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

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RITA DE CÁSSIA ALVES NUNES

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE INSULÍNICA, TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO E DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM RATAS TRATADAS COM FLUORETO DE SÓDIO

ARAÇATUBA
2014

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

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RITA DE CÁSSIA ALVES NUNES

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE INSULÍNICA, TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO E DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM RATAS TRATADAS COM FLUORETO DE SÓDIO

Tese 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 Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof[a]. Adj. Doris Hissako Sumida.

ARAÇATUBA

2014

Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Nunes, Rita de Cássia Alves.
N972a Avaliação da sensibilidade insulínica, transdução do sinal insulínico e da densidade mineral óssea em ratas tratadas com fluoreto de sódio / Rita de Cássia Alves Nunes. - Araçatuba, 2014
131 f. : il. + 1 CD-ROM

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

1. Flúor 2. Densidade óssea 3. Osteoporose 4. Resistência à insulina 5. Ratos I. Título.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 18.01.1970, Campinas - SP.

Filiação: Santina Bernava Nunes
Manoel Alves Nunes

1998/2001: Curso de Graduação, Licenciatura em Ciências Biológicas – Faculdades Adamantinenses Integradas/FAI – Adamantina – SP.

2006/2008: Curso de Pós-Graduação em Agronomia, nível de Mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – na Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente – SP.

2010/2014: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia/SBFis – na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba/FOA – Araçatuba – SP.

Ao Deus soberano toda a honra, toda a glória, toda a adoração, todo o louvor e ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, dedico.

A minha família, minha mãe Santina Bernava modelo de paciência, humildade e perseverança! Espírito de força, sabedoria e paz! Meus irmãos Ricardo e Renato, pela confiança, paciência, compreensão e amor. Pelas palavras sábias e pelo apoio incondicional em todos os momentos desta jornada.

Aqui finalizo mais uma fase da minha caminhada de vida e seguramente eu não teria conseguido sem vocês. Vocês são meu "porto seguro".

Meu eterno amor a vocês!

SALMO 37

Não te enfades por causa dos malfeitores, nem tenhas inveja dos que praticam a iniquidade.

Pois em breve murcharão como a relva, e secarão como a erva verde.

Confia no Senhor e faze o bem; assim habitarás na terra, e te alimentarás em segurança.

Deleita-te também no Senhor, e ele te concederá o que deseja o teu coração.

Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.

E ele fará sobressair a tua justiça como a luz, e o teu direito como o meio-dia.

Descansa no Senhor, e espera nele; não te enfades por causa daquele que prospera em seu caminho, por causa do homem que executa maus desígnios.

Deixa a ira, e abandona o furor; não te enfades, pois isso só leva à prática do mal.

Porque os malfeitores serão exterminados, mas aqueles que esperam no Senhor herdarão a terra.

Pois ainda um pouco, e o ímpio não existirá; atentarás para o seu lugar, e ele ali não estará.

Mas os mansos herdarão a terra, e se deleitarão na abundância de paz.

O ímpio maquina contra o justo, e contra ele range os dentes, mas o Senhor se ri do ímpio, pois vê que vem chegando o seu dia.

Os ímpios têm puxado da espada e têm entesado o arco, para derrubarem o pobre e necessitado, e para matarem os que são retos no seu caminho.

Mas a sua espada lhes entrará no coração, e os seus arcos quebrados.

Mais vale o pouco que o justo tem, do que as riquezas de muitos ímpios.

Pois os braços dos ímpios serão quebrados, mas o Senhor sustém os justos.

O Senhor conhece os dias dos íntegros, e a herança deles permanecerá para sempre.

Não serão envergonhados no dia do mal, e nos dias da fome se fartarão.

Mas os ímpios perecerão, e os inimigos do Senhor serão como a beleza das pastagens; desaparecerão, em fumaça se desfarão.

O ímpio toma emprestado, e não paga; mas o justo se compadece e dá.

Pois aqueles que são abençoados pelo Senhor herdarão a terra, mas aqueles que são por ele amaldiçoados serão exterminados.

Confirmados pelo Senhor são os passos do homem em cujo caminho ele se deleita; ainda que caia, não ficará prostrado, pois o Senhor lhe segura a mão.

Fui moço, e agora sou velho; mas nunca vi desamparado o justo, nem a sua descendência a mendigar o pão.

Ele é sempre generoso, e empresta, e a sua descendência é abençoada.

Aparta-te do mal e faze o bem; e terás morada permanente.

Pois o Senhor ama a justiça e não desampara os seus santos. Eles serão preservados para sempre, mas a descendência dos ímpios será exterminada.

Os justos herdarão a terra e nela habitarão para sempre.

A boca do justo profere sabedoria; a sua língua fala o que é reto.

A lei do seu Deus está em seu coração; não resvalarão os seus passos.

O ímpio espreita o justo, e procura matá-lo.

O Senhor não o deixará nas mãos dele, nem o condenará quando for julgado.

Espera no Senhor, e segue o seu caminho, e ele te exaltará para herdares a terra; tu o verás quando os ímpios forem exterminados.

Vi um ímpio cheio de prepotência, e a espalhar-se como a árvore verde na terra natal.

Mas eu passei, e ele já não era; procurei-o, mas não pôde ser encontrado.

Nota o homem íntegro, e considera o reto, porque há para o homem de paz um porvir feliz.

Quanto aos transgressores, serão à uma destruídos, e a posteridade dos ímpios será exterminada.

Mas a salvação dos justos vem do Senhor; ele é a sua fortaleza no tempo da angústia.

E o Senhor os ajuda e os livra; ele os livra dos ímpios e os refugiam.

Se alguém tem ouvidos para ouvir, ouça.

(Apocalipse 13:19)

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à Professora Adjunto Doris Hissako Sumida pela orientação, por confiar na minha capacidade e, sobretudo, pela sua paciência em todos os momentos durante o período de elaboração e execução deste trabalho;

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realização do curso;

Ao Professor Mário Jefferson Quirino Louzada e aluna de mestrado Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira pelo apoio, pelos ensinamentos em biomecânica e pela disponibilidade do laboratório para experimentação.

Aos técnicos: Pedro Luis Florindo do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp e José Marcelo Tramarin do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Diogo Reatto, Liliam Sayuri Mada pelo excelente trabalho, atenção dispensada e disposição em nos atender.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA, Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, Claudio Hideo Matsumoto, 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, pela amizade, companhia de sempre, pelas dicas e serviços prestados;

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Maurício Hiromi Tutumi, Patrick Santos Nogueira da Silva, pela amizade e constantes auxílios.

Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA, Camilo Roberto Venâncio, João Batista Alves Correa e Alan Roge Senerine Carvalho pela amizade e serviços prestados;

Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Básicas e também de outros Departamentos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA, pela boa convivência;

Aos companheiros do laboratório de Endocrinologia: Aline Pedro Yamamoto, Amanda Gomes Pereira, Ana Paula Castilho Garcia Seraphin, Fernando Yamamoto Chiba, Jéssica Bonilha, Kelly Santos, Lara Mariano Pinheiro, Leonardo Raniel Figueiredo, Maria Sara de Lima Coutinho Matera, Mariana Lopes Benites, Marina Tuppy, Max Sander de Oliveira Mota, Natália Magalhães, Natália Scaramele, Nayara Rodrigues Alves, Renato Felipe Pereira, Thais Tsosura, e do laboratório de Fisiologia: Gabriela Patrício Bearare, Gean Domingos da Silva Souza, Talita de Melo e Silva pela troca de experiências e amizade durante esta jornada;

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA, pelos serviços prestados;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma e em qualquer etapa, para a realização deste trabalho;

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

São tantos os que passaram pela minha vida ao longo do tempo. Todos tiveram suas marcas timbradas na minha história e é muito difícil medir o grau de importância de cada um, no entanto seus timbres ajudaram de alguma forma a trilhar o melhor caminho até aqui!

Ao meu melhor amigo ***Jesus Cristo****, sempre e incondicionalmente ao meu lado. É necessário ter fé. A fé é um sentimento de total crença em alguém, ainda que não haja nenhum tipo de evidência que comprove a veracidade da proposição em causa. É uma atitude contrária à dúvida e está intimamente ligada à confiança. "Ora, sem fé é impossível agradar-lhe; porque é necessário que aquele que se aproxima de Deus creia que ele existe, e que é galardoador dos que o buscam" (Hebreus 11:6).*

Aos meus ***irmãos*** *Ricardo Alves Nunes, Renato Alves Nunes e Renata Nunes Espanhol companheiros e divertidos sempre com uma palavra amiga, um carinho ou um abraço na hora certa. Aos meus* ***sobrinhos*** *Ricardo Junior Alves de Brito, Lucas Vinícius Alves de Brito, Larissa de Brito Nunes, Miguel Ramos Berti Alves e Breno Nascimento Nunes Espanhol, que essa obra possa servir de inspiração para que vocês sigam em frente com os estudos.*

Aos meus amigos e ***irmãos em Cristo*** *Reverendo Márcio Ferré Fontão e Doutor Diego Rios de Araujo, pela amizade sincera de sempre, pelo socorro e apoio desmedido em momentos de minha trajetória acadêmica. Ao casal Airton e Julie, e as amigas Nilza e Francisca, pela amizade e apoio sem precedentes.*

Aos ***amigos*** *Annelise Katrine Carrara Prieto, Ariana Aparecida Ferreira Pereira, Lígia Arnedo Perassa, Angela Cristina de Nicola, Jéssica Troiano, Simone Regina Potje, Murilo Eduardo Graton, Felipe Munhoz, Matheus Brasilino, Fabiano Silberchimit Maia, Max Sander de Oliveira da Mota e tantos outros que não cito neste momento, porém não menos importantes. Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir, porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente! Benditos os que sofrem pelos amigos, os que falam com o olhar, porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende. Amigo a gente entende! Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade. Ter amigos é a melhor cumplicidade!*

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a DEUS, não sou o que era antes."

Marthin Luther King

NUNES, R. C. A. **Avaliação da sensibilidade insulínica, transdução do sinal insulínico e da densidade mineral óssea em ratas tratadas com fluoreto de sódio.** 2014. 131 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Define-se a osteoporose como uma doença sistêmica, caracterizada pela degradação microarquitetônica do osso e diminuição da massa óssea, que promove aumento da fragilidade óssea com risco de fratura. Vários estudos investigaram a utilização de fluoreto de sódio (NaF) para o tratamento contra a osteoporose. O flúor, quando ingerido, pode acumular-se em tecidos calcificados, como dentes e ossos, podendo alterar a qualidade destes tecidos. Além de influenciar o metabolismo ósseo, o flúor também pode alterar a homeostase glicídica. Estudos em ratos demonstraram que o tratamento crônico com NaF (20 mg/L) na água de beber promoveu a diminuição do sinal insulínico e resistência à insulina. Pesquisas apontam o desenvolvimento de um novo eixo endócrino envolvendo os ossos e o metabolismo da glicose e, isto, abre uma perspectiva de opções terapêuticas para o tratamento de várias patologias. Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da ingestão hídrica com fluoreto de sódio na dose de 50 mg/L em ratas ovariectomizadas em: 1) grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2) em tecido adiposo branco (TAB); 2) concentrações plasmáticas de glicose, insulina, colesteróis, triacilglicerol, TNF-α, IL-6, cálcio, osteocalcina e flúor; 3) densidade óssea e propriedades biomecânicas (rigidez, força máxima e tenacidade) em tíbias; 4) análise histomorfométrica. Quarenta e duas ratas Wistar (dois meses de idade) ovariectomizadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (OVX-C), o qual foi submetido ao tratamento sem NaF, mas com uma solução de NaCl (9,54 mg/kg p.c.) que contém a mesma quantidade de sódio em relação à do grupo NaF; 2) grupo NaF (OVX-F) que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Após esse período foram determinados: 1) o grau de fosforilação em tirosina da pp185 em TAB; 2) as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, osteocalcina, colesterol, triacilglicerol, TNF-α, IL-6, cálcio e flúor; 3) sensibilidade à insulina pelo teste endovenoso de tolerância à insulina (0,75U/kg); 4) as

propriedades biomecânicas (rigidez, força máxima e tenacidade); 5) conteúdo mineral ósseo – CMO, área e densidade mineral óssea - DMO e 6) análise histomorfométrica da tíbia. O tratamento em ratas OVX crônico com NaF promoveu: 1) diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp 185 (IRS1/IRS2) após estímulo insulínico no tecido adiposo branco, na sensibilidade à insulina (ITT), na espessura trabecular, no número de trabéculas, na área óssea, na rigidez, na força máxima, na tenacidade e na área total óssea; 2) aumento na concentração plasmática de insulina, osteocalcina, cálcio, triacilglicerol, VLDL, TNF-α e IL-6; 3) nenhuma alteração na massa corpórea, ingestão alimentar e hídrica, glicemia, colesterol total, HDL, LDL, CMO e DMO. Concluiu-se que o tratamento crônico com NaF (50 mg/L) em ratas OVX promoveu diminuição na sensibilidade à insulina, na transdução do sinal de insulina, nos parâmetros bioquímicos, biomecânicos e histomorfométricos dos ossos.

Palavras-chave: Flúor. Densidade óssea. Osteoporose. Resistência à insulina. Ratas. Ovariectomia.

