose dental, o que indica um excesso no consumo de fluoretos. Alguns estudos foram realizados no intuito de averiguar a dose que as crianças estão expostas ao flúor^{1,29}. Pessan *et al*²⁹ demonstraram que somente pelo dentifrício, as crianças podem ingerir até 0,155 mg/F/dia/kg. Esta dose está

acima da dose preconizada (0,05 a 0,07 mg/F/dia/kg) como limite para se evitar graus indesejáveis de fluorose dental².

No presente estudo, a dose de flúor utilizada foi 20 vezes maior que o valor máximo ingerido por uma criança durante uma escovação com dentifício fluoretado²⁹. Esta dose foi utilizada porque Rigalli *et al*⁴, realizando estudos em humanos e ratos, observaram que eles precisavam aumentar, nesta proporção, a dose de flúor administrada em ratos em relação à administrada em humanos para atingir um pico plasmático similar em ambos os modelos. E isto provavelmente deve-se à grande diferença na taxa de “turnover” do osso⁴.

O flúor também é consumido através das bebidas e alimentos, em quantidades significativas em alguns chocolates em barra, bolachas³⁰, cereais matinais e salgadinhos³¹ que são guloseimas tipicamente apreciadas pelas crianças. Concentrações significativas de flúor também foram encontradas no chá preto e em bebidas a base de chá com potencial de expor uma criança a doses mais altas do que a dose limite³². Portanto há necessidade que haja um controle ou até mesmo uma diminuição de produtos fluoretados em locais com fluoretação da água de abastecimento, pois pode ocasionar ingestão de fluoreto acima da dose limite, principalmente por crianças e adolescentes portadores de diabetes

mellitus, no qual o flúor poderá potencializar o efeito da doença, se for consumido em doses excessivas.

O estudo da regulação das etapas iniciais da ação insulínica em modelos animais pode ser realizada *in vitro*, através de receptores de insulina parcialmente purificados e substratos exógenos, ou *in vivo*, após a infusão de insulina. O protocolo experimental utilizado neste trabalho (estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogeneização dos tecidos muscular e adiposo branco em condições desnaturantes e posterior “immunoblotting” com o anticorpo específico) permitiu uma avaliação das etapas iniciais da ação insulínica nestes dois tecidos importantes para a homeostase da glicose³³.

Com esta metodologia, foi realizado o estudo das etapas iniciais da ação insulínica em tecido muscular (gastrocnêmio) e adiposo branco periepídídimo de animais CN e FN. O tratamento agudo com NaF não induziu alteração significativa no grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, tanto no gastrocnêmio (Figura 4) como no adiposo branco (Figura 5). Estes resultados podem ter propiciado a inalteração da sensibilidade à insulina entre o grupo CN e FN. Por outro lado, os estudos *in vitro* de Viñals *et al*^{34,35}, em receptores de insulina isolados de tecido muscular de ratos e placenta humana, demonstraram que o fluoreto induziu uma diminuição na autofosforilação induzida por

insulina e fosforilação dos substratos exógenos usados. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diferença de metodologia utilizada entre estes estudos e o deste trabalho. Outro fator relevante é que a concentração de flúor utilizada por Viñals *et al*^{34,35} foi mais elevada. O presente estudo revelou que a quantidade de flúor administrada aumentou a glicemia, mas não interferiu na fosforilação da pp185. Entretanto não podemos descartar alterações na fosforilação de outros substratos da insulina envolvidos na homeostase glicêmica.

Diante desta discordância de resultados, mais estudos devem ser feitos para que se esclareça melhor a interferência do NaF na etapa inicial da ação insulínica, pois uma diminuição na fosforilação do receptor de insulina tem sido bem correlacionada com situações de resistência à insulina³⁶⁻³⁸.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o tratamento agudo com NaF promoveu aumento significativo na glicemia, entretanto não alterou a sensibilidade à insulina e a fosforilação da pp185. Portanto, sabendo-se que o NaF pode alterar o metabolismo de carboidratos em doses altas, é recomendável utilizar dentifrícios com um menor teor de fluoreto, principalmente por crianças diabéticas, para as quais o excesso do consumo de flúor pode levar à piora na situação de saúde.

Agradecimentos

Este experimento obteve auxílio FAPESP (no. do processo 05/53301-1). Nós agradecemos a Johnson & Johnson pelo fornecimento de materiais para a pesquisa.

2.7 REFERÊNCIAS

- 1 Lima YBO, Cury JA. Fluoride intake by children from water and dentifrice. Rev Saúde Pública 2001;35(6):576-81.
- 2 Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. J Dent Res 1992;71(5):1228-37.
- 3 Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM, Godbole for the Fluoride Collaborative Study Group: Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. Diabetologia 1993;36(9):826-8.
- 4 Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory Effect of Fluoride on the Secretion of Insulin. Calcified Tissue International 1990;46:333-38.
- 5 Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of effect of sodium fluoride and sodium

- monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung* 1995;45(3):189-92.
- 6 Dost FN, Knaus RM, Johnson DE, Wang CH. Fluoride impairment of glucose utilization: nature of effect in rats during and after continuous NaF infusion. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1977; 41:451-458.
 - 7 Shashi, JP, Singh, Thapar, SP. Changes in glycogen content in same tissues during fluorosis – an experimental study on rabbits. *Fluoride* 1988;21:82-86.
 - 8 White MF, Takayama S, Kahn CR. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 1985;260(16):9470-8.
 - 9 Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;352(6330):73-7.
 - 10 Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi T, Ueki K, Satoh S, Sekchara 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* 1994;372:182-6.

- 11 Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968;15:969-74.
- 12 Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. New York: Karger; 1996.
- 13 Buzalaf MAR, Fuhushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride* 2002;35(3):185-192.
- 14 Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68(2):374-8.
- 15 Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137(1):151-9.
- 16 Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(2):419-25.
- 17 Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DG, Engelgau MM, Vincer F, Marks JS. Diabetes trends in the U.S. *Diabetes Care* 2000;23:1278-83.

