

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/08/2017.

unesp



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

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

AMANDA GOMES PEREIRA

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

ARAÇATUBA

2016



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

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

AMANDA GOMES PEREIRA

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

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

Orientadora: Prof^a. Adj. Doris Hissako Sumida.

ARAÇATUBA

2016

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

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

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

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

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 03/04/1990

Filiação: Dionísio Fernando Pereira

Márcia Gomes Pereira

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Albus Dumbledore)

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

RESUMO

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

Palavras-chave: Fluoreto de sódio; resistência à insulina; ovariectomia; TNF- α marcadores ósseos

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| TABELA 1 - | Concentração plasmática glicose, insulina, fluoreto, TNF- α e índice HOMA-IR de ratas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C) | 38 |
|-------------------|--|----|

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHIBA, F.Y.; COLOMBO, N.H.; SHIRAKASHI, D.J.; GOMES, W.D.S.; MOIMAZ, S.A.S.; GARBIN, C.A.S.; SILVA, C.A.; SUMIDA, D.H. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. *Fluoride*, v.43, n.1, p.25-30, Jan/Mar. 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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