NUNES, R. C. A. **Evaluation of insulin sensitivity, insulin signal transduction and bone mineral density in rats treated with sodium fluoride.** 2014. 131 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Osteoporosis is defined as a systemic disease characterized by bone degradation microarchitectonic and decreased bone mass, which promotes increased bone fragility and eventual fracture risk. Several studies have investigated the use of sodium fluoride (NaF) in the treatment for osteoporosis. Fluoride when ingested can accumulate in calcified tissues such as teeth and bones and may alter the quality of these tissues. Besides influencing bone metabolism, fluoride can also alter glucose homeostasis. Studies in rats have shown that chronic treatment with NaF (20 mg/L) in the drinking water has promoted the reduction in insulin signaling, and insulin resistance. Researches indicate the developing of a new endocrine axis involving the bones and glucose metabolism, and this opens a perspective of therapeutic options for the treatment of several pathologies. Therefore the aim of the study was to evaluate the effect of water intake with sodium fluoride at a dose of 50 mg/L in ovariectomized rats: 1) tyrosine phosphorylation status of insulin receptor substrate (pp185 - IRS-1 / IRS- 2) in white adipose tissue (WAT); 2) plasma glucose, insulin, cholesterols, triglyceride, TNF-α, IL-6, calcium, fluoride and osteocalcin; 3) bone density and biomechanical properties (stiffness, maximum force and toughness) in the tibia; 4) tibia histomorphometric analysis. Fourty-two female Wistar rats (two months old) were ovariectomized and randomly distributed into two groups: 1) control (OVX-C), which was subjected to the treatment without NaF group but with a solution of NaCl (9.54 mg/kg bw) containing the same amount of sodium in relation to the NaF group; 2) NaF group (OVX-F) which was subjected to treatment with NaF (50 mg/L) administered in drinking water for 42 days. After this period, the following evaluations were carried out: 1) tyrosine phosphorylation status of pp185 in TAB; 2) plasma concentrations of glucose, insulin, osteocalcin, cholesterol, triglyceride, TNF-α, IL-6, and calcium fluoride; 3) insulin sensitivity by intravenous insulin tolerance test (0.75U/kg); 4) biomechanical properties (stiffness, maximum force and toughness); 5) bone mineral content - BMC, area and bone mineral density - BMD and 6) histomorphometric analysis of the tibia. The treatment in chronic OVX rats promoted

with NaF: 1) decrease in: tyrosine phosphorylation status of pp 185 (IRS1/IRS2) after insulin stimulation in white adipose tissue, the insulin sensitivity (ITT), the trabecular width, the trabecular number, the bone area, stiffness, maximum force, tenacity and the total bone area; 2) increase in plasma concentration of insulin, osteocalcin, calcium, triglyceride, VLDL, TNF-α and IL-6; 3) no change in body weight, food and water intake, blood glucose, total cholesterol, HDL, LDL, BMC and BMD. It was concluded that chronic treatment with NaF (50 mg/L) in OVX rats caused a decrease in insulin sensitivity, insulin signaling transduction, biochemical, biomechanical and histomorphometric bone parameters.

Keywords: Fluoride. Bone density. Osteoporosis. Insulin resistance. Female rats. Ovariectomy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da ação da insulina sobre o receptor. 27

FIGURA 2 - Gráfico representativo dos tipos de resistência à insulina. 28

FIGURA 3 - 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 ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais. 52

FIGURA 4 - 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 ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais. 53

FIGURA 5 - 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 ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais. 54

FIGURA 6 - Efeito do estímulo insulínico sobre a fosforilação da pp185, em tecido adiposo branco (TAB) 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) durante 42 dias. Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE e processadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Em B, o grau de fosforilação da pp185, após estímulo insulínico, foi expresso em unidades arbitrárias por µg de proteína amostrada. Valores são apresentados como Média ± EPM de 6 experimentos. #p<0,05 OVX-C (-) vs. OVX-C (+); *p <0,05 OVX-C (+) vs. OVX-F (+). 55

FIGURA 7 - Concentração plasmática de cálcio em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando ***p<0,001. 59

FIGURA 8 - Concentração plasmática de osteocalcina em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando *p<0,05. 60

FIGURA 9 - Concentração plasmática de flúor em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando **p<0,05. 61

FIGURA 10 - Concentração de flúor em tíbias de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando ***p<0,0001. 62

FIGURA 11 - Propriedades microestruturais da metáfise proximal tibial de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio (50mg/L) administrado em água de beber nos seguintes grupos: controle (OVX-C) e tratado (OVX-F). Os parâmetros ósseos morfométricos representados são (A) da área do osso esponjoso (B.Ar), (B) número trabecular (Tb.N) e (C) espessura trabecular (Tb.Wi). Os resultados são apresentados como a média ± SEM, n = 6 Valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos. 63

FIGURA 12 - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo esponjoso na metáfise tibial no grupo controle (A) e no grupo tratado com flúor (B). Abreviações e símbolos: bt, trabécula óssea. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 250x. Barras de escala: 100 µm. 64

FIGURA 13 - Análise da densidade mineral óssea por emissões de dupla absorção de raios-X (DXA) do grupo controle (OVX-C) e do grupo tratado com fluoreto de sódio (OVX-F). (A) conteúdo mineral ósseo (g), (B) área total (cm2) e (C) densidade mineral óssea (g/cm2). Os resultados foram apresentados como média ± EPM, n = 10. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando *p<0,05. 65

FIGURA 14 - Propriedades biomecânicas das tíbias de ratas ovariectomizadas avaliadas por meio de teste de flexão em três pontos, nos grupos controle (OVX-C) e tratadas com fluoreto de sódio (OVX-F). São mostrados nos gráficos (A) rigidez extrínseca ($x10^{-3}$ N/m), (B) $F_{máx}$ - força máxima (N), e (C) tenacidade (mJ). Os resultados são apresentados como a média ± EPM, n = 10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando *p <0,05. 66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentrações plasmáticas de glicose e insulina; índice HOMA-IR e teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) de ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com fluoreto de sódio (OVX-F) e grupo controle (OVX-C). 56

TABELA 2 - Concentrações plasmáticas (mg/dL) de colesterol total, triacilglicerol, colesterol HDL, colesterol VLDL e colesterol LDL de ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com fluoreto de sódio (OVX-F) e grupo controle (OVX-C). 57

TABELA 3 - Determinação da concentração plasmática (pg/mL) das citocinas TNF-α e IL-6 de ratas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C). 58

LISTA DE ABREVIATURAS

% = porcentagem

α = alfa

β = beta

μm = micrômetro

μUI/mL = micro unidade internacional por mililitro

± = mais ou menos

Akt/PKB = proteína quinase B

B.Ar = área óssea

BMP = proteína morfogênica óssea

BSA = albumina de soro bovino

CBL = *casitas B-lineagelymphomaproto-oncogene*

CD34 = *cluster of differentiation* 34

cm^2 = centímetro quadrado

CMO = conteúdo mineral ósseo

CO_2 = dióxido de carbono

CSF 1 = fator estimulador de crescimento 1

CTX1 = telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I

DM 1 = diabetes *mellitus* tipo 1

DM 2 = diabetes *mellitus* tipo 2

DMO = densidade mineral óssea

DTT = *dithiothreitol*

DXA = *Dual energy X-Ray Absorptiometry*

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPM = erro padrão da média

F_2 = flúor

FGF = fator de crescimento de fibroblasto

$F_{máx}$ = força máxima

g = grama

g/cm^2 = grama por centímetro quadrado

GAB 1 = *GRB2-associated-binding protein* 1

GLUT4 = proteína transportadora de glicose 4

GM-CFU = unidade formadora de colônia – granulócito/macrófago

GOD = glicose oxidase

H_2 = hidrogênio

H_2O_2 = peróxido de oxigênio

HDL = *high-density lipoprotein*

HMDS = *hexamethyldisiloxan*

HMIT 1 = H^+ - *myo-inositol transporter 1*

HOMA = *Homeostasis Model Assessment*

i.p = intraperitoneal

IGF = fator de crescimento semelhante à insulina

IL-6 = interleucina - 6

IRS 1 = substrato do receptor de insulina 1

IRS 2 = substrato do receptor de insulina 2

ITT = teste endovenoso de tolerância à insulina

Kg = quilograma

K_{itt} = constante de velocidade de decaimento da glicose

L = litro

L/Kg = litro por quilograma

LDL = *low density lipoprotein*

LPO = peroxidação lipídica

M = molar

m = metro

MAPK = proteína quinase ativadora de mitógeno

mg = miligrama

mg/dia = miligrama por dia

mg/dL = miligrama por decilitro

mg/Kg = miligrama por quilograma

mg/L = miligrama por litro

mJ = mili Jaule

mM = milimolar

mm/min = milímetro por minuto

mm^2 = milímetro quadrado

mmol/L = milimolar por litro

mRNA = RNA mensageiro

MTT = *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

mV = milivolt

N = Newton

N/m = Newton por metro

Na = sódio

NaCl = cloreto de sódio

NaF = fluoreto de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

NF-$_{\kappa}$B = fator nuclear kappa B

nm = nanômetro

O_2 = oxigênio

OC = osteocalcina

OPG = osteoprotegerina

OVX-C = grupo ovariectomizado controle

OVX-F = grupo ovariectomizado tratado com fluoreto de sódio

PBS = *phosphate-buffered saline*

pg/mL = picograma por mililitro

pH = potencial de hidrogênio

PI3-K = fosfatidilinositol 3 - quinase

POD = peroxidase

ppm = parte por milhão

PPAR-γ = *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PTEN = *phosphatase and tensin homolog*

PTH = paratormônio

PTP1B = *protein-tyrosine phosphatase* 1B

RANKL = *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

ROS = espécie reativa de oxigênio

rpm = rotação por minuto

Runx2 = *runt-related transcription factor 2*

SDS-PAGE = *Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel* Electrophoresis

TAB = tecido adiposo branco

Tb.N = número de trabéculas por área

Tb.Wi = média da espessura de trabéculas por área

TEMED = *N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*

TGF-β = *transforming growth factor - beta*

TGF-α = fator de crescimento tumoral - alfa

TNF-α = fator de necrose tumoral - alfa

TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato

Tris = *(hidroximetil) metil acrilamida*

Tween = *polysorbate surfactant*

Twist2 = *Twist-related protein 2*

V = Volt

VLDL = *very low density lipoproteins*

S U M Á R I O

1INTRODUÇÃO **25**

2 OBJETIVOS **36**

3 MATERIAL E MÉTODO **38**

3.1 ANIMAIS 38

3.2 AVALIAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO 39

3.2.1 Preparação das amostras *39*
3.2.2 "Western blotting" *40*
3.2.3 "Immunoblotting" *41*
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 41

3.3.1 Determinação de osteocalcina *41*
3.3.2 Calcemia *42*
3.3.3 Glicemia *42*
3.3.4 Insulinemia *42*
3.4 HOMA-IR 43

3.5 TESTE ENDOVENOSO DE TOLERÂNCIA À INSULINA - CURTO 43

3.6 LIPIDEMIA 43

3.6.1 Determinação da concentração plasmática de colesterol total *43*
3.6.2 Determinação da concentração plasmática do colesterol HDL *44*
3.6.3 Determinação da concentração plasmática dos triacilglicerol *45*
3.6.4 Determinação da concentração plasmática do VLDL e LDL *45*
3.7 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS 46

3.7.1 Concentração plasmática de fator de necrose tumoral-α (TNF-α) *46*
3.7.2 Concentração plasmática de interleucina-6 (IL-6) *46*
3.8 DETERMINAÇÃO DO ÍON FLÚOR 46

3.8.1 Concentração de flúor no plasma *46*
3.8.2 Concentração de flúor no osso *47*
3.9 ANÁLISES DAS ESTRUTURAS ÓSSEAS 48

3.9.1 Análise histomorfométrica *48*
3.9.2 Densitometria óssea *49*
3.9.3 ENSAIO BIOMECÂNICO – RESISTÊNCIA À FLEXÃO EM TRÊS PONTOS *49*
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 50

4 RESULTADOS **52**

4.1 MASSA CORPÓREA (G) 52

4.2 INGESTÃO ALIMENTAR (G) 53

4.3 INGESTÃO HÍDRICA (ML) 54
4.4 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO EM TIROSINA DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DE INSULINA PP 185 (IRS1/IRS2) EM TECIDO ADIPOSO BRANCO 55
4.5 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA, DA INSULINEMIA E DA RESISTÊNCIA À INSULINA (PELO ÍNDICE HOMA-IR E PELO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA) 56
4.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL HDL, COLESTEROL LDL E COLESTEROL VLDL 57
4.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF-α E IL-6 58
4.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CÁLCIO 59
4.9 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE OSTEOCALCINA 60
4.10 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DO ÍON FLÚOR 61
4.10.1 Avaliação da concentração plasmática de flúor *61*
4.10.2 Avaliação da concentração de flúor no osso *62*
4.11 ANÁLISE MORFOMÉTRICA 63
4.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA 64
4.13 ENSAIO BIOMECÂNICO 65
4.13.1 Densitometria óssea *65*
4.13.2 Ensaio de flexão em 3 pontos *66*
5 DISCUSSÃO **67**
6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS **79**
7 CONCLUSÃO **80**
REFERÊNCIAS **83**
ANEXOS **99**

Introdução

1INTRODUÇÃO

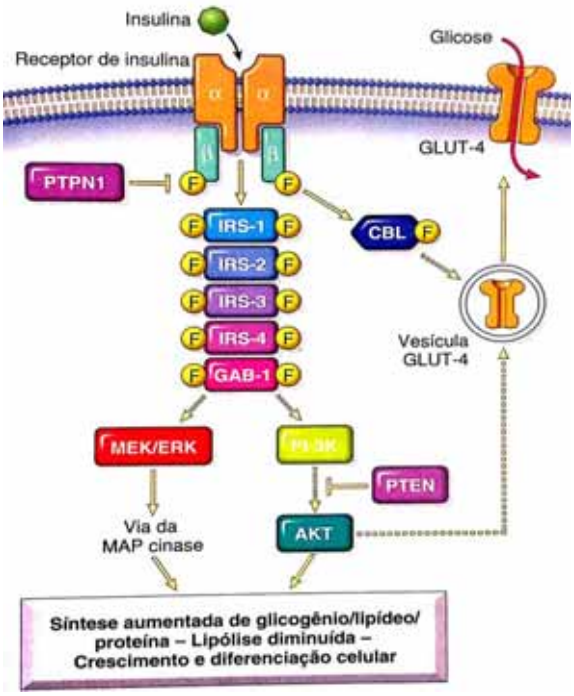
A secreção de insulina e a sensibilidade à insulina desempenham um papel crucial na homeostase da glicose. O desbalanço destes fatores pode prejudicar a secreção e a ação da insulina, podendo acarretar hiperglicemia (SEIKE et al., 2011).

A insulina exerce seu efeito por meio da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. Os receptores da insulina são receptores de membrana e apresentam atividade tirosina-quinase. Assim como as outras quinases intracelulares, a fosforilação das proteínas intracelulares altera a atividade enzimática destas proteínas, resultando em etapas sequenciais de fosforilação e desfosforilação, gerando os efeitos biológicos da insulina (PAGE, et al., 2004).