- 18 Georg AE, Duncan BB, Toscano CM, Schimidt MI, Mengue S, Duarte C, Polanczyk CA, Grupo de Trabalho de Avaliação da Campanha Nacional de Detecção de Diabetes Mellitus. Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil. *Rev Saúde Pública* 2005;39 (3):452-60.
- 19 Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International* 2000;58 Suppl 77:S26-S30.
- 20 Sakurai T, Suzuki K, Taki T, Suketa Y. The mechanism of changes in metabolism and transport of glucose caused by fluoride administration to rats [abstract]. *Fluoride* 1993;26(3):210.
- 21 Appleton J. Changes in the plasma electrolytes and metabolites of the rat following acute exposure to sodium fluoride and strontium chloride. *Arch Oral Biol* 1995;40:265-8.
- 22 Grucka-Mamczar E, Birkner E, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Chlubek D, Samujlo D, Katowice A C, Szczecin. Lipid Balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. *Fluoride* 2004;37(3):195-200.
- 23 McGown EL, Suttie JW. Mechanism of Fluoride Induced Hyperglycemia in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1977;40:83-90.

- 24 Allmann DW, Kleiner HS. Effect of NaF on Rat Tissue cAMP levels *in vivo*. *Pharmacology and Therapeutics in Dentistry* 1980;5:73-78.
- 25 Roldi CR, Cury JA. Metabolismo do Flúor Após a Ingestão de Dentifrícios. *RGO*1986;34(5):425-427.
- 26 Whitford G. Fluoride metabolism and excretion in children. *J. Public Health Dent*. 1999;59(4): 224-28.
- 27 Ekstrand J, Koch G, Lindgren LE, Petterson LG. Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults. *Caries Res*1981;15:213-20.
- 28 Narvai PC, Frazão P, Castellanos RA. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. *Odontologia e Sociedade*1999;1(1/2):25-29.
- 29 Pessan JP, Silva SMB, Buzalaf MAR. Avaliação da ingestão total de flúor de crianças entre 4 e 7 anos de idade através da dieta e dentifrício. *J. Appl. Oral. Sci* 2003;11 (2): 150-6.
- 30 Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Cardoso VES, Silva TL, Olympio KPK. Fluorine content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(2):223-7.
- 31 Cardoso VES, Olympio KPK, Granjeiro, JM, Buzalaf, MAR. Fluoride content of several breakfast cereals and snacks

- found in Brazil. *Journal of Applied Oral Science* 2003;11(4):306-310.
- 32 Hayacibara MF, Queiroz CS, Tabchoury CPM, Cury JA. Fluoride and aluminum in teas and tea-based beverages. *Rev. Saúde Pública* 2004;38(1):100-105.
- 33 Saad MJA, Folli F, Kahn J, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate -1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J. Clin. Invest.* 1993;92:2065-2072.
- 34 Viñals F, Testar X, Palacin M, Zorzano, A. Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochem. J.* 1993;291:615-622.
- 35 Viñals F, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Effects of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor: Inhibition by fluoride is magnesium dependent. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997;171:69-73.
- 36 Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, Siddle K, Pierce SB, Roth RA, Rutter WJ. 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. Nat. Acad. Sci. Usa.* 1987;84: 704-8.

- 37 Chou CK, Dull TJ, Russel DS, Gherzi R, Lewohl D, Ullrich A, Rosen OM. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J.Biol.Chem.* 1987;262:1842-7.
- 38 White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J.Biol.Chem.* 1994;269:1-4.



Anexo A

Normalização segundo a Revista Chilena de Pediatria

Os trabalhos enviados para publicação na Revista Chilena de Pediatria deverão sujeitar-se às seguintes instruções:

1. O trabalho deve ser datilografado em espaço duplo, incluindo os resumos e as tabelas em páginas tamanho carta, deixando uma margem de 2,5 cm em todas as bordas. A extensão do texto não deve ultrapassar 10 páginas, exceto os trabalhos de revisão ou saúde pública que podem chegar a 15 páginas de texto; 3 para comunicações curtas ou cartas ao editor. Enviar o original e duas fotocópias (cópias feitas com papel carbono não são consideradas convenientes) de todo o texto, referências, tabelas e figuras.

2. A maioria dos trabalhos (experiências clínicas, trabalhos de pesquisa) tem características que permitem dividi-los em seções intituladas: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão (trabalhos originais e casos clínicos). Cada seção deverá começar na parte superior de uma página e ser datilografada sem salto de linhas entre sentenças. O formato de outros tipos de artigos de grande interesse para os leitores, como revisões de temas, atualização, editoriais, comentários técnicos, relatórios técnicos, cartas ao editor, artigos culturais referentes à medicina em geral e à pediatria em particular, pode ser diferente segundo a natureza de seu conteúdo e será aprovado pelo Corpo Editorial de comum acordo com o autor.

3. A sequência de cada trabalho será a seguinte:

3.1 Página de rosto

A página de rosto deve conter:

- 1) título do trabalho, que deve ser conciso, mas informativo sobre o conteúdo central do artigo;
- 2) nome do(s) autor(es): primeiro nome, nome paterno e inicial do nome materno e identificação de grau acadêmico;
- 3) nome da seção, departamento, serviço e instituição a que deve dar-se crédito pela execução do trabalho;
- 4) nome e endereço do autor para a correspondência e solicitação de separatas;
- 5) fonte de apôio econômico se existir, como subsídio de pesquisa (grants), equipamento, medicamentos, etc. Indicar com asterisco os autores que não tenham o título de médico cirurgião, e indicar no rodapé seu título profissional ou sua qualidade de interno ou aluno em uma carreira determinada, quando for o caso.

3.2 Resumo

A segunda página deve conter:

- a) um resumo em espanhol com 150 palavras no máximo que descreva o propósito do estudo ou pesquisa, o material e método básico utilizados, os principais resultados em forma quantitativa quando for o caso e as conclusões mais importantes (não use abreviaturas não padronizadas, nem expressões pouco claras).
- b) o resumo em inglês com 150 palavras no máximo, com as mesmas características que o resumo em espanhol e a respectiva tradução do título do trabalho.

3.3 Introdução

Resumir a argumentação do estudo e expressar com clareza o propósito do artigo. Quando pertinente ao estudo, fazer explícita a hipótese cuja validade pretende analisar. Não explicar extensamente o tema e cite só as referências bibliográficas que sejam estritamente pertinentes.

3.4 Material e Método

Descrever com clareza a seleção de elementos em observação ou experimentação (pacientes ou animais de laboratório e seus respectivos controles).

Identificar os métodos, instrumentos ou aparelhos e procedimentos empregados, com suficiente precisão para permitir que outros observadores reproduzam seus resultados.

Quando se trata de métodos estabelecidos e de uso freqüente (inclusive métodos estatísticos), limitar-se a mencioná-los e citar as referências respectivas.

Quando os métodos já tenham sido publicados mas sejam pouco conhecidos, dar as referências e agregar uma breve descrição.

Quando os métodos são novos ou foram aplicadas modificações a métodos estabelecidos, descrevê-los com precisão, justificando seu emprego e mencionar suas limitações.

Quando forem efetuados experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos respeitaram normas éticas estabelecidas previamente e revisadas por um comitê "ad hoc" da instituição em que se efetuou o estudo, de acordo com a Declaração de Helsinki

(1975). Identificar os fármacos e compostos químicos utilizados com seu nome genérico, dosagem e via de administração.

Quando necessário, identificar os pacientes com números seqüenciais, mas sem usar iniciais, nem números de fichas clínicas hospitalares.

Indicar o número de indivíduos, de observações, e os métodos estatísticos utilizados e o nível de significação estatística previamente estabelecido para julgar os resultados.

3.5 Resultados

Apresentar os resultados numa seqüência lógica e concordante com o texto, tabelas e figuras. Os dados podem ser mostrados nas tabelas e figuras, mas não simultaneamente nas duas. Os resultados mais relevantes no trabalho devem ser sempre descritos no texto. Não repetir no texto a descrição de todos os dados que se apresentam numa tabela ou figura, e destacar só as observações importantes. Não misturar a apresentação dos resultados com a discussão, a qual deve ser incluída no capítulo seguinte.

3.6 Discussão

Trata-se da discussão dos resultados obtidos no trabalho e não uma revisão do tema. Discutir e destacar só os aspectos novos e importantes do trabalho e as conclusões que se propõem a partir deles. Não repetir detalhadamente os dados que aparecem em Resultados. Explicar nesta seção as implicações dos descobrimentos e limitações do trabalho, e relacionar estas observações com outros estudos relevantes identificando-os mediante as citações bibliográficas respectivas. Relacionar as conclusões com os propósitos do estudo que foram destacados na

Introdução, mas evitar propor conclusões que não estão solidamente respaldadas pelos resultados, e apoiar-se em outros trabalhos ainda não terminados. Propor novas hipóteses quando conveniente e identificá-las claramente. Quando seja apropriado, propor recomendações.

3.7 Agradecimentos

Expressar reconhecimento somente a pessoas e instituições que fizeram contribuições importantes ao trabalho. Os autores são responsáveis por mencionar pessoas ou instituições a quem os leitores poderiam atribuir um apoio aos resultados do trabalho e suas conclusões.

3.8 Referências

Limitar as referências a 30 no máximo. Numere as citações bibliográficas na ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Identificar as referências no texto com números arábicos, entre parênteses no final da frase ou parágrafo em que são mencionadas. As referências que sejam citadas unicamente nas tabelas ou nas legendas das figuras, devem ser numeradas na seqüência que corresponda à primeira vez que são citada no texto. Os nomes das revistas devem ser abreviados segundo o estilo usado no Index Medicus (no número de janeiro de cada ano do IM aparece uma lista de abreviaturas). Os resumos de apresentações em Congressos podem ser citados como referências só quando forem publicados em revistas de circulação geral. Não incluir como referências "observações não publicadas" nem "comunicações pessoais", as quais podem ser incluídas no texto entre parênteses. Pode-se incluir entre as referências, os trabalhos que foram oficialmente aceitos por uma revista e estão em processo de

publicação; neste caso indicar a referência completa, agregando a expressão "em impressão" o nome abreviado da revista entre parênteses. Os trabalhos enviados para publicação, mas que ainda não foram oficialmente aceitos, não devem ser listados nas referências, mas podem ser citados no texto como "observações não publicadas", entre parênteses. Ao listar as referências, a sua ordem deve ser a seguinte:

a) Artigos em revistas: Sobrenome e inicial do nome do(s) autor(es). Mencionar todos os autores quando seja seis ou menos; se são sete ou mais, mencionar os três primeiros e agregar et al. Limitar a pontuação a vírgulas que separem os autores entre si. Segue o título completo do artigo, em seu idioma original. Logo, o nome da revista em que apareceu abreviado de acordo ao Index Medicus, ano de publicação, volume, página inicial e final do artigo. Exemplo:

b) Capítulos de livro: Exemplo: ... Os autores são responsáveis pela exatidão de suas referências.

Artigos originais

1. Artigos originais

Trabalho realizado conforme o esquema que se explica a continuação e no qual se trata de encontrar uma resposta a uma ou varias interrogantes. O esquema ao qual deverá submeter-se é o seguinte: Introdução

a)Introdução: indica os antecedentes e perguntas que pretende-se resolver;

b) material e método: se o método não é original, basta indicar a citação correspondente;

c) resultado;

d) discussão ou comentários: discute ou analisa os resultados obtidos com relação ao problema exposto ou a trabalhos de outros autores sobre o tema, se existir;

e) resumo: em idioma espanhol e inglês com 150 palavras como máximo. Deve-se procurar a maior concisão, evitando repetições e descrições de fatos conhecidos ou já publicados, para o qual basta a citação bibliográfica. A maior parte dos trabalhos (experiências clínicas, trabalhos de investigação) tem características que permitem dividi-los em seções:

Introdução, Material e Método, Resultados e Discussão (trabalhos originais e casos clínicos). Cada uma delas deverá começar na parte superior de uma página e ser datilografada sem pular linha nos fins de parágrafo. O formato de outro tipo de artigos de grande interesse para os leitores, como revisões de temas, atualizações, editoriais, comentários técnicos, cartas ao editor, relatórios técnicos, notas culturais abrangendo a medicina em geral e a pediatria em particular, pode ser diferente segundo a natureza do seu conteúdo e será aprovado pelo Corpo Editorial de acordo com o autor.

Resumo

A segunda página deve conter:

a) um resumo em espanhol de 150 palavras no máximo, que descreva o propósito do estudo ou pesquisa, o material e método básico utilizado, os principais resultados em forma quantitativa

quando corresponder e as conclusões mais importantes (não empregar abreviaturas não padronizadas e não utilizar expressões vagas).

b) Um resumo em inglês com 150 palavras no máximo, com as mesmas características do resumo em espanhol e a respectiva tradução do título do trabalho. Tabelas: Apresentar cada tabela em página separada, datilografada em espaço duplo. Não enviar fotografias das tabelas. Numerar as tabelas na ordem seqüencial e colocar um título breve acima de cada tabela (título da tabela). Sobre cada coluna colocar um cabeçalho curto e breve. Separar com linhas horizontais somente os cabeçalhos das colunas e os títulos gerais; entretanto, as colunas de dados devem separar-se por espaços e não por linhas. Quando notas esclarecedoras sejam requeridas, agregue-as ao pé da tabela e não no cabeçalho. As notas ao pé da tabela são usadas para todas as abreviaturas não padronizadas que apareçam nela. Citar cada tabela em ordem seqüencial no texto do trabalho.