O receptor de insulina é uma proteína transmembrânica e tetramérica composta de duas subunidades alfa (α) e duas subunidades beta (β). Sendo que a subunidade-β (intracelular) possui atividade tirosina quinase. Com ligação da insulina, a subunidade-α (extracelular) ativa a tirosina quinase da subunidade-β resultando em autofosforilação do receptor e fosforilação de diversos substratos intracelulares, como a família do substrato do receptor de insulina (IRS), os quais incluem a IRS1 a IRS4. Estes substratos, por sua vez, podem ativar múltiplas cascatas de sinalização subsequentes, inclusive a via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que medeiam as atividades metabólicas e mitogênicas da insulina na célula e a via fosfatidilinositol 3 quinase (PI-3K) que está relacionada com a translocação de transportadores da glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática (KUMAR et al., 2010). O GLUT4 está presente em tecidos sensíveis à insulina (adiposo branco e marrom; músculo esquelético e cardíaco). Em condições basais, ou seja, na ausência do estímulo insulínico, a distribuição de GLUT4 é cerca de 10% presente em membrana plasmática e 90% presentes em membranas microssomais que constituem pequenas vesículas intracelulares (MACHADO, 1998).

A insulina pode facilitar o transporte de glicose em tecidos não sensíveis à insulina, pois favorece o gradiente de concentração da glicose à medida que aumenta o consumo intracelular do substrato (glicose-6-fosfato) ativando a via glicolítica em eritrócitos ou via da gliconeogenese em hepatócitos. Essas vias não devem ser consideradas um transporte hormônio sensível, pois não envolve uma modulação no sistema transportador de glicose (MACHADO, 1998).

Figura 1 – Representação esquemática da ação da insulina sobre o receptor. As linhas tracejadas representam proteínas intermediárias e ligações parceiras.



Fonte: Kumar et al., 2010.

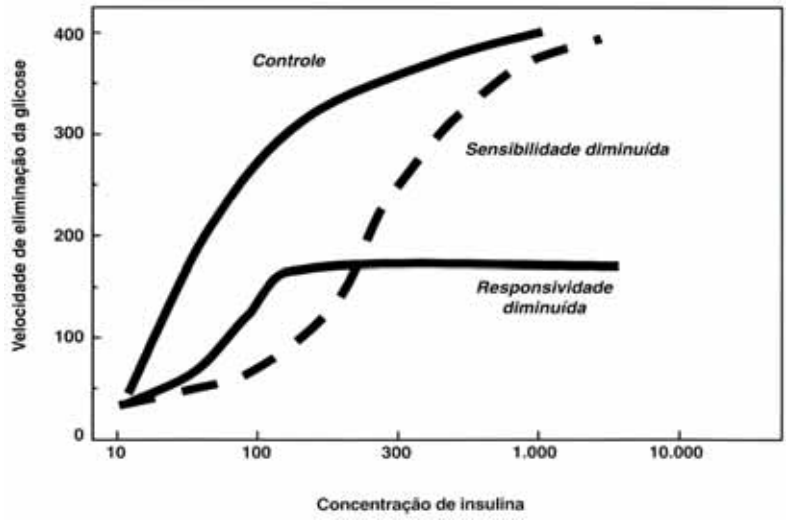
A figura 1 mostra a translocação e fusão das vesículas contendo GLUT4, processo esse que é facilitado pela ação da insulina promovendo a captação da glicose. Esse evento é mediado pela proteína quinase B (AKT), o principal efetor da via da PI-3K, mas também atua de forma independente pela proteína CBL (*casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*), que é um alvo direto de fosforilação do receptor de insulina. O sinal da insulina é atenuado *in vivo* por diversos inibidores endógenos. A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) desfosforila o receptor de insulina e inibe a sinalização da insulina, além disso, a fosfatase PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) atenua o sinal insulínico bloqueando a ativação da AKT pela via PI-3K (KUMAR et al., 2010). Modificações tanto na sinalização insulínica como na expressão do gene que codifica a proteína GLUT4, em tecidos sensíveis à insulina, correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica (CARVALHEIRA et al., 2002; MACHADO et al., 2006).

A obesidade, envelhecimento e hábito de vida sedentário podem estar associados à resistência insulínica. As células β pancreáticas inicialmente

compensam o estado de resistência à insulina aumentando a secreção desse hormônio. Com o avançar do tempo essas células falham em responder adequadamente à glicose, levando ao desenvolvimento de intolerância à glicose (CARVALHEIRA et al., 2002). As formas genéticas de resistência à insulina devido a defeitos na expressão do receptor de insulina ou na sua sequencia, são relativamente raros, mas representam as formas mais severas de resistência à insulina (KAHN *et al.*, 2009).

Uma definição clássica descrita por Kahn (1978), diz que a resistência à insulina existe em qualquer momento no qual uma quantidade fisiológica de insulina produz uma resposta biológica menor que o normal. Esta pode ser dividida em tipos (figura 2), por exemplo, quando há um desvio para a direita na dose-resposta ao hormônio e a resposta máxima permanece normal o quadro é de sensibilidade diminuída à insulina. Quando a dose-resposta está normal e a resposta máxima está diminuída apresenta-se responsividade diminuída (KAHN *et al.*, 2009).

Figura 2 – Esquema dos tipos de resistência à insulina.



Fonte: Kahn et al., 2009.

De uma perspectiva molecular, a resistência à insulina pode ser adquirida ou genética. Pacientes com altos níveis de anticorpos circulantes contra a insulina, que bloqueiam a ligação do ligante a seu receptor, é um exemplo de resistência à insulina pré-receptor, sendo este um tipo raro (GOLDSTEIN; KAHN, 1988).

Ao nível do receptor, a resistência à insulina pode resultar de alterações genéticas em sua expressão ou estrutura, alterações secundárias na atividade do

receptor devido à fosforilação em serina e “downregulation” de receptores. Em nível pós-receptor, pode ocorrer em qualquer uma das vias comuns ou ramificadas da sinalização da insulina (KAHN *et al.*, 2009).

Cusi *et al.* (2000), descreveram que nessa resistência hormonal pode haver redução na: 1) concentração de receptor de insulina e na sua atividade quinase; 2) fosforilação em tirosina do IRS-1/IRS-2; 3) atividade da PI-3K e na translocação do transportador de glicose GLUT4.

As formas adquiridas de resistência à insulina podem ocorrer como resultado de múltiplos mecanismos (KAHN *et al.*, 2009). O primeiro foi descrito por Bar e seus colaboradores em 1979 como um “downregulation” do receptor de insulina, que tem como característica a hiperinsulinemia leve que ocorre em resposta à resistência tecidual à insulina resultando em um aumento na internalização e degradação do receptor de insulina. Isso ocorre em alguma extensão nos estados insulinorresistentes mais comuns, ou seja, obesidade e diabete mellitus tipo 2 (DM2) (KAHN *et al.*, 2009). A hiperinsulinemia pode levar à “downregulation” dos substratos do receptor de insulina, produzindo uma redução ainda maior na sinalização insulínica (RUI *et al.*, 2001). Em alguns desses estados insulinorresistentes, tanto em seres humanos quanto em roedores, os níveis do receptor de insulina e do substrato do receptor IRS-1 em alguns tecidos podem ser reduzidos em mais de 50% (KAHN *et al.*, 2009).

Os pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), que exibem falta de insulina, não atingem seu pico de massa óssea o que leva a diminuição da densidade mineral óssea e aumento do risco de fratura, enquanto os pacientes com DM2 são hiperinsulinêmicos, o que estimula a formação óssea. Uma das hipóteses que explique esse fenômeno é que a insulina é um fator anabolizante para os ossos. Está se desenvolvendo um novo eixo endócrino envolvendo os ossos e o metabolismo da glicose e isto abre uma perspectiva de opções terapêuticas para o tratamento da obesidade e do diabetes (VELDHUIS-VLUG et al., 2013).

Macroscopicamente o tecido ósseo não é homogêneo, ele se apresenta poroso e irregular. A porosidade pode variar continuamente, e se distinguem em dois tipos de tecido ósseo, trabecular (porosidade entre 50 e 95%) e cortical (porosidade entre 5 e 10%) (DOBLARÉ; GARCÍA, 2003). A matriz orgânica consiste em 35% de material orgânico, sendo que sua maior parte é composta por colágeno tipo I e várias moléculas de proteoglicanos, osteocalcina (envolvida na mineralização),

osteonectina, sialoproteína (ligantes do cálcio) e proteínas relacionadas com a adesão celular, osteopontina e fibronectina entre outras; outros 65% da matriz é composta por cristais de hidroxiapatita (ROSENBERG, 1999). Após serem sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos, essas moléculas se organizam em série de maneira que as terminações fiquem emparelhadas em paralelo para formar fibrilas que permanecem unidas por ligações covalentes (AIRES, 2012).

A sobreposição, em paralelo, da extremidade de uma molécula de colágeno sobre outra e a existência de uma série de um pequeno *gap* (espaço) entre as terminações de uma molécula e o inicio da outra dá origem a regiões periódicas tridimensionais conhecidas por *hole zones* (buracos), essas regiões são os locais de inicio da mineralização óssea. Defeitos nos genes que determinam as moléculas do colágeno tipo I acarretam doenças ósseas grave, com aumento do risco de fraturas (BIANCO; LAZARETTE-CASTRO, 2008).

As células que caracterizam o tecido ósseo estão localizadas na superfície interna (endósteo) e externa (periósteo), estas são chamadas de osteoblastos e osteoclastos. (CARVALHO, 2005).

As células osteoprogenitoras se originam do mesênquima perivascular que se diferenciarão em pré-osteoblastos e, posteriormente em osteoblastos. Localizam-se na superfície dos ossos sintetizam, transportam e organizam os diversos componentes da matriz óssea, inicialmente chamada de matriz não-mineralizada (osteóide) e deverá sofrer um processo de mineralização, mediado pelo próprio osteoblasto. O osteoblasto sintetiza a matriz óssea, e uma vez envolvida por ela, este passa a ser chamado de osteócito. Alguns osteoblastos permanecerão como células de reserva na superfície óssea constituindo as células de revestimento (*bone lining cells*) (ARROTÉIA; PEREIRA, 2005).

O tecido ósseo sugere certa imutabilidade, no entanto ele é extremamente dinâmico, renovando-se de modo contínuo a uma taxa de 10% ao ano, ou seja, em 10 anos praticamente todo o esqueleto é renovado. A reabsorção do tecido ósseo é necessária para remodelação óssea e a maturação normal e o desenvolvimento do esqueleto, bem como para a erupção dentária (GRANJERO; TAGA, 2005). Os osteoclastos são células importantes nesse processo de reabsorção. Estas células se originam de células tronco do sistema hematopoiético, derivando da mesma linhagem dos monócitos-macrófagos (SUDA et al., 1995). Utilizando células de medula óssea humana KURIHARA et al. (1990) obtiveram células osteoclásticas de

populações altamente purificadas de unidades formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos (CFU-GM). Neste sistema de cultura foram encontradas células mononucleares, positivas para CD34 (fenótipo de célula tronco hematopoiética), como granulócitos, macrófagos, colônias mistas de linhagem hematopoiética e célula com morfologia poligonal única.

Essas células poligonais unem-se para formar células gigantes tipo osteoclasto, capazes de reabsorver matrizes calcificadas, reagindo fortemente ao anticorpo monoclonal que identifica o receptor vitronectina (receptor para adesão, exclusivo de pré-osteoclasto e osteoclastos maduros), além de expressar elevados níveis da fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP (que reflete o número e a atividade de osteoclastos). Estas células também possuem receptores para calcitonina, hormônio que atua diretamente nos osteoclastos, determinando diminuição da reabsorção óssea (KURIHARA et al., 1990).

Os osteoclastos são células grandes, móveis, multinucleadas, com 150μm de diâmetro; eles chegam a conter até 50 núcleos e tem citoplasma acidófilo. Anteriormente, acreditava-se que os osteoclastos originavam-se da fusão de muitos monócitos provenientes do sangue, no entanto eles têm um precursor da medula óssea em comum com os monócitos, a célula progenitora granulócito-macrófago (CFU-GM). Estas células precursoras são estimuladas pelo fator estimulador de colônia de macrófago e pelo OPG para entrarem em mitose. A osteoprotegerina não somente inibe a diferenciação destas células, mas também suprime a capacidade dos osteoclastos de reabsorverem o osso. Os osteoclastos ocupam depressões rasas denominadas lacunas de Howship, que identificam regiões de reabsorção óssea (GARTNER; HIATT, 2003).

A cada 10 segundos um novo sítio de remodelação é ativado. Estes podem ser estimulados sistemicamente (paratormônio) ou localmente (tensão mecânica ou microfraturas). Os osteócitos e a presença de células do estroma ou da medula óssea são fundamentais para que ocorra a diferenciação celular. Sabe-se que dois fatores são importantes para desencadear este processo: o RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear $_{K}$ β) e o fator de crescimento CSF-1 (fator estimulador de colônia tipo 1) juntos são capazes de induzir a expressão de genes que caracterizam o osteoclasto, como a TRAP, catepsina K, o receptor de calcitonina e β_3-integrina (BIANCO; LAZARETTE-CASTRO, 2008).

A reabsorção óssea é regulada por uma família de proteínas que incluem o RANK, ligante RANK (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (EGERDIE; SAAD, 2010). A ligação do RANKL na superfície dos precursores de osteoclastos irá induzir a maturação, ativação e sobrevida dessas células, desta forma, a RANKL promove a reabsorção óssea. Em contraste, a OPG é um "receptor decoy" que se liga e neutraliza a RANKL, inibindo a reabsorção óssea. Portanto, existe uma interação entre a RANKL e OPG (BOYLE et al., 2003). A proporção entre RANKL e OPG é um fator crítico que determina o equilíbrio entre a reabsorção e formação óssea. A vitamina D_3, TNF-α, paratormônio (PTH) e terapia com glicocorticoides promovem a reabsorção óssea (EGERDIE; SAAD, 2010).

Estudos em ratos transgênicos demonstraram que a hiperexpressão da OPG promove osteopetrose, enquanto ratos *knockout* para OPG desenvolvem osteoporose grave com fraturas. Várias citocinas e fatores de crescimento estimulam a reabsorção pelos osteoclastos, tais como IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α, TGF-α entre outros. Por outro lado, existem fatores anti-reabsortivos como o estrógeno, alguns BMPs (proteína morfogênica óssea) estimulam a produção de OPG e suprimem a expressão de RANKL pelos osteoblastos (BOYLE et al., 2003).