Figuras

As figuras são qualquer tipo de ilustração que não sejam tabelas (gráficos, radiografias, eletrocardiogramas, ecografias, etc.). Os gráficos propriamente ditos, devem ser desenhados por um profissional. Enviar duas reproduções fotográficas, e não os originais, em branco e preto de tamanho 10 x 15 cm. As letras, números e símbolos devem ver-se claros e nítidos em toda a superfície da fotografia; e ter um tamanho suficiente que permita seguir sendo legível quando a figura seja reduzida na publicação.

Os títulos e legendas não devem aparecer na fotografia, mas em uma página separada, para ser composto na impressão. No reverso

de cada fotografia, deve anotar-se com lápis ou numa única etiqueta colada, o número da figura, o nome do autor principal e uma seta indicando a sua localização. Enviar as fotografias protegidas em um envelope grosso de tamanho apropriado. Os símbolos, setas ou letras empregadas para identificar imagens nas fotografias de preparações microscópicas, devem ser de tamanho e contraste suficiente para se distinguir de seu entorno. Citar cada figura no texto na ordem seqüencial. Se uma figura é reprodução de material já publicado, indicar a sua fonte de origem e solicitar autorização por escrito do autor ou editor para reproduzi-la em seu trabalho. O autor deverá consultar a direção da revista sobre a publicação de ilustrações coloridas e arcar com seu custo. O total de figuras e tabelas deve ser no máximo cinco. Legendas para as figuras: Redigir os títulos e as legendas das figuras em página separada, indicando sua numeração correspondente. Identificar e explicar todo símbolo, seta, número ou letra que tenha empregado para indicar parte das ilustrações. Na reprodução de preparações microscópicas, explicar a ampliação empregada e identificar os métodos de tintura. Unidades de medida: Empregar as unidades correspondentes ao sistema métrico decimal (uma lista aparece publicada no *Annals of Internal Medicine* 1979;90:98-99). Lembrar que em português as cifras decimais devem ser separadas por vírgula, e por convenção, os milhares e múltiplos de milhares são indicados por espaço em lugar de ponto.

ABREVIATURAS PARA UNIDADES DE MEDIDA

A seguinte lista indica as abreviaturas ou símbolos de uso internacional que representam as unidades de medidas empregadas com maior frequência nos trabalhos publicados pela revista. Os autores devem utilizar estas abreviaturas ou símbolos

no texto, tabelas e figuras dos trabalhos que enviem à Revista Chilena de Pediatría para publicação.

TERMINOLOGIA

Abreviatura ou símbolo alternativos correto que se deve usar: Contagem por minuto com, CPM Contagem por segundo cps CPS, Curie Ci, Grau Celsius °C, Desintegrações por minuto dpm DPM, Desintegrações por segundo dps DPS, Equivalente Eq0, Gramo g gr, Hora h hr, Unidade internacional IU, Kilogramo kg Kg Litro, l Lt, Metro m mt, Minuto min, Molar M, Mole mol, Osmol osmol, Rotações por minuto rpm RPM, Segundo s seg, Kilo-(prefixo) k, Deci-(prefixo), d Centi-(prefixo), c Mili-(prefixo) ml, Micro-(prefixo) μ , Nano-(prefixo) n, Pico-(prefixo), p Promedio (termo estatístico) $\bar{x}$ Não significativo (estatístico) NS, Número de observações (estatístico) n, N° probabilidade (estatístico) p P. Note-se que nenhuma abreviatura ou símbolo agrega-se "s" para indicar plural.

Uma lista mais completa de abreviaturas ou símbolos de uso comum em biologia e medicina aparece publicada em *Annals of Internal Medicine* 1979;90:98-99.

1. Separatas

Devem ser solicitadas por escrito, depois de receber a comunicação oficial de aceitação e programação definitiva do trabalho. Seu custo deve ser pago pelo autor diretamente a publicadora.

2. Autores

Na relação de autores só devem figurar as pessoas que participaram de maneira significativa ao trabalho e, portanto, podem ser responsáveis publicamente por seu conteúdo. Em

outras palavras, a autoria deve se limitar a quem contribuiu criativamente ao estudo:

a) geração e desenho; análise e interpretação da informação ou ambos;

b) esboço do artigo ou revisão de seu conteúdo intelectual;

c) aprovação final da versão que se deseja publicar. A participação da coleta de dados, a chefia do serviço ou departamento; ser observadores casuais, executores de exames especiais ou médicos de cabeceira não outorgam direito autoral por si mesmos. De qualquer forma os editores podem solicitar aos autores que confirmem autoria, especialmente quando o número for superior a cinco.

3. Reconhecimento de contribuições que não justificam autoria.

Num lugar apropriado no artigo (na página de rosto, como nota de rodapé ou apêndice do texto segundo os requerimentos de cada revista) deverão especificar uma ou mais declarações:

a) contribuições reconhecidas que não justificam autoria;

b) reconhecimento de ajuda técnica; c) reconhecimento de apoio material e financeiro; d) relações financeiras que podem constituir conflito de interesse. As pessoas que tenham contribuído intelectualmente ao trabalho, mas sua contribuição não mereça autoria, podem ser nomeadas e sua contribuição descrita, por exemplo: "conselho", "revisão crítica de proposição do estudo", "coleta de informação", "participação em testes clínicos". Tais pessoas deverão dar a sua autorização para ser nomeadas.

Ajuda técnica: deverá ser reconhecida num parágrafo a parte das expressões anteriores. O apoio financeiro ou material de qualquer fonte deverá ser especificado. Se o trabalho for aceito, também será apropriado incluir outras relações financeiras que constituam conflito de interesse, mas estas deverão ser indicadas em carta anexa.

4. Informação que deve ser incluída na carta anexa

Os originais devem ser acompanhados por uma carta que inclua:

- a) informação sobre publicação ou envio duplicado do trabalho ou qualquer parte dele a outras revistas ou meios de divulgação e declarando, também, que o trabalho não foi submetido, antes ou simultaneamente, à consideração de outras publicações;
- b) uma declaração sobre as relações financeiras ou de uma outra ordem que possam causar conflitos de interesse;
- c) uma declaração dizendo que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores;
- d) o nome, endereço, número de telefone do autor principal, que é responsável de comunicar-se com os outros autores quanto às versões e aprovação final das provas. A carta de apresentação deverá ser assinada por todos os autores. Os originais deverão ser acompanhados pelas autorizações necessárias para reproduzir material publicado anteriormente, utilizar ilustrações sobre pessoas suscetíveis de ser identificadas, ou nomear pessoas por suas contribuições.

5. Publicações múltiplas

A seguinte declaração sobre publicações múltiplas foi aprovada pelo Comitê Internacional de Revistas Médicas (Grupo Vancouver) em maio de 1983. Foi editada para que sirva como guia a autores e editores. Entende-se por publicação múltipla aquela que se realiza mais de uma vez sobre a mesma informação, conteúdo, análise, etc., mesmo que sua redação ou apresentação seja diferente. Neste sentido, a publicação múltipla inclui a publicação paralela e a publicação reiterada. Entende-se por publicação paralela aquela em que a publicação secundária está destinada a leitores cujo idioma nacional é diferente da publicação primária, que dessa forma ficaria fora do alcance deles, e que também se denomina publicação em dois idiomas. Esta classificação inclui publicações secundárias destinadas a médicos que não acostumam empregar métodos de registro e recuperação sistemática de informação em suas leituras profissionais. A publicação reiterada ou duplicada indevidamente é a publicação múltipla destinada a grupos de leitores que compartilham ambas as publicações (primária e secundária) e que muito provavelmente utilizam sistemas de registro e recuperação de informação profissional. A política dos editores de revistas para estas publicações múltipla é a seguinte:

1) A publicação paralela é aceita se:

- a) os editores das duas revistas envolvidas estão completamente informados. O editor da segunda publicação deverá ter uma fotocópia. Reimpressão ou cópia do original da primeira versão;
- b) a prioridade da primeira publicação é respeitada pela segunda com um intervalo de pelo menos duas semanas;
- c) o conteúdo da segunda publicação é escrito por um grupo diferente de leitores, em outras palavras, trata-se de uma simples

tradução da primeira, da qual, algumas vezes, só é preciso uma versão abreviada;

d) a segunda versão reflete fielmente a informação e interpretações da informação primária;

e) uma nota de rodapé na primeira página da segunda versão informa aos leitores e instituições de documentação que o trabalho foi editado e se está publicando para uma audiência ou público em paralelo com a primeira versão, empregando a mesma informação. A nota de rodapé na primeira página deverá dar suficiente e adequada referência da primeira versão;

f) no curriculum vitae e relatórios de produção científica, os trabalhos publicados em paralelo devem ser indicados de maneira inequívoca.

2) A publicação reiterada não é aceitável, e se os autores violam esta regra poderão ser submetidos a sanções. As entregas preliminares ou publicações prévias, isto é, a divulgação de informação científica descrita num trabalho que foi aceito, mas ainda não publicado, em muitas revistas é considerada como violação dos direitos reservados. Em casos excepcionais, e só com a aprovação do editor da publicação primária, poderá aceitar-se a entrega preliminar de informação, por exemplo, para prevenir a população de um risco.

Regulamento de Publicações

A Revista Chilena de Pediatría recebe para sua publicação somente artigos originais sobre temas de pesquisa clínica ou experimental e de medicina social e saúde pública, relacionados com a criança e que não tenham sido publicados em outras revistas. A Revista se

reserva o direito sobre os artigos. As contribuições serão entregues na Secretaria da Revista e serão revisados pelo Comitê de Redação. A ordem de publicação dos trabalhos fica a critério da Direção, que se reserva o direito de recusar artigos por razões técnicas ou científicas, assim como de sugerir ou efetuar reduções ou modificações no texto, ou material gráfico. Os artigos deverão ser entregues datilografados em páginas de tamanho carta em espaço duplo, com um máximo de 26 linhas por página, amplas margens (2,5 cm), incluindo o original e as duas primeiras cópias ou duas fotocópias de boa qualidade. A sua extensão máxima será de 15 páginas para artigos originais de saúde pública e atualidades, 10 para casos clínicos e 3 para comunicações curtas e notas ou cartas ao Editor. A revista só aceitará desenhos e gráficos preparados em estilo profissional. Eles, como qualquer outro tipo de ilustração (fotografias de pessoas, objetos ou radiografias), se classificarão como figuras e se enviarão na forma de cópias fotográficas em papel satinado, branco e preto, preferentemente de 10 a 15 cm de tamanho (sem exceder 20 x 25 cm). Estes elementos deverão confeccionar-se em uma folha separada e permitir entender o significado da figura sem necessidade de ler o resto do texto. No reverso de cada ilustração deve-se marcar com lápis ou em papel adesivo fácil de retirar, o número que a identifica e a seta que indica sua orientação. No texto deverá ser indicado onde deve ser intercalada. Os quadros ou tabelas devem ser denominados Tabelas e ser enviados datilografados em folha separada, devidamente numerados na ordem em que aparecem no texto. Os custos de impressão das figuras e tabelas serão por conta da revista, sempre que não excedam a cinco. O título deve ser claro e conciso, dando uma idéia exata do conteúdo do trabalho. Incluir o nome dos autores com o sobrenome e pelo menos a inicial do

segundo sobrenome, o título profissional de cada um deles e ou Instituições ou Departamentos em que o trabalho foi realizado.

As referências bibliográficas devem ir numeradas no texto em forma seqüencial, na mesma ordem em que foram citadas pela primeira vez. Listar as referências bibliográficas da seguinte forma:

a) sobrenome dos autores com a primeira inicial do nome,

b) título do trabalho, c) nome da revista na forma abreviada segundo o "Index Medicus", ano, volume: página inicial e final do texto (Exemplo: Rev.Chil.Pediatr. 1986;57:325-330). As contribuições serão classificadas da seguinte forma: 2. Casos clínicos, de interesse prático, com uma revisão do tema em questão. Esquema semelhante ao anterior.

3. Atualidades.

Relação de novas aquisições médicas ou revisão de capítulos de interesse especial, realizadas por profissionais que tenham experiência no tema e que contribuam ao esclarecimento de conceitos.

4. Saúde pública.

Seção destinada a temas de proteção e fomento da saúde e aspectos de medicina social e de população relacionados com a atenção materno-infantil, seguindo o mesmo esquema de apresentação dos trabalhos originais.

5. Comunicações breves.

Todo trabalho que signifique uma contribuição original, com caráter preliminar ou definitivo, que não ultrapasse em extensão 4

páginas tamanho carta em espaço duplo, incluindo tabelas e referências.