Diversos fatores estão envolvidos na regulação do desenvolvimento e crescimento ósseo, entre eles estão o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), o fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Embora o crescimento ósseo seja interrompido a com o desaparecimento das placas epifisárias, os processos de modelação e remodelação persistem durante toda a vida (BIANCO; LAZARETTI-CASTRO, 2008).

Este processo pode ser dividido em quatro etapas: ativação → reabsorção → reversão → formação. Esta divisão se baseia na predominância do tipo e da atividade das células observadas em cada etapa (KAHN et al., 2009).

O período de tempo entre o fim da reabsorção e o inicio da formação óssea, representa a fase de reversão. Durante esse período a superfície da lacuna é recoberta por células mononucleares constituídas por uma população heterogênea, que promovem a limpeza do local e recobrem a superfície com uma substância tipo cimento. Nesta fase verifica-se uma complexa comunicação bidirecional (complex forward-reverse signaling system) que vai inibir a atividade dos osteoclastos e promover a dos osteoblastos. (BIANCO; LAZARETTE-CASTRO, 2008).

A fase de formação inicia-se com a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos e existem proteínas (TGF-β) liberadas durante a degradação da matriz orgânica que são capazes de recrutar células osteoprogenitoras para os sítios de formação óssea. Os osteoblastos ativados recobrem a lacuna de reabsorção constituída em sua maioria por colágeno tipo I. Esta matriz é muito organizada e contém uma série de proteínas não colagênicas (osteopontina, osteocalcina e sialoproteína) que são cruciais para a organização dos cristais de mineralização (AIRES, 2012).

Em algumas situações fisiológicas (pós-menopausa) ou patológicas, o preenchimento final da lacuna de reabsorção óssea não restaura a quantidade de osso retirada em decorrência de uma reabsorção exagerada ou de uma formação insuficiente. Isto acarretará em um desbalanço no esqueleto, ocasionando ao longo do tempo aumento da fragilidade óssea com maior risco de fratura (BIANCO; LAZARETTE-CASTRO, 2008). Este processo pode ocorrer com a redução nos níveis séricos de estrógeno (menopausa) que resulta em aumento da atividade de remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação (PINTO NETO et al., 2002). Em decorrência desta diminuição das concentrações hormonal, após a menopausa, algumas mulheres passam a apresentar perda de massa óssea acima de 1% ao ano; outras perdem até 5% e, ao final de 5 anos, a perda pode ser superior a 25%, caracterizando a osteoporose pós-menopausa (RUSSO, 2001). Diversos fármacos tem sido alvo de estudo para avaliar a eficácia como agentes terapêuticos para combater a osteoporose, dentro os quais se encontra o fluoreto de sódio (ROSSI et al., 2010).

A ingestão de fluoreto pelos seres humanos ocorre por meio da ingestão de água e alimentos, e a maior parte de sua absorção ocorre no intestino. Além disso, pode ser encontrado em vários órgãos e tecidos, principalmente nos ossos e dentes e sua concentração no esqueleto está associada ente outras coisas com a quantidade ingerida e a idade. O depósito de fluoreto nos ossos reflete a renovação do esqueleto, ou seja, ossos em crescimento exibem maior deposição do íon (F^-) do que em osso maduro (BRUNTON et al., 2012).

O flúor exibe extrema eletronegatividade e reage prontamente com seu ambiente comportando-se como um íon. Por ser uma molécula muito pequena, a eletrosfera dos dois átomos na molécula F_2 (F-F) fica muito perto, enfraquecendo

sua ligação, tornando esta molécula instável (BUZALAF, 2008). Dessa maneira há substituição dos grupos hidroxila na molécula de hidroxiapatita originando cristais de apatita mais volumosos (fluorapatita) e com geometria específica que desorganizam a estrutura cristalina óssea, dificultando os processos normais de remodelagem óssea e comprometendo a mobilização de cálcio e do fósforo depositados nos ossos (COSTA *et al.*, 2009).

Há mais de 50 anos que o fluoreto de sódio tem sido utilizado como terapia para osteoporose pós-menopausa (RICH; ENSINCK, 1961; ROSSI et al., 2010). Quando esta substância é administrada, geralmente na dose de 50 a 75 mg/dia, a massa óssea aumenta em torno de 4 a 8% por ano ao longo de 4 a 5 anos (CASTELO-BRANCO, 1998).

Alguns estudos demonstraram que a terapia com o flúor aumenta a taxa do osso mineral, mas não diminui a taxa de fraturas (KLEEREKOPER *et al.*, 1991; MEUNIER *et al.*, 1998). O tratamento com fluoreto de sódio em humanos promoveu aumento da densidade mineral óssea diminuindo o número de fraturas (PAK, et al., 1994). Por outro lado, (TURNER *et al.*, 2001), avaliaram as propriedades biomecânicas das vértebras de ratos (16 e 48 semanas) tratados com flúor (50mg/L) e carência de fosfato de cálcio resultando na diminuição da força de suas vértebras. Em contraste, a carência de fosfato de cálcio e o consumo elevado de fluoreto não promoveram nenhum efeito sobre a massa óssea com aumento da quantidade de osteóide não mineralizado em ratos idosos. Estes autores sugeriram que a diminuição da mineralização do osso causada pela ingestão do fluoreto parece ser a principal causa da redução da força das vértebras.

Os osteoblastos podem ser estimulados com baixas doses de fluoreto de sódio (EINHORN et al., 1992), porém, como dito anteriormente, em quantidades elevadas pode interferir na mineralização do osso promovendo lesões nos osteócitos e osteoblastos e um decréscimo na resistência óssea (TURNER *et al.*, 2001). Segundo Riggs *et al.* (1990), o fluoreto aumentou a densidade da coluna lombar na porção esponjosa, mas diminuiu a densidade mineral do osso cortical. Estas alterações foram associadas a um aumento de fraturas periféricas e fraturas por estresse.

Além de interferir no metabolismo ósseo, o fluoreto pode ocasionar inibição da glicólise (DOST *et al.*, 1977) e promover resistência à insulina (CHIBA et al., 2010, 2012). Rigalli et al. (1990), observaram que o tratamento com fluoreto de sódio em

ratos (40μmol/100g p.c. de NaF durante 3 semanas na água de beber) e em humanos (60 mg de NaF- dose única) promoveu diminuição nas concentrações plasmáticas de insulina.

Estudos realizados em nosso laboratório (CHIBA et al., 2010) demonstraram que em ratos machos castrados o tratamento crônico de NaF (4,0 mg de F/kg de peso corporal/dia) promoveu uma diminuição no grau de fosforilação da tirosina pp185 no tecido muscular e no tecido adiposo branco, resultando em diminuição da sinalização de insulina. Além disso, a ingestão de NaF promove inibição da glicólise, diminuição da secreção de insulina, hiperglicemia, aumento das concentrações plasmáticas de TNF-α e resistência à insulina (CHIBA et al., 2012; RIGALLI et al., 1990; 1995; SAAD; ZECCHIN, 2011;).

O TNF-α também está relacionado com a resistência à insulina. A concentração desta citocina encontra-se aumentada em pacientes obesos. Isto estimula a fosforilação em serina ao invés de tirosina em IRS, resultando em diminuição na transdução do sinal insulínico. Essa fosforilação em serina é um dos fatores chave que interrompe a sinalização insulínica, levando a um quadro de resistência à insulina (TILG; MOSCHEN, 2008).

Os efeitos do flúor para o tratamento da osteoporose ainda são controversos, conforme os dados da literatura descritos acima. Além do mais, alguns estudos demonstraram que o flúor promove alterações no metabolismo glicídico e sensibilidade à insulina (CHIBA et at., 2012; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2004; RIGALLI et al., 1990; 1995; SAKURAI et al., 1993). Se nossos estudos demonstrarem que a dose utilizada (50mg/L, na água de beber) promove um quadro de resistência à insulina e alterações nas propriedades biomecânicas nos ossos de ratas ovariectomizadas, pode-se sugerir cautela na utilização do NaF como tratamento para osteoporose, principalmente, em mulheres pós-menopausa, pois o NaF também pode piorar o quadro de resistência à insulina decorrente do envelhecimento.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Verificar o efeito da ingestão hídrica de fluoreto de sódio - NaF (50 mg/L) em ratas ovariectomizadas sobre:

1) o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS1/IRS2) da pp185, após estímulo insulínico, em tecido adiposo branco (TAB)

2) os parâmetros bioquímicos:
    a. insulinemia
    b. glicemia
    c. osteocalcina
    d. calcemia

3) a sensibilidade à insulina

4) a concentração do íon flúor:
    a. no plasma
    b. no osso

5) a lipidemia:
    a. colesterol total
    b. triacilglicerol
    c. colesterol HDL
    d. colesterol LDL
    e. colesterol VLDL

6) as concentrações plasmáticas de citocinas:
    a. TNF-α
    b. IL-6

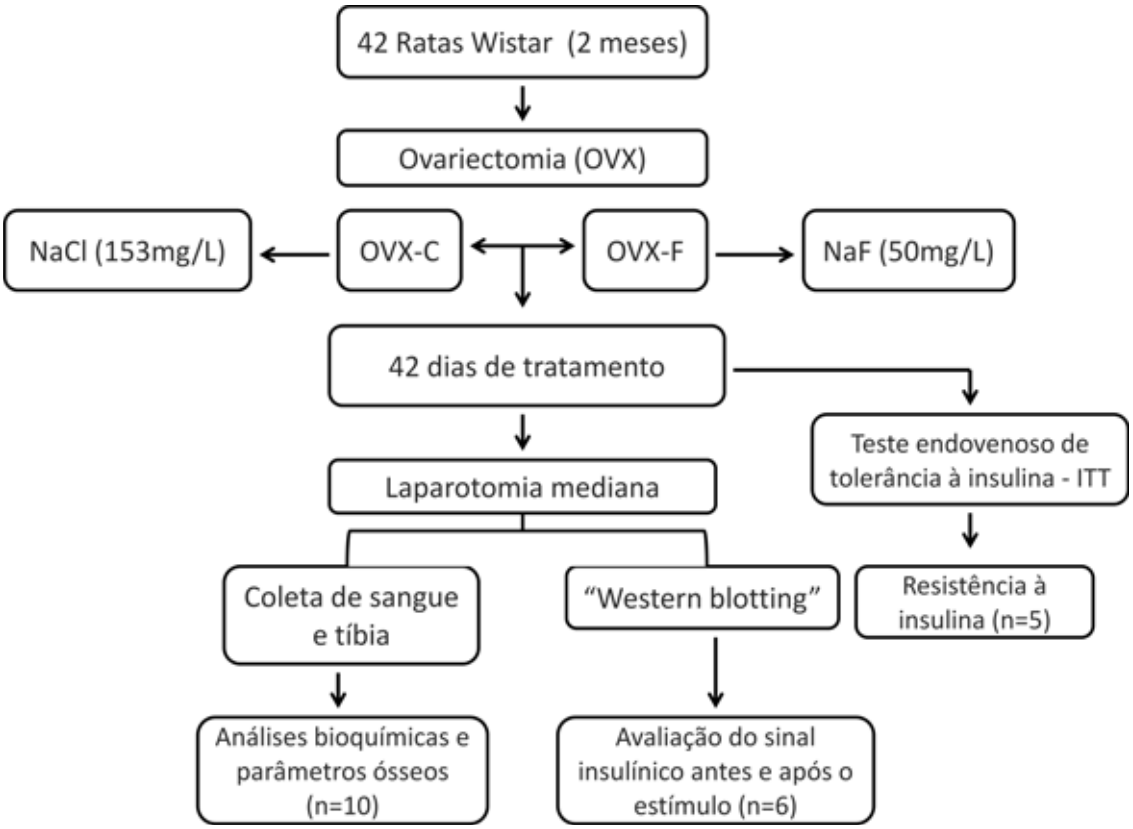
7) os parâmetros ósseos:
    a. histomorfometria
    b. densidade óssea (conteúdo e densidade mineral e área)
    c. ensaio biomecânico (rigidez, força máxima e tenacidade)

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisas Animais (Protocolo nº 00941-2013). Quarenta e duas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus)* da linhagem Wistar com dois meses de idade, pesando em média 200 gramas no início do estudo, foram aclimatadas em condições locais no biotério 23 ± 2°C e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 horas), com acesso à dieta de ratos de laboratório Presença habitual® (Evialis Indústria do Brasil Ltda, Paulínia, Brasil) e água. Estas ratas foram anestesiadas (cloridrato de cetamina -80 mg/kg- e cloridrato de xilazina -10 mg/kg) e submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) a partir de uma incisão dorsal. Após 14 dias deste procedimento cirúrgico, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: ratas ovariectomizadas controle (OVX-C) NaCl (9,54 mg/kg p.c.) e ratas ovariectomizadas tratadas com NaF (OVX-F) na concentração de 50 mg/L (Synth® - Labsynty, Diadema/SP, Brasil) na água de beber durante 42 dias. Foram avaliados três vezes por semana, ingestão de líquidos, consumo de ração e peso corporal dos animais de ambos os grupos. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, sendo quatro gaiolas de cada grupo (controle e tratado). A média de ingestão hídrica e de ração de cada gaiola foi divida pelo número de ratos contidos em cada uma. Após 42 dias de tratamento, os animais (sob jejum de 12 horas) foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltd., Itapira, Brasil, 3%, 5mg/100g de peso corporal, i.p.) para realização de laparotomia mediana para retirada de amostras do tecido adiposo branco (TAB), antes e 120s após da injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta), a fim de quantificar o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2). Em outro grupo coletou-se sangue pela veia cava inferior, as amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizado e mantidas a 4°C até à centrifugação a 800g (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -70°C até as análises bioquímicas. A tíbia direita também foi coletada para realização de ensaio biomecânico, densitometria óssea e histomorfometria.



Fluxograma representativo da metodologia utilizada neste trabalho

3.2 Avaliação do sinal insulínico

3.2.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10s) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 minutos, transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (4°C). Em seguida os homogenatos foram centrifugados (4ºC, 4.000 rpm por 15 minutos) para a separação do sobrenadante. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al.,1951), e para estoque em tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%).

3.2.2 “Western blotting”

“SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”): A primeira etapa do “Western blotting” consistiu na submissão das amostras (185 μg de proteína/amostra) a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Por meio deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Utilizou-se 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 minutos. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da Bio Rad (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA) e foi iniciada com a corrida no gel de “stacking” em voltagem constante de 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente, aplicou-se voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 horas. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (marcadores).