6. Notas ao Editor.

Comentário ou discussão de temas estimados de interesse em relação a temas pediátricos, trabalhos publicados anteriormente ou solicitação de informação sobre a especialidade, de interesse geral. Neste último caso se incluirá também a opinião dada por um especialista idôneo. Recomenda-se aos autores entregar o material diretamente na Sociedad de Pediatría. Não se devolvem provas para revisão, nem se devolvem os originais.

A Revista Chilena de Pediatría editará nos números 3 e 6 de cada ano as instruções ampliadas para os autores, de acordo com os "Requisitos uniformes para los trabajos propuestos a las revistas biomédicas" do Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (British Medical Journal 1982, 284:1766-1770) É obrigação dos autores conservar em seu poder uma cópia completa, incluindo figuras e tabelas dos originais enviados à Revista, já que ela não devolverá nenhum tipo de material, procedendo a sua destruição uma vez que o trabalho se encontre impresso ou quando foram recusados pelo Corpo Editorial.

A impressão de separatas será feita por solicitação dos autores, que deverão pedir no momento da entrega de originais, o número de exemplares que desejem diretamente à editorial. O custo será por conta dos autores.

Envio dos manuscritos

As contribuições serão entregues na Secretaria da Revista Chilena de Pediatría, e serão revisadas pelo Comitê de Redação.

Anexo B

Normalização segundo a revista *Fluoride*

GUIDELINES FOR AUTHORS — REVISED FEBRUARY 2005

Fluoride, the official quarterly journal of the International Society for Fluoride Research (ISFR), is published for the advancement of research and dissemination of knowledge pertaining to agricultural, analytical, biochemical, biological, chemical, clinical, dental, ecological, environmental, industrial, medical, metabolic, pharmacological, synergistic, and toxicological aspects of inorganic and organic fluorides or fluorine compounds.

In addition to reports of original research, timely reviews, short communications and discussion papers, letters to the editor, and guest editorials are also welcomed. Manuscripts submitted to *Fluoride* should, if possible, be prepared on a word processor according to the following guidelines. They should not have been published elsewhere and must be written in clear, concise English with either American or British spelling. They should be formatted with generous margins and double-space typing throughout.

Manuscripts may be submitted to the editor either by mail or courier as hard copy or by E-mail as an attachment (Microsoft Word or Microsoft Office XP documents preferred):

Albert W. Burgstahler, PhD
1620 Massachusetts Street
Lawrence, KS 66044-4254, USA
E-mail: awburg@ku.edu

Do not send a computer disk with your initial submission. Preliminary inquiries by letter, E-mail, or by fax (USA: 785-843-0736) are encouraged. Because far more manuscripts are being received than we have space to publish, research reports should be

kept as short as possible, generally limited to about 3 to 5 manuscript pages in Times New Roman 12-point type, including figures and tables (but exclusive of references), although longer papers, especially of a review type, may also be acceptable. As far as possible, all manuscripts should be prepared according to the guidelines produced by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication*, the official version of which is located at <http://www.ICMJE.org>.

However for references in *Fluoride* no periods should be added after journal titles or journal title abbreviations. The Uniform Requirements are periodically updated with the last update being in October 2004.

All research reports and reviews, including papers presented at ISFR conferences, are evaluated by qualified reviewers (usually members of the Editorial Board) before acceptance for publication. When papers are judged acceptable, authors are then asked to incorporate into their paper the suggestions and recommendations of the reviewers and the editorial changes proposed by the editor. After the appropriate revisions have been made, authors should submit the revised version either electronically as an attachment to an E-mail or by mail or courier as a hard copy in duplicate, together with a PC-formatted (not Macintosh) diskette that includes the revised text, references, tables, charts, and figures. (WordPerfect is acceptable, but Microsoft Word or Microsoft Office XP are preferred.)

The following guidelines should be followed closely to facilitate and expedite publication; they refer primarily to research reports and apply only in part to research reviews and other types

of contributions. Revised papers that do not adhere to these guidelines will be returned for further revision.

In particular attention should be given to the correctness of the references. If significant errors are found in the references such as incorrect authors' names, titles, year of publication, volume number, and page numbers, the manuscript may be returned to the authors until all errors are corrected. The responsibility for the references being correct lies with authors. Our editors are unable to check each reference. The ICMJE note that citation errors sometimes appear in the published version of articles and to minimize such errors, authors should therefore verify references against the original documents. It is not necessary for the author to format the text of articles by using the fonts it which it will be published as these will be added at the type setting stage. A font such as Times New Roman, 12-point, may be used throughout apart from in tables and figures which have special requirements (see below).

Title and running title: Care should be taken to make the full or main title as clear and informative as possible. Supply a short running title (60 characters or less including spaces) to serve as an odd-numbered page header that expresses the main points of the full title.

Authors names and addresses: Immediately below the full title, list the author(s) by the full first name or initials, with the family or surname last, followed, in a separate line, by the name of the city and country where the research was conducted. Use a comma between names and a lowercase letter superscript following each comma to refer to the address footnote which will appear at the bottom of the first page. For the footnote, give the employment address of each author and the complete postal and E-mail

address of the author for correspondence. This footnote should be placed in a separate paragraph below the names and addresses and before the summary. It will be placed as a footnote during typesetting and this does not need to be done by the authors. (For examples of the information for the footnote paragraph see recent issues of *Fluoride*, available at: <http://homepages.ihug.co.nz/~spittle/fluoride-journal.htm>).

Summary and keywords: After the footnote information paragraph give a concise, factual abstract-style summary of the research results and conclusions. Immediately following the Summary, provide, for indexing purposes, an alphabetical list (first letter capitalized) of three to ten important Keywords. For examples, see recent issues of *Fluoride*.

Introduction: The section headings for the introduction and subsequent sections does not required special formatting and can be written in the same type being used for the text. The formatting in a particular font type and size will be added at the type setting stage. Begin the paper with a brief statement about the background of the study. Usually this will be less than one page in length. Pertinent previous prior work by the author(s) as well as by others, especially if published in *Fluoride* (see 35-year Cumulative Subject Index published in *Fluoride* 2002;35(4 - Part 2) should be cited. The reason for the new research and what it embraces should also be mentioned.

Materials and methods: Make this section as concise as possible, but provide all essential details of how the investigation was conducted, especially if new or different methodology was involved. When published procedures were used, they should only be referenced unless substantial changes were made in them.

Results: Give a brief presentation of the principal findings and the direct conclusions of the research. Except for drawing attention to key items, data in tables and figures should only be summarized and interpreted; they should not be repeated as such in the text.