Após a separação das frações proteicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi realizada em voltagem constante de 100 V, durante 2 horas, a 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

3.2.3 “Immunoblotting”

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodetecção 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 2 horas à temperatura ambiente e, então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpo (de camundongo, na diluição 1:400) antifosfotirosina (UPSTATE, New York, EUA) por 4 horas em temperatura ambiente.

Posteriormente foram realizadas três lavagens com solução basal e as membranas foram incubadas durante 1 hora com segundo anticorpo (anti-camundongo, na diluição 1:10.000) contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência - ECL-GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, realizaram-se três lavagens das membranas de nitrocelulose comp 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. Finalmente, drenou-se o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta ao filme de RX (Hyperfilm ECL–GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) durante 10 minutos 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 o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.3 Análises bioquímicas

3.3.1 Determinação de osteocalcina

A concentração (pg/mL) de osteocalcina plasmática foi determinada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com a utilização de kits,

seguindo as instruções do fabricante. O kit comercial utilizado foi SEA471Ra 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for osteocalcin. Uscn life science Inc. Houston, USA. A absorbância foi determinada em 450 nm.

3.3.2 Calcemia

As determinações de cálcio foram realizadas pelo de método espectrofotométrico (“kit” comercial - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil. ref. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.3.3 Glicemia

Trata-se de um método enzimático, específico para quantificação de glicose (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil). No método de glicose-oxidase a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O H_2O_2, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Foram consideradas as seguintes reações resumidas: glicose + O_2 + H_2 $2H_2O_2$ + 4-benzoquinona monoimino) fenazona + 4 H_2O.

3.3.4 Insulinemia

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

3.4 HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*/Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: HOMA - IR = glicemia de jejum (mmol/L) X insulinemia de jejum (μUI/mL)/22,5) (LIMA *et al.*, 1998).

3.5 Teste endovenoso de tolerância à insulina - curto

O teste de tolerância à insulina intravenosa (ITT) foi realizado em dez animais de cada grupo (OVX-C e OVX-F) como se segue: o ensaio foi realizado com os animais anestesiados tal como descrito anteriormente, e foi realizada a canulação da veia jugular direita, a introdução da cânula (cânula "sylastic") para a proximidade do átrio (veia cava superior). Esta cânula serviu para a injeção de insulina que foi administrada a uma dose de 0,75 L/kg de peso corporal. As amostras de sangue (50μ/L) foram recolhidas a partir de caudas com a seguinte conformação: 0 (antes da administração do hormônio, 4, 8, 12, e 16 minutos após a administração de insulina e de glicose que foi medida usando um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os resultados foram analisados por comparação da taxa constante de desaparecimento de glicose (valor K_{itt}) de 0 a 16 minutos de ensaio. O valor K_{itt} foi calculado usando a equação de 0,693/t 1/2. A glicose t 1/2 foi calculado a partir da inclinação da análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose no plasma durante a fase linear de decaimento (BONORA *et al.*, 2000).

3.6 Lipidemia

3.6.1 Determinação da concentração plasmática de colesterol total

Este é um método enzimático, específico para quantificação de colesterol total (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Nesse método os

ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina) que tem absorvidade máxima de 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra. Para a dosagem de colesterol total foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos:

1. Colesterol (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 200
2. Fator de calibração = 200 ÷ Absorbância do Padrão
3. Colesterol (mg/dL) = Fator x Absorbância do Teste
4. Colesterol (mmol/L) = mg/dL x 0,0259

3.6.2 Determinação da concentração plasmática do colesterol HDL

Este é um método enzimático, específico para quantificação de colesterol HDL (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O conjunto Colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura do ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomicrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo em colesterol (Colesterol HDL) é determinado enzimaticamente. Para a dosagem de HDL foram utilizados 100µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos:

1. Colesterol HDL (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 40
2. Fator de calibração = 40 ÷ Absorbância do Padrão
3. Colesterol HDL (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator

3.6.3 Determinação da concentração plasmática dos triacilglicerol

Trata-se de um método enzimático, específico para quantificação de triacilglicerol (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). No presente método, os triacilglicerol do plasma são hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinoneimina), com máximo de absorbância em 505 nm. Para a dosagem dos triacilglicerol, foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos:
1.Triglicérides (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 200
2.Fator de calibração = 200 ÷ Absorbância do Padrão
3.Triglicérides (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator
4.Triglicérides (mmol/L) = mg/dL x 0,0113

3.6.4 Determinação da concentração plasmática do VLDL e LDL

Os valores do colesterol VLDL e colesterol LDL foram obtidos pela equação de Friedewald et al. (1972):

VLDL (mg/dL) = (Triacilglicerol (mg/dL) / 5)

LDL (mg/dL) = Colesterol total – (Colesterol HDL + Colesterol VLDL)

3.7 Determinação de citocinas

3.7.1 Concentração plasmática de fator de necrose tumoral-α (TNF-α)

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

3.7.2 Concentração plasmática de interleucina-6 (IL-6)

A concentração (pg/mL) plasmática de IL-6 foi determinada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com a utilização de kits, seguindo as instruções dos fabricantes. O kit comercial utilizado foi BD Biosciences, San Diego, EUA; Biovedor, Heidelberg, Alemanha. A absorbância foi determinada em 570 nm.

3.8 Determinação do íon flúor

3.8.1 Concentração de flúor no plasma

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 3 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 seja reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição de ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO_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, foram colocados 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 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Tecnal, modelo TE 141) em velocidade 2-3, por 12 horas. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 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, Cambrige, Mass., USA, modelo 9409) e um microeletrodo de referência calomelano (Accumet, #13-620-79) unidos e acoplados ao potenciômetro (Orion Research, modelo EA 940), que expressou a concentração de flúor em milivolts (mV).

3.8.2 Concentração de flúor no osso

Os ossos foram calcinados em mufla a 600°C por 6 horas. Após este processo, as cinzas foram pesadas e a análise de flúor foi feita após difusão facilitada por HMDS (hexametil-disiloxano), pelo método de (TAVES, 1968) modificado por (WHITFORD, 1996). Para isso, alíquotas de 0,005 g foram colocadas em placas de Petri plásticas 60 x 15 mm (J Prolab), em seguida foi adicionado 2,1 mL de água deionizada. Na tampa das placas, foram colocados 50µL de NaOH

0,05M, distribuídos em 5 gotas. As placas foram fechadas e vedadas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa adicionou-se HMDS (Aldrich, 2,0 mL, em acido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente vedado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana em velocidade 7- 8, “overnight”. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram agrupadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25μL de acido acético 0,2 M. O volume total foi ajustado para 75 μL com água deionizada usando uma pipeta. A gota que deveria conter todo o flúor do osso foi analisada utilizando-se eletrodo íon especifico 9409BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referencia (Calomelano), acoplado a um analisador de íons Orion 720 A (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA). Padrões de fluoreto foram preparados a partir de uma solução de estoque de 0,1M F. As leituras dos padrões foram feitas em triplicata. A curva de calibração apresentou slope entre -54 e -62 mV e coeficiente de variação da leitura dos padrões entre ±3,0. As leituras das amostras (mV), foram realizadas em duplicata, e posteriormente transformadas em μgF/mL.

3.9 Análises das estruturas ósseas

3.9.1 Análise histomorfométrica

Para a obtenção das lâminas histológica, seis animais de cada grupo, foram selecionados aleatoriamente. As tíbias direitas dos animais foram recolhidas imediatamente após o período de tratamento, fixada em formalina neutra a 4% por 48 horas, descalcificado em solução de (PLANK; RYCHLO, 1952). Série de fatias com 3 μm de espessura foram feitas sobre os aspectos mésio-distais das tíbias direitas e coradas com hematoxilina e eosina como segue:

Desidratação/Diafanização:

Alcool 70% - 1 hora
Alcool 80% - 1 hora
Alcool 95% - 1 hora
Alcool 100% - 1 hora
Alcool 100% - 1 hora
Alcool 100% - 1 hora
Alcool 100%/Xilol - 1 hora
Xilol – 1 hora
Xilol – 1 hora
Xilol – 1:30 horas

Impregniação:

Parafina I – 1 hora
Parafina II – 1 hora
Parafina III – 2 horas

Coloração:

Hematoxilina
Eosina

Seções equidistantes de cada amostra foram selecionadas e fotografadas usando uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz. Foram obtidas imagens contendo metáfise proximal da tíbia. A análise foi realizada por um “software” de domínio público “Image J” sistema de análise de imagem “IMAGE”. Os parâmetros histomorfométricos ósseos seguintes foram medidas: B.Ar, área de osso esponjoso (mm^2); Tb.N, número de trabéculas; e Tb.Wi, largura trabecular (MCM). Todas as nomenclaturas, símbolos e unidades de histomorfometria óssea foram expressos como recomendado pela American Society for Bone and Mineral Research Histomorphometry - Comissão da Nomenclatura (DEMPSTER *et al.*, 2013).

3.9.2 Densitometria óssea

A densidade mineral óssea – DMO (g/cm^2) e o conteúdo mineral ósseo – CMO (g) foram medidos nas tíbias direitas dos animais, utilizando densitômetro modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP.

3.9.3 Ensaio biomecânico – resistência à flexão em três pontos

O ensaio foi realizado no departamento de Materiais Dentários da FOA/Unesp - Araçatuba. A carga foi aplicada a uma velocidade de 5 mm/min e registrada automaticamente pelo sistema computacional pertencente a máquina universal de ensaio EMIC®, modelo DL 3000*. Todos os ensaios foram realizados em condições semelhantes. A análise biomecânica foi avaliada, por meio da curva de força X deslocamento, a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo, força na ruptura e a deflexão na força máxima. A distância do vão de apoio foi de 20 mm, a célula de carga utilizada será de 2000N.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± EPM, com recurso do "software" estatístico GraphPad Software, Inc. [Prisma 5.01], 2007.

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, exceto o peso corpóreo, ingestão de ração, ingestão hídrica e análise do sinal insulínico que foram realizadas pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey-Kramer. O nível de significância adotado foi de 5% (alpha = 5%).

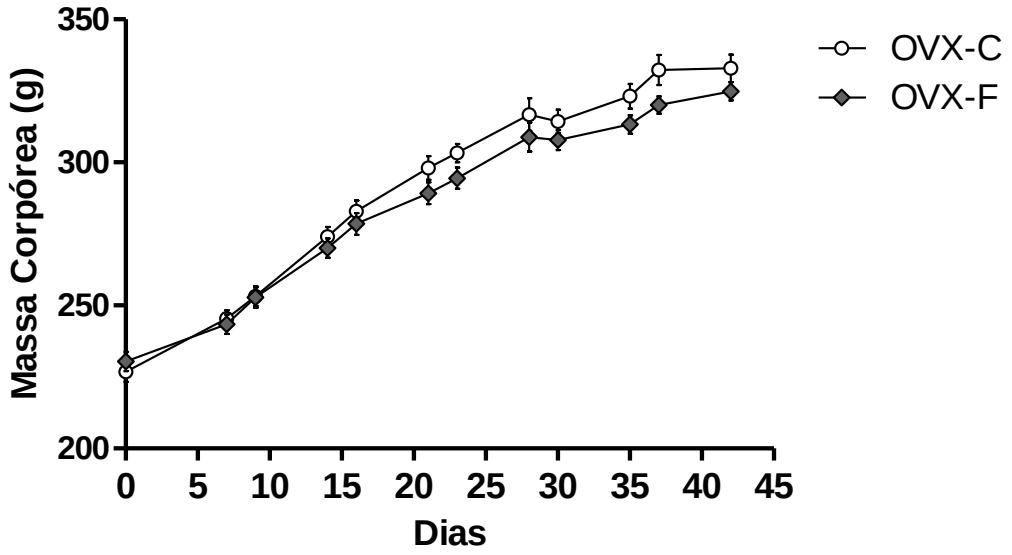
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Massa corpórea (g)

O resultado da massa corpórea dos grupos controle (OVX-C) e tratado com fluoreto de sódio (OVX-F) estão ilustrados na Figura 3. Os resultados deste parâmetro mostram que o tratamento com fluoreto de sódio (50mg/L), durante 42 dias, não promoveu diferença estatística entre o grupo OVX-F e o grupo OVX-C.

FIGURA 3 - 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 ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais.

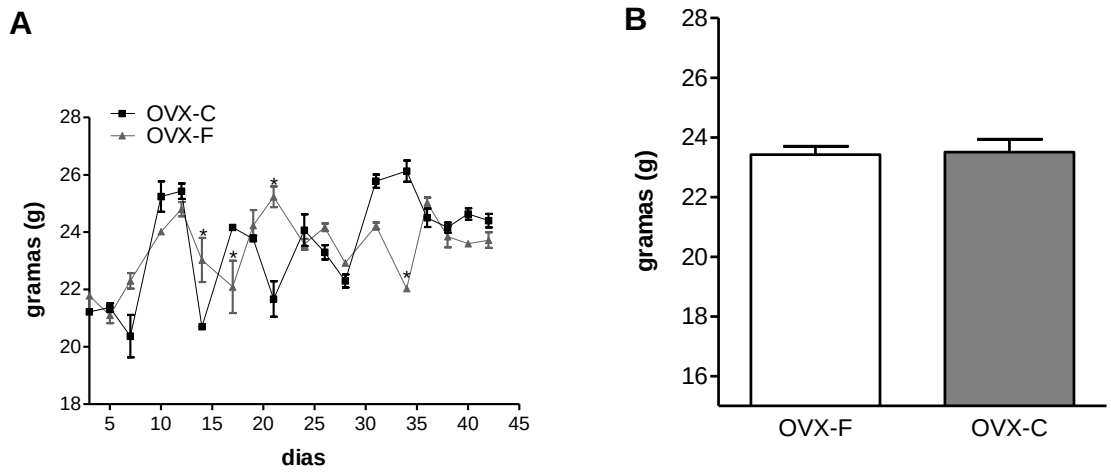


Fonte: Autor

4.2 Ingestão alimentar (g)

A figura 4A mostra a média ingestão alimentar dos grupos OVX-C e OVX-F durante 42 dias. Neste período observou-se diferença entre os dois grupos nos dias 14 (OVX-C = 20,70±0,09g vs OVX-F = 23,03±0,08g), 17 (OVX-C = 24,16±0,08g vs OVX-F = 22,09±0,09g), 21 (OVX-C = 21,67±0,62g vs OVX-F = 25,23±0,36g) e 34 (OVX-C = 26,13±0,37g vs OVX-F = 22,03±0,07g). Também foi calculada a média da ingestão alimentar, por rato, de todas as aferições realizadas ao longo dos 42 dias nos grupos OVX-C e OVX-F (Figura 4B); e observou-se que o tratamento com fluoreto de sódio (50 mg/L) não promoveu alteração na ingestão alimentar dos animais (OVX-F = 23,4 ± 0,4 g vs OVX-C = 23,4 ± 0,2 g).