Discussion: Concentrate on the broad conclusions and implications of the investigation, especially as they relate to other previously-published work. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments: Acknowledgments should be brief and given as appropriate according to circumstances, but sources of funding should always be stated.

References: List and number the references in the order they are cited in the text. Be sure to cite all references accurately and completely, exactly according to the International Biomedical Journals style described below, which follows that of *Index Medicus* and *PubMed*, without italics for book or journal titles (in standard abbreviated form). The titles of journals should be abbreviated according to the style used in *Index Medicus*. Consult the *List of journals indexed in index medicus* published annually as a separate publication by the library and as a list in the January issue of *Index medicus*. The list can also be obtained through the library's web site (<http://www.nlm.nih.gov>). In the text of the paper, use superscripted numbers immediately after commas or periods. When more than one reference is cited at a time, separate superscripted numbers without spaces by commas (e.g., 1,4,5,15) or, when in sequence, by a hyphen (e.g., 4-7,15).

Abbreviations and acronyms: Except for standard international system (SI) units of measurement, all abbreviations and acronyms should be defined, preferably in parenthesis, where

they first occur in the text or after the Summary. For unit-per-unit expressions, use a slash as in mg/L, µg/mL, mg/kg bw/day, mg/m³, L/hr, etc. Unit abbreviations used, especially when numbers are involved, include sec for second or seconds, min for minute or minutes, hr for hour or hours, mo for month or months, yr for year or years, L for liter or liters, mL of milliliter or milliliters, µL for microliter or microliters. Day or days and week or week should be spelt in full as they are short words, although occasionally wk is acceptable for week or weeks. Common abbreviations of Latin words should be in the regular font rather than in italics, e.g., i.e., cf., et al., etc.

Tables: Number tables consecutively with Arabic numerals and supply a brief title for each table. When there is only one table, it should not be numbered. Tables should be designed not to exceed the maximum page size (132 x 210 mm) of the journal. Tables in portrait mode are preferred to those in landscape mode for ease of reading. To accommodate our page size and retain consistency, text and numbers should be formatted in Arial 9-point font (Arial-Narrow 9.5-point is also acceptable).

Whenever possible, tables should be created in a computer program (like Word or Excel) as one table, rather than several closely spaced separate tables, with columns and rows, not as data separated by tabs, paragraph returns, commas, or hard spaces. The title should be placed in the first row for which the columns may be straddled.

Horizontal lines do not need to be added to the table and will be inserted as necessary at the typesetting stage. Give each column a short or abbreviated heading. Except for very short clarifications, place explanatory matter in footnotes in the last row (straddled) of

the table, not within table headings. Explanatory matter should be identified by superscripted lower-case letters.

*For footnotes to data within the table, use the following symbols (superscripted) in this sequence: *, †, ‡, §, ||, **, ††, ‡‡, §§, ||||.*

Explain all non-standard abbreviations used in tables in lettered footnotes, and identify statistical measures of variation such as standard deviation and standard error of the mean.

Figures: As with Tables, number figures consecutively with Arabic numerals and omit numbering when there is only one figure. Place figure captions beneath the figures. Charts or drawings should be professionally-designed on a computer program such as Microsoft Excel, PowerPoint, CorelDraw, etc. They should be appropriately sized so that the figure, together with caption, legends, axis, etc., does not exceed a maximum width of 115 mm. To conform to our page size and ensure consistency, text and numbers within figures should be formatted in Arial font no smaller than 9-point. (Arial-Narrow 9.5-point is also acceptable.) Appropriately- sized photographic prints (do not trim photos with scissors) should each have a small label taped (not glued) on the back indicating the figure number and its orientation. Do not write on the front or back of figures, or scratch or mar photos by using paper clips or staples. Do not tape or glue photos onto cardboard or any other paper. Brief, informative descriptive captions for photos should be included at the end of the paper.

Style guide for references: Take careful note of the following modified examples of *Index Medicus/PubMed* punctuation and spacing for references (elimination of italics and periods in name abbreviations; no spaces between year, volume, issue, and page numbers for journal articles, etc.). Like many other journals, we do

not use periods after the journal titles or journal title abbreviations as has been suggested by the ICMJE for biomedical journals. If an article is not in English the reference style given in section 5 below may be followed. If it is wished to give a translation in English of the title, of a book or an article, this may be placed in square brackets immediately after the title. The name of the original language may be placed at the end of the reference in square brackets, e.g. [in Russian]. The correct International System of Units (SI) abbreviations for milliliter, microliter, and hour are mL, μ L, and hr rather than ml, μ l, and h. For consistency a lower case p should be used for tests of statistical significance rather than an upper case P. No space should be present between p and the less-than symbol, e.g., $p < 0.01$. Again, reference superscripts, throughout the text, tables, and figures, should follow, not precede, commas and periods.

INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS
UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO
BIOMEDICAL JOURNALS:
SAMPLE REFERENCES

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html,
updated July 9, 2003).

The following examples have been modified to match the style used in *Fluoride* by omitting periods after journal titles or journal title abbreviations.

Articles in Journals

1. *Standard journal article*: List the first six authors followed by et al. (Note: NLM now lists all authors.)

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002 Jul 25;347(4):284-7.

As an option, if a journal carries continuous pagination throughout a volume (as many medical journals do) the month and issue number may be omitted.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002;347:284-7.

More than six authors:

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al.

Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res* 2002;935(1-2):40-6.

2. *Organization as author:*

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 2002;40(5):679-86.

3. *Both personal authors and an organization as author:* (This example does not conform to NISO standards.)

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ; Alf-One Study Group. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2003;169(6):2257-61.

4. *No author given:*

21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ* 2002;325(7357):184.

5. *Article not in English:*

(Note: NLM translates the title into English, encloses the translation in square brackets, and adds an abbreviated language designator.)

Ellingsen AE, Wilhelmsen I. Sykdomsangst blant medisin- og jusstudenter. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002;122(8):785-7.

6. *Volume with supplement:*

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

7. Issue with supplement:

Glauser TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology* 2002;58(12 Suppl 7):S6-12.

8. Volume with part:

Abend SM, Kulish N. The psychoanalytic method from an epistemological viewpoint. *Int J Psychoanal* 2002;83(Pt 2):491-5.

9. Issue with part:

Ahrar K, Madoff DC, Gupta S, Wallace MJ, Price RE, Wright KC. Development of a large animal model for lung tumors. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(9 Pt 1):923-8.

10. Issue with no volume:

Banit DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop* 2002;(401):230-8.

11. No volume or issue:

Outreach: bringing HIV-positive individuals into care. *HRSA Careaction* 2002 Jun:1-6.