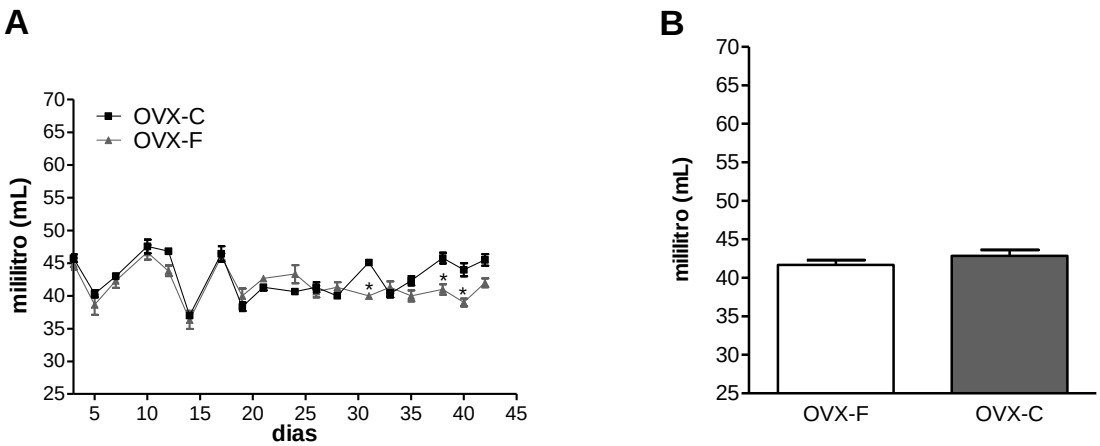
FIGURA 4 - Ingestão alimentar de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores estão apresentados como Média ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais.



4.3 Ingestão hídrica (mL)

A figura 5A mostra a média ingestão hídrica dos grupos OVX-C e OVX-F durante 42 dias. Neste período observou-se diferença entre os dois grupos nos dias 31 (OVX-C = 45,13±0,31mL vs OVX-F = 40,0±0,44mL), 38 (OVX-C = 45,80±0,82mL vs OVX-F = 41,0±0,80mL) e 40 (OVX-C = 44,0±1,0mL vs OVX-F = 39,0±0,5mL). Também foi calculada a média da ingestão hídrica, por rato, de todas as aferições realizadas ao longo de 42 dias dos grupos OVX-C e OVX-F (Figura 5B); e observou-se que o tratamento com fluoreto de sódio (50 mg/L) não promoveu alteração na ingestão hídrica dos animais (OVX-F = 42,8 ± 0,8 mL vs OVX-C = 41,5 ± 0,6 mL).

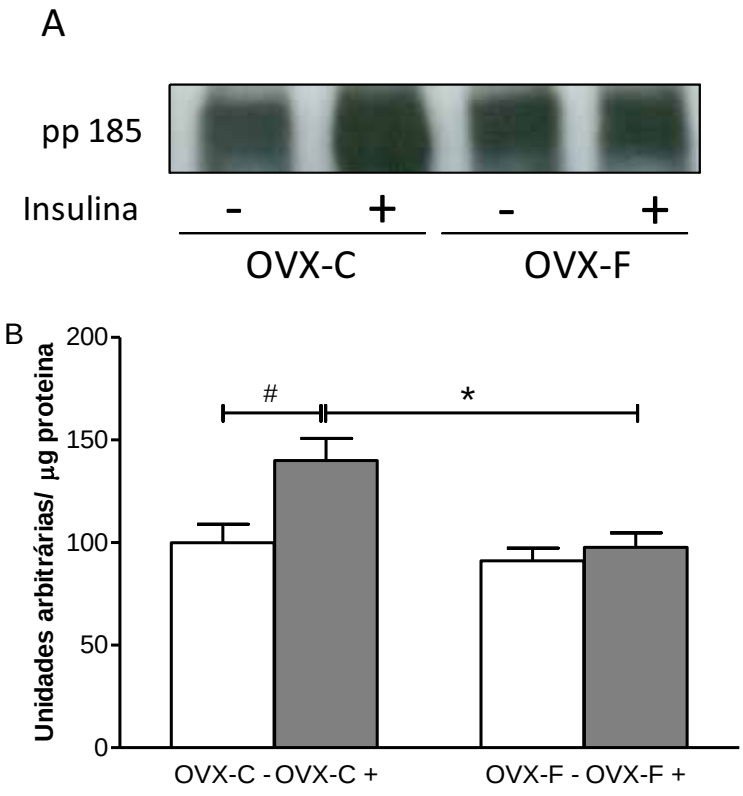
FIGURA 5 - Ingestão hídrica de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo fluoreto de sódio (OVX-F), que foi submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado na água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como Média ± EPM de 10 (OVX-C) e 10 (OVX-F) animais.



4.4 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp 185 (IRS1/IRS2) em tecido adiposo branco.

A figura 6 mostra os resultados do grau de fosforilação da tirosina pp185, no estado basal e após estímulo de insulina, em tecido adiposo branco (TAB). No grupo controle (OVX-C) houve diferença significativa (#p<0,05) após estímulo insulínico. Observou-se diminuição (*p<0,05) no grau de fosforilação da pp185, após o estímulo de insulina, no grupo OVX-F em relação ao grupo OVX-C.

FIGURA 6 - Efeito do estímulo insulínico sobre a fosforilação da pp185, em tecido adiposo branco (TAB) 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) durante 42 dias. Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE e processadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Em B, o grau de fosforilação da pp185, após estímulo insulínico, foi expresso em unidades arbitrárias por µg de proteína amostrada. Valores são apresentados como Média ± EPM de 6 experimentos. #p<0,05 OVX-C (-) vs. OVX-C (+); *****p <0,05 OVX-C (+) vs. OVX-F (+).



Fonte: Autor

4.5 Avaliação da glicemia, da insulinemia e da resistência à insulina (pelo índice HOMA-IR e pelo teste de tolerância à insulina)

Conforme observado na Tabela 1, as ratas OVX-F não exibiram alterações nas concentrações plasmáticas de glicose, entretanto observou-se aumento significativo nas concentrações plasmáticas de insulina ($p<0,05$). A partir desses valores, calculou-se o índice HOMA-IR (HOMA-IR = nível de glicose em jejum (mmol/L) × nível de insulina em jejum (μUI/mL)/22,5). Constatou-se que o valor do índice de HOMA-IR foi significativamente maior no grupo OVX-F ($p<0,05$).

O grupo OVX-F apresentou uma velocidade de desaparecimento de glicose (Kitt) significativamente menor em relação ao grupo OVX-C.

TABELA 1 - Concentração plasmática de glicose e insulina; índice HOMA-IR; teste de tolerância à insulina (ITT) de ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C).

PARÂMETROS	**OVX-C**	**OVX-F**
Glicemia (mmol/L)	6,86 ± 0,18	6,77 ± 0,23
Insulinemia (μU/mL)	10,83 ± 2,11	18,03 ± 1,79*
HOMA-IR	3,30 ± 0,64	5,62 ± 0,51*
K_{itt} (%/min)	3,80 ± 0,80	1,90 ± 0,30*

Valores expressos como média ± EPM, n=10. *p<0,05

Fonte: Autor

4.6 Avaliação da concentração plasmática de triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol VLDL

Conforme observado na tabela 2, as ratas OVX-F apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de triglicérides e no colesterol VLDL em comparação ao grupo OVX-C. O tratamento com fluoreto de sódio (50mg/L) não promoveu alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL entre os grupos.

TABELA 2 - Concentração plasmática (mg/dL) de colesterol total, triglicérides, colesterol HDL, colesterol VLDL e colesterol LDL de ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C).

PARÂMETROS (mg/dL)	OVX-C	OVX-F
Colesterol Total	90,98 ± 2,71	92,85 ± 3,29
Triglicérides	88,63 ± 2,93	99,80 ± 3,93*
HDL	45,21 ± 0,73	45,54 ± 1,03
VLDL	17,73 ± 0,58	19,96 ± 0,78*
LDL	28,95 ± 2,72	26,00 ± 3,08

Valores expressos como média ± EPM, n=10. * <0,05

Fonte: Autor

4.7 Avaliação da concentração plasmática de TNF-α e IL-6

Conforme observado na Tabela 3, as ratas tratadas cronicamente com NaF apresentaram um aumento significativo na concentração plasmática de TNF-α e IL-6 em relação ao grupo controle.

TABELA 3 – Concentração plasmática (pg/mL) de TNF-α e IL-6 de ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com NaF (OVX-F) e grupo controle (OVX-C).

PARÂMETROS (pg/mL)	OVX-C	OVX-F
TNF-α	6,00 ± 0,19	6,97 ± 0,41*
IL-6	28,70 ± 0,58	32,71 ± 1,64*

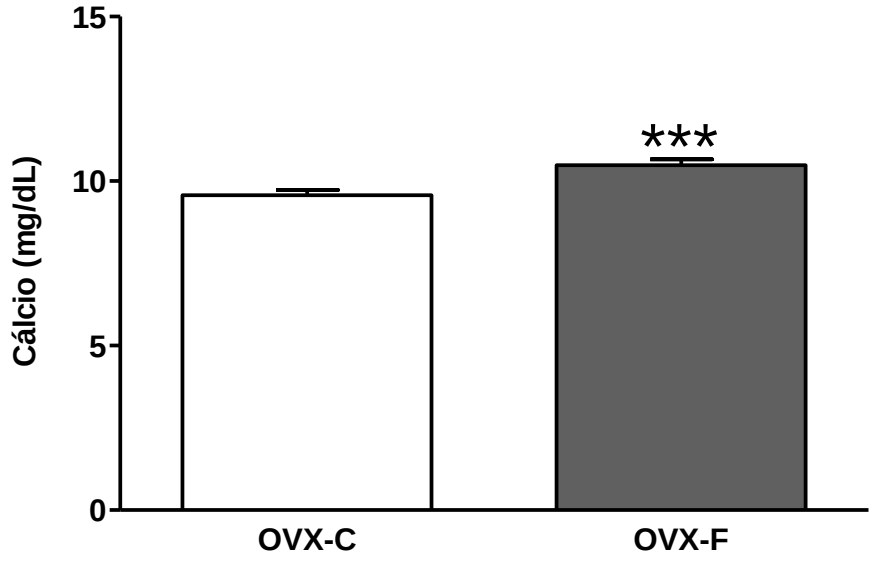
Valores expressos como média ± EPM, n=10. *p<0,05

Fonte: Autor

4.8 Avaliação da concentração plasmática de cálcio

Conforme demonstrado na figura 7, observou-se que o tratamento com NaF foi capaz de promover aumento significativo na concentrações plasmáticas de cálcio do grupo OVX-F (10,49 ± 0,15 mg/dL), em relação ao grupo OVX-C (9,57 ± 0,15 mg/dL).

FIGURA 7 - Concentração plasmática de cálcio em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando ***p<0,001.

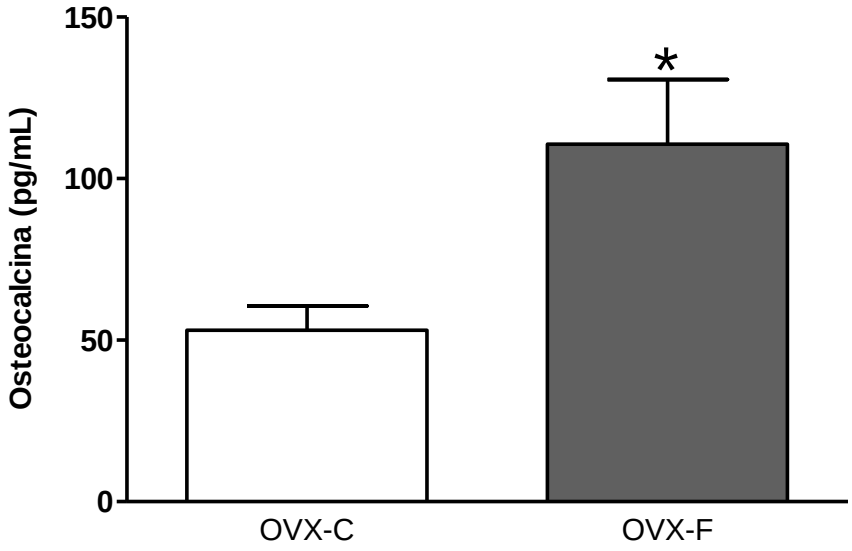


Fonte: Autor

4.9 Avaliação da concentração plasmática de osteocalcina

Na figura 8 observou-se que o tratamento com NaF foi capaz de promover aumento significativo na concentrações plasmáticas de osteocalcina do grupo OVX-F (110,70 ± 20,00 pg/mL), em relação ao grupo OVX-C (53,08 ± 7, 51 pg/mL).

FIGURA 8 - Concentração plasmática de osteocalcina em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando *p<0,05.



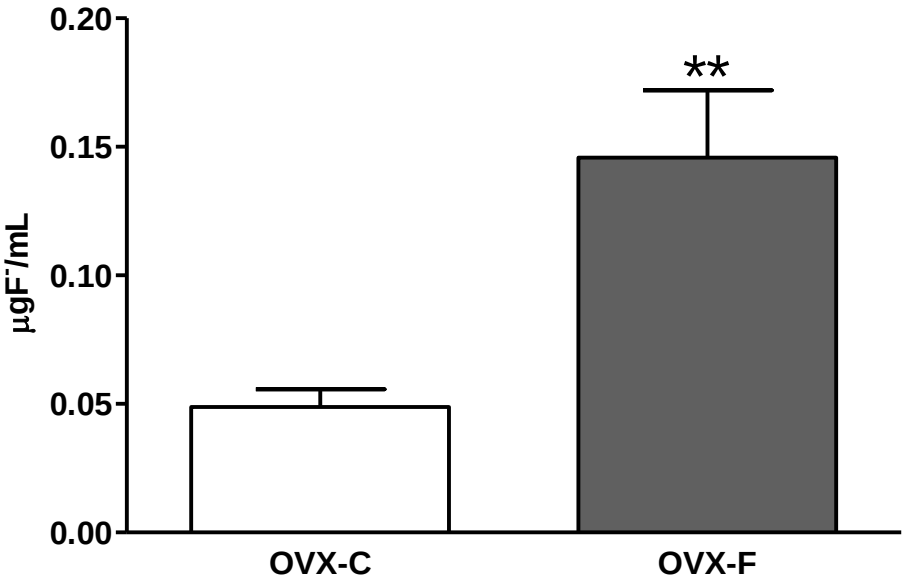
Fonte: Autor

4.10 Análise da concentração do íon flúor

4.10.1 Avaliação da concentração plasmática de flúor

Na figura 9 observa-se que o tratamento com NaF foi capaz de promover aumento significativo na concentrações plasmáticas de flúor do grupo OVX-F (0,14 ± 0,02 μg/F⁻mL), em relação ao grupo OVX-C (0,04 ± 0,006 μg/F⁻mL).

FIGURA 9 - Concentração plasmática de flúor em ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando **p<0,05.

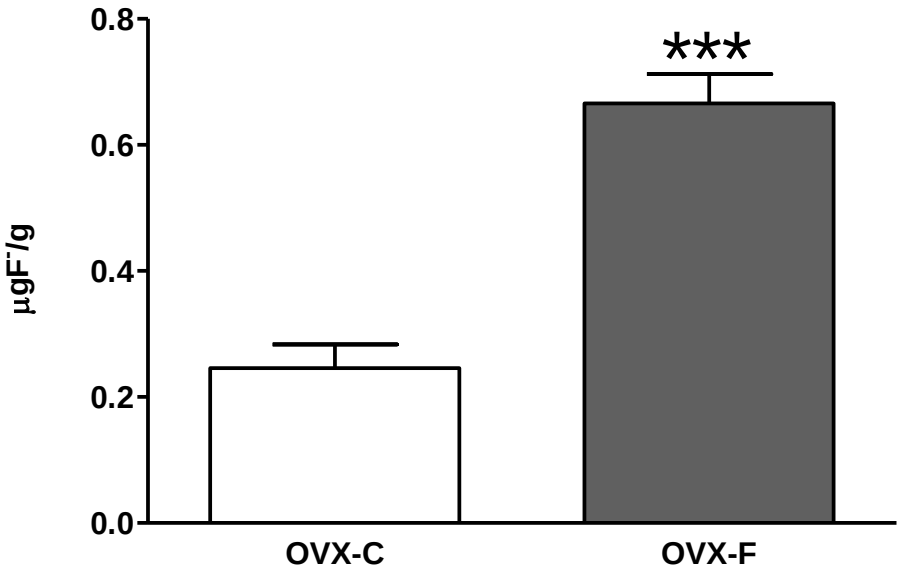


Fonte: Autor

4.10.2 Avaliação da concentração de flúor no osso

A concentração de flúor em tíbias das ratas tratadas cronicamente com NaF é significativamente maior que seu controle. Na figura 10 observa-se que o tratamento com NaF foi capaz de promover aumento significativo na concentração de flúor no grupo OVX-F (0,66 ± 0,04 $\mu gF^-/g$), em relação ao grupo OVX-C (0,24 ± 0,03 $\mu gF^-/g$).

FIGURA 10 - Concentração de flúor em tíbias de ratas ovariectomizadas do grupo controle (OVX-C) e do grupo (OVX-F) submetido ao tratamento com NaF (50 mg/L) administrado em água de beber durante 42 dias. Os valores são apresentados como média ± EPM, n=10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando ***p<0,0001.

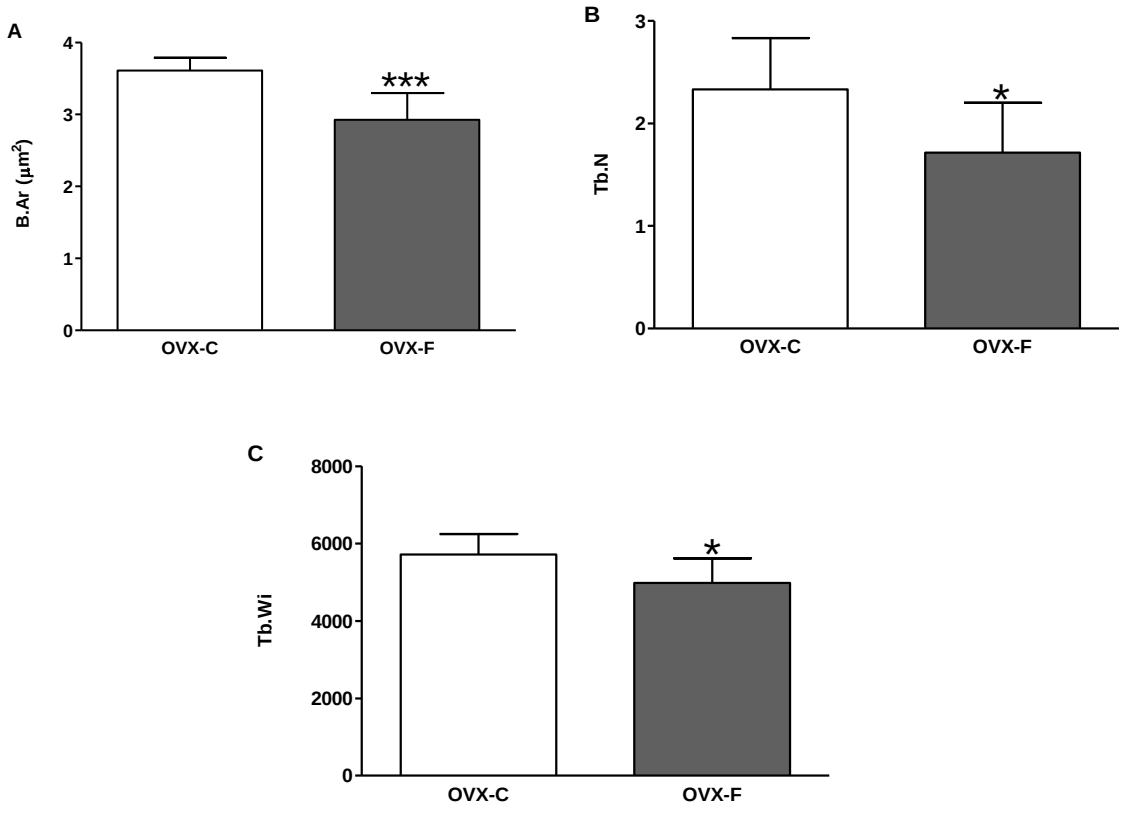


Fonte: Autor

4.11 Análise morfométrica

Na análise morfométrica, os gráficos da figura 11 representam em: A) área óssea (B.Ar em μm^2); B) o número de trabéculas por área (Tb.N) e C) média da espessura das trabéculas (Tb.Wi). Os resultados demonstram diminuição significativa em todos os parâmetros analisados no grupo OVX-F quando comparado ao grupo OVX-C. B.Ar (OVX-F = 2,93 ± 0,14 μm^2 vs OVX-C = 3,61 ± 0,06 μm^2); Tb.N (OVX-F = 1,71 ± 0,18 vs OVX-C = 2,33 ± 0,16) e Tb.Wi (OVX-F = 4984 ± 238,9 vs OVX-C = 5717 ± 217,7).

FIGURA 11 - Propriedades microestruturais da metáfise proximal tibial de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio (50mg/L) administrado em água de beber nos seguintes grupos: controle (OVX-C) e tratado (OVX-F). Os parâmetros ósseos morfométricos representados são (A) da área do osso esponjoso (B.Ar), (B) número trabecular (Tb.N) e (C) espessura trabecular (Tb.Wi). Os resultados são apresentados como a média ± EPM, n = 6 Valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos.

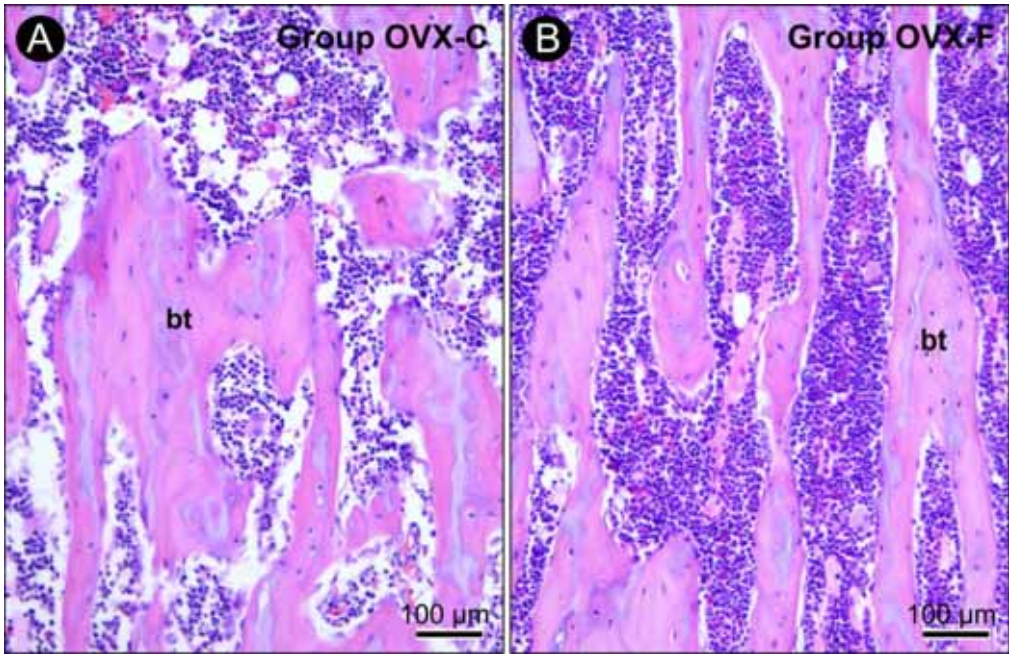


Fonte: Autor

4.12 Análise histológica

Análise histológica (figura 12) representa em: A) ratas OVX-C e B) ratas OVX-F. A análise qualitativa revela diminuição da espessura trabecular no grupo tratado com fluoreto de sódio e aumento do espaço entre as trabéculas ósseas.

FIGURA 12 - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo esponjoso na metáfise tibial no grupo controle (A) e no grupo tratado com flúor (B). Abreviações e símbolos: **bt**, trabécula óssea. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 250x. Barras de escala: 100 µm.



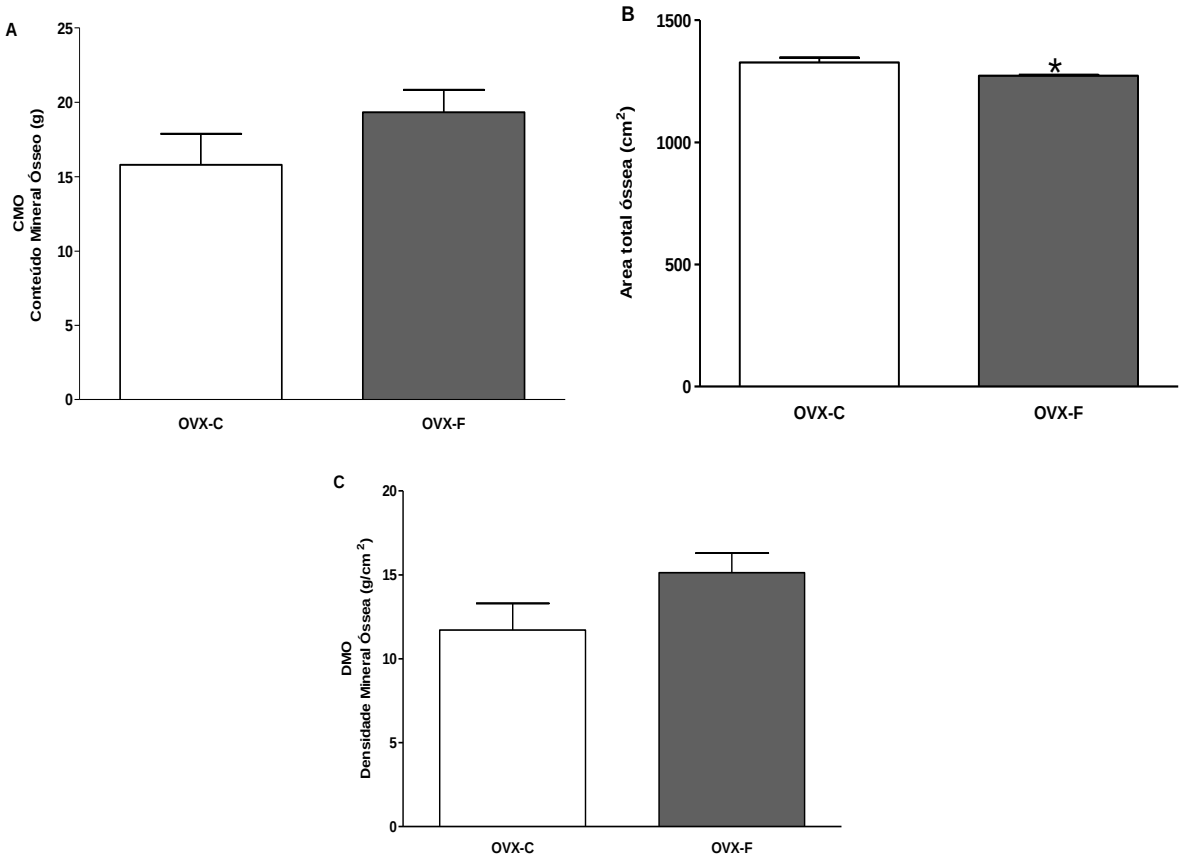
Fonte: Autor

4.13 Ensaio biomecânico

4.13.1 Densitometria óssea

Na densitometria óssea (Figura 13) realizada após o período de 42 dias de tratamento com fluoreto de sódio, observou-se que o valor da área total óssea das tíbias foi significativamente menor no grupo OVX-F (1273 ± 4,0 cm^2) em comparação com o grupo OVX-C (1328 ± 18.72 cm^2). Por outro lado à dose de 50mg/L de fluoreto de sódio, não promoveu alterações na densidade mineral óssea (OVX-F= 15,13 ± 1,17 g/cm^2 vs OVX-C=11,71 ± 1,58 g/cm^2) e conteúdo mineral ósseo (OVX-F= 19,33 ± 1,49 g vs OVX-C= 15,80 ± 2,08 g).