12. Pagination in roman numerals:

Chadwick R, Schuklenk U. The politics of ethical consensus finding. *Bioethics* 2002;16(2):iii-v.

Type of article indicated as needed:

Tor M, Turker H. International approaches to the prescription of long-term oxygen therapy [letter]. *Eur Respir J* 2002;20(1):242.

Lofwall MR, Strain EC, Brooner RK, Kindbom KA, Bigelow GE. Characteristics of older methadone maintenance (MM) patients [abstract]. *Drug Alcohol Depend* 2002;66 Suppl 1:S105.

14. *Article containing retraction:*

Feifel D, Moutier CY, Perry W. Safety and tolerability of a rapidly escalating dose-loading regimen for risperidone. *J Clin Psychiatry* 2002;63(2):169. Retraction of: Feifel D, Moutier CY, Perry W. *J Clin Psychiatry* 2000;61(12):909-11.

15. *Article retracted:*

Feifel D, Moutier CY, Perry W. Safety and tolerability of a rapidly escalating dose-loading regimen for risperidone. *J Clin Psychiatry* 2000;61(12):909-11.

Retraction in: Feifel D, Moutier CY, Perry W. *J Clin Psychiatry* 2002;63(2):169.

16. *Article republished with corrections:*

Mansharamani M, Chilton BS. The reproductive importance of P-type ATPases. *Mol Cell Endocrinol* 2002;188(1-2):22-5. Corrected and republished from: *Mol Cell Endocrinol* 2001;183(1-2):123-6.

17. *Article with published erratum:*

Malinowski JM, Bolesta S. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 2000;22(10):1151-68; discussion 1149-50. Erratum in: *Clin Ther* 2001;23(2):309.

18. *Article published electronically ahead of the print version:*

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* 2002 Nov 15;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

Books and Other Monographs

19. *Personal author(s):*

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

20. *Editor(s), compiler(s) as author:*

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

21. *Author(s) and editor(s):*

Breedlove GK, Schorfheide AM. Adolescent pregnancy. 2nd ed. Wiecezorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services; 2001.

22. *Organization(s) as author:*

Royal Adelaide Hospital; University of Adelaide, Department of Clinical Nursing. Compendium of nursing research and practice development, 1999-2000.

Adelaide (Australia): Adelaide University; 2001.

23. *Chapter in a book:*

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

24. *Conference proceedings:*

Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2002.

25. *Conference paper:*

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

26. *Scientific or technical report:*

Issued by funding/sponsoring agency:

Yen GG (Oklahoma State University, School of Electrical and Computer Engineering, Stillwater, OK). Health monitoring on

vibration signatures. Final report. Arlington (VA): Air Force Office of Scientific Research (US), Air Force Research Laboratory; 2002 Feb. Report No.: AFRLSRBLTR020123. Contract No.: F496209810049.

Issued by performing agency:

Russell ML, Goth-Goldstein R, Apte MG, Fisk WJ. Method for measuring the size distribution of airborne Rhinovirus. Berkeley (CA): Lawrence Berkeley National Laboratory, Environmental Energy Technologies Division; 2002 Jan. Report No.: LBNL49574. Contract No.: DEAC0376SF00098. Sponsored by the Department of Energy.

27. Dissertation:

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

28. Patent:

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1.

Other Published Material

29. Newspaper article:

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. The Washington Post 2002 Aug 12;Sect. A:2 (col. 4).

30. Audiovisual material:

Chason KW, Sallustio S. Hospital preparedness for bioterrorism [videocassette]. Secaucus (NJ): Network for Continuing Medical Education; 2002.

31. Legal Material:

Public law:

Veterans Hearing Loss Compensation Act of 2002, Pub. L. No. 107-9, 115 Stat. 11 (May 24, 2001).

Unenacted bill:

Healthy Children Learn Act, S. 1012, 107th Cong., 1st Sess. (2001).

Code of Federal Regulations: Cardiopulmonary Bypass Intracardiac Suction Control, 21 C.F.R. Sect. 870.4430 (2002).

Hearing:

Arsenic in Drinking Water: An Update on the Science, Benefits and Cost: Hearing Before the Subcomm. on Environment, Technology and Standards of the House Comm. on Science, 107th Cong., 1st Sess. (Oct. 4, 2001).

32. *Map:*

Pratt B, Flick P, Vynne C, cartographers. Biodiversity hotspots [map]. Washington: Conservation International; 2000.

33. *Dictionary and similar references:*

Dorland's illustrated medical dictionary. 29th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. Filamin; p. 675.

Unpublished Material

34. *In press:* (Note: NLM prefers "forthcoming" because not all items will be printed.)

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M. Signature of balancing selection in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. In press 2002.

Electronic Material

35. *CD-ROM:*

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CDROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

36. *Journal article on the Internet:*

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

37. *Monograph on the Internet:*

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

38. *Homepage/Web site:*

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

39. *Part of a homepage/Web site:* American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

40. *Database on the Internet:*

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

41. *Part of a database on the Internet:*

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly.

OFFPRINTS

Five offprints will be sent free to the corresponding author. Additional offprints are available at a cost of US\$0.075 per page, including postage, e.g., 50 copies of a 5 page offprint would cost US\$18.75. Information about ordering offprints will be sent to the corresponding author when the proofs of the paper are sent as a pdf typeset draft to the author for consideration and correcting.

Anexo C

Anexo D

Determinação da concentração de íon flúor no plasma sanguíneo

Para a análise do flúor no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , 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 6 M saturado por hexametil-disiloxano (HMDS - Aldrich) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Esta solução (denominada de ácido aquecido) foi previamente aquecida até que seu volume fosse 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_2 , 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 destas placas, foi colocado 50 μL 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 6 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 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi ajustado para 75 μL 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 micro – eletrodo 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).

Anexo E

“Western blotting”

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste 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 e modificado por GARFIN (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: 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 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorreu o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição

dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2h.

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

- “Electrophoretic transfer”:

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 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 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 (KRUGER & 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 -0% de gordura) durante 2h à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpo antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit’ de quimioluminescência -ECL- Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), 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–Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR).

A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um programa da Media Cybernetics – Gel-Pro Analyser - Hartland, USA.

REFERÊNCIAS

GARFIN, D.E. One-dimensional gel eletrophoresis. **Methods Enzimol.** v. 182 p.425-41, 1990.

KRUEGER, N.J. & HAMMOND, J.B.W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using 125 I labeled protein A. **Methods Mol. Biol.**v. 3 p. 409-17, 1988.