FIGURA 13 - Análise da densidade mineral óssea por emissões de dupla absorção de raios-X (DXA) do grupo controle (OVX-C) e do grupo tratado com fluoreto de sódio (OVX-F). (A) conteúdo mineral ósseo (g), (B) área total (cm^2) e (C) densidade mineral óssea (g/cm^2). Os resultados foram apresentados como média ± EPM, n = 10. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando *p<0,05.

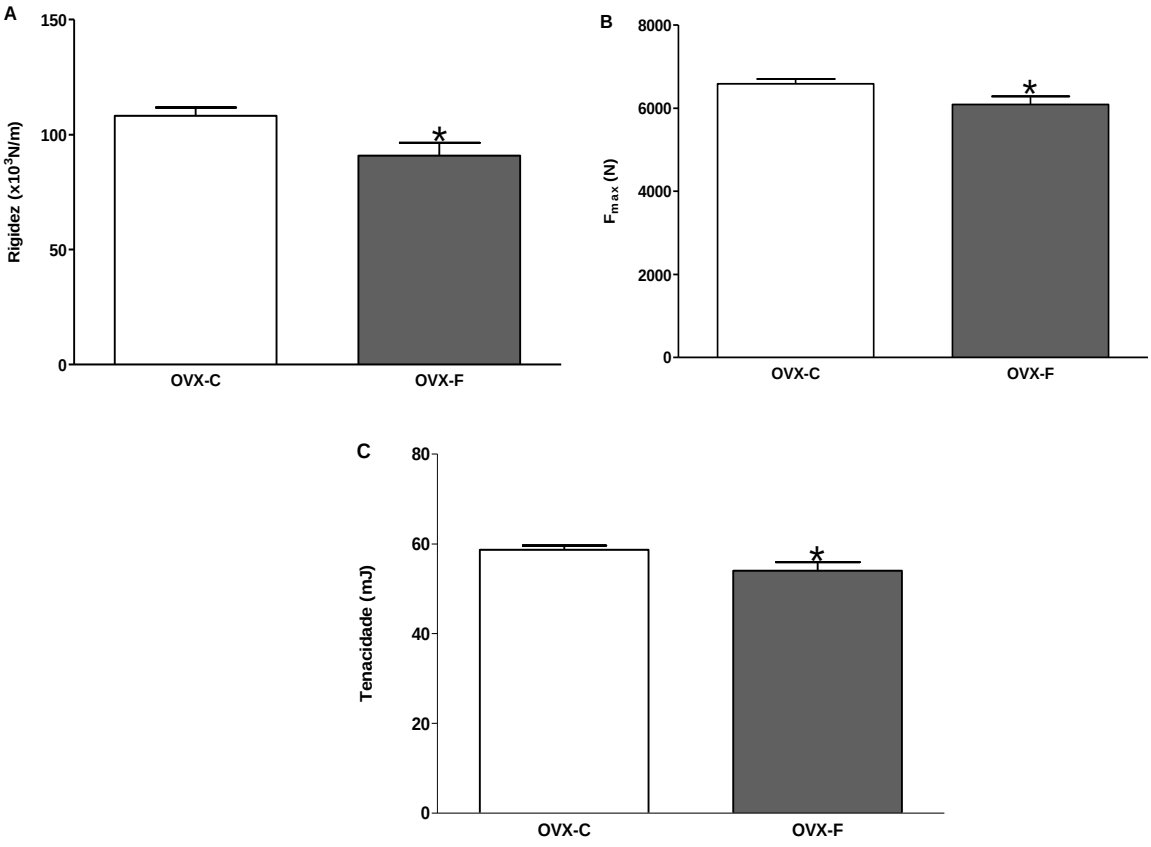


Fonte: Autor

4.13.2 Ensaio de flexão em 3 pontos

A Figura 14 mostra os valores de rigidez (A), força máxima (B) e tenacidade (C), obtidos por ensaio de resistência à flexão em três pontos realizados nas tíbias dos animais estudados. Foram observados valores significativamente menores na rigidez (OVX-F = 90,90 ± 5,61 $x10^{-3}$N/m vs. OVX-C = 108,10 ± 3,76 $x10^{-3}$N/m), força máxima - $F_{máx}$ (OVX-F = 6088 ± 197,50 N vs. OVX-C = 6592 ± 108,0 N) e tenacidade (OVX-F = 54,0 ± 1,92 mJ vs. OVX-C = 58,68 ± 0,95 mJ) no grupo OVX-F em comparação ao grupo controle (OVX-C).

FIGURA 14 - Propriedades biomecânicas das tíbias de ratas ovariectomizadas avaliadas por meio de teste de flexão em três pontos, nos grupos controle (OVX-C) e tratadas com fluoreto de sódio (OVX-F). São mostrados nos gráficos (A) rigidez extrínseca ($x10^{-3}$ N/m), (B) $F_{máx}$ - força máxima (N), e (C) tenacidade (mJ). Os resultados são apresentados como a média ± EPM, n = 10. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando *p <0,05.



Fonte: Autor

Discussão

5 DISCUSSÃO

O tratamento crônico com NaF (50mg/L) na água de beber durante 42 dias, promoveu resistência à insulina e alterações no sinal insulínico e nas propriedades ósseas das tíbias de ratas ovariectomizadas (OVX).

Pesquisas evidenciam que o flúor exerce efeitos importantes sobre a estrutura óssea, atuando como um agente anabólico capaz de aumentar o número de osteoblastos, proporcionando aumento da massa óssea (CARVALHO, 2005). Semelhantemente, a insulina atua como um agente anabólico para os ossos (VIRKAMÄKI et al., 1999) e também desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase glicídica, no crescimento e na diferenciação celular (CARVALHEIRA et al., 2002).

Sabe-se que a massa corporal pode influenciar a densidade óssea (NASCIMENTO et al., 2009) e o metabolismo glicídico (ROCHA et al., 2010). Os resultados do presente estudo revelaram que o tratamento com NaF não promoveu diferença na massa corporal em relação ao grupo controle (Figura 3). Esses resultados corroboram os estudos de Søgaard et al. (1997) e Chiba et al. (2010), que não observaram diferença no peso corporal de ratas OVX e ratos machos castrados, respectivamente tratados com doses variadas de NaF, sugerindo que o tratamento com fluoreto não interferiu neste parâmetro. Além disso, os resultados do presente trabalho não revelaram diferenças em relação à ingestão hídrica e de ração entre os grupos (Figuras 5 e 4).

O presente estudo revelou que o tratamento crônico com fluoreto de sódio em ratas OVX promoveu diminuição do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido adiposo branco, promovendo diminuição do sinal insulínico (Figura 6), conforme citado anteriormente. Estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, utilizando outra dose de NaF (4,0 mg F/kg p.c./dia), também observaram em ratos machos castrados que a ingestão crônica de NaF promoveu a redução no grau de fosforilação em tirosina da pp 185 em tecido muscular e adiposo, resultando na diminuição do sinal insulínico nestes tecidos (CHIBA et al., 2010, 2012). Estas respostas sugerem que o fluoreto pode ocasionar resistência à insulina, pois vários autores correlacionaram resistência à insulina com a diminuição do sinal insulínico (CHIBA, *et al.*, 2010; CHOU *et al.*, 1987; EBINA *et al.*, 1987; KASUGA *et al.*, 1982).

Adicionalmente, estudos “in vitro” de VIÑALS *et al.* (1993) relataram a ação inibitória do flúor sobre a atividade tirosina-quinase dos receptores de insulina de tecido muscular de ratos e placenta humana. Em pacientes com DM2, que tem como característica principal a resistência à insulina, também foi evidenciada alteração na atividade tirosina-quinase do receptor de insulina em músculo esquelético e fígado (CARO et al., 1986, 1987).

O tratamento com NaF promoveu aumento das concentrações plasmáticas de insulina no grupo OVX-F (Tabela 1), porém não foi observado diferença na glicemia entre os grupos. Este aumento da insulinemia pode ser decorrente de uma resposta do organismo à diminuição na captação de glicose pelas células, devido à resistência à insulina, tornando-se necessário aumentar a produção de insulina pelo pâncreas para manter a concentração de glicose sérica normal. A partir dos valores da insulinemia e glicemia, foi calculado o índice HOMA-IR, que expressa a resistência à insulina (quanto maior for o valor deste índice, maior será a resistência hormonal). O valor desse índice foi maior no grupo OVX-F em relação ao OVX-C, demonstrando que o tratamento com NaF promoveu resistência à insulina.

A avaliação da sensibilidade insulínica pode ser avaliada tanto pelo índice HOMA-IR como também pelo teste endovenoso de tolerância à glicose (ITT). Por meio deste teste obteve-se a constante de decaimento da glicose (Kitt) da qual se pôde avaliar a sensibilidade à insulina e quanto menor o valor desta constante, maior será a resistência à insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006). O resultado do presente estudo demonstra que o Kitt no grupo OVX-F encontra-se diminuído em comparação ao seu controle (Tabela 1), evidenciando novamente que o grupo OVX-F apresenta maior resistência à insulina.

No DM2, a hiperinsulinemia e a resistência à insulina estão associadas com o aumento da densidade óssea, mas com diminuição da resistência óssea, contribuindo para um aumento do risco de fraturas ósseas (THRAILKILL *et al.*, 2005).

Estudos realizados com camundongos “*knockout”* para receptores de insulina em osteoblastos indicam menor formação óssea, atribuída a ausência de expressão de Runx2 (fator de transcrição 2 relacionado ao runt - gene essencial para a diferenciação osteoblástica), e redução da concentração plasmática de osteocalcina descarboxilada. Nestes animais a menor formação óssea foi evidenciada pela

diminuição do volume trabecular e do número de osteoblastos (FULZELE *et al.*, 2010).

Estados de resistência à insulina são normalmente associados com dislipidemia aterogênica que contribui para um maior risco de aterosclerose e doença cardiovascular (AVRAMOGLU et al., 2006). Os resultados do presente estudo revelaram que o tratamento com NaF promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol e colesterol VLDL (Tabela 2).

Estudos realizados com homens normoglicêmicos com resistência à insulina mostraram que a síntese de colesterol encontra-se aumentada e a absorção do colesterol diminuída. A resistência à insulina e diabetes tipo 2 (DM2) têm sido constantemente associada com altas concentrações plasmática de triglicérides e baixas concentrações plasmáticas de colesterol HDL. O aumento da síntese de VLDL no fígado parece ser a principal causa do aumento das concentrações de lipoproteínas ricas em triacilglicerol. Este excesso de VLDL e de triacilglicerol no fígado está associado com níveis elevados de ácidos graxos livres no plasma em pacientes com resistência à insulina (PIHLAJAMÄKI *et al.*, 2004).

Os distúrbios do metabolismo dos carboidratos e lipídios coexistem na maioria dos indivíduos portadores de "síndrome metabólica". O componente mais importante nestes pacientes é a diminuição da captação de glicose estimulada pela insulina. A resistência à insulina parece causar hiperinsulinemia, gliconeogênese hepática e produção de glicose aumentada, redução da supressão da lipólise no tecido adiposo o que leva a um alto fluxo de ácidos graxos livres e aumento de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) causando redução nas concentrações plasmáticas de lipoproteína de alta densidade - HDL (AVRAMOGLU et al., 2006).

Estudos em ratos obesos por dieta hiperlipídica demonstraram diminuição da massa óssea e aumento da sua reabsorção, avaliada por meio da diminuição dos marcadores de formação óssea (osteocalcina e Runx2) e aumento da expressão de PPAR-γ (receptor ativado por proliferadores de peroxisomas gama), regulador para diferenciação de adipócitos (CHEN et al., 2010).

Graham et al. (2010), mostraram que em ratos alimentados com dieta de alto teor de gordura desenvolveram osteopenia, investigaram o envolvimento dos linfócitos T de medula óssea desses animais “in vitro” e observaram aumento de várias citocinas entre elas TNF-α, IL-6 e RANKL. A partir destes resultados eles

sugeriram que os linfócitos T desempenham um papel chave na osteoclastogênese induzida por dieta de elevado teor de gordura e pode contribuir para a perda óssea associada com osteopenia.

Os adipocitos produzem e secretam hormônios coletivamente chamados adipocinas como o TNF-α, que podem influenciar o metabolismo energético (CARVALHEIRA et al., 2002) e o metabolismo ósseo (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Os resultados deste trabalho mostraram que a concentração plasmática de TNF-α e IL-6 de ratas ovariectomizadas tratadas com NaF foram maiores comparado ao grupo controle (Tabela 3).

Estudos demonstraram que o tratamento de NaF em ratos machos castrados promoveu resistência à insulina e aumentou a concentração plasmática do TNF-α (CHIBA *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo estão de acordo com resultados de Chiba et al. (2012), de modo que o tratamento de NaF em ratas OVX promoveu aumento da concentração plasmática do TNF-α e apresentou quadro de resistência à insulina.

Em adipócitos de animais e humanos obesos, hiperexpressam TNF-α em quantidades que se correlacionam positivamente com o índice de massa corporal (IMC) e insulinemia. Em contraste a redução do peso corporal diminui a expressão de TNF-α (CARVALHEIRA et al., 2002). Peraldi e Spiegelman (1998) propuseram que o TNF-α pode alterar a transmissão do sinal insulínico por meio do aumento da fosforilação em serina do IRS-1. O IRS-1 fosforilado em serina inibe a atividade tirosino-quinase do receptor de insulina, reduzindo assim a sinalização insulínica (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

O TNF-α estimula a reabsorção óssea “in vivo” e “in vitro” (THOMSON et al., 1987) e induz a expressão de RANKL em osteoblastos (FULLER *et al.*, 2002; HOFBAUER *et al.*, 1999; HORWOOD *et al.*, 1998). Esta citocina está associada com a perda óssea que acompanha várias doenças inflamatórias (CENCI *et al.*, 2000; FULLER *et al.*, 2002) como perda óssea na periodontite e outras formas de osteólise inflamatória (BIRKEDAL-HANSEN, 1993), e resistência à insulina (FEINSTEIN *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994).

Na obesidade os macrófagos produzem concentrações elevadas de TNF-α e IL-6 que promovem a atividade dos osteoclastos levando à reabsorção óssea (KOBAYASHI *et al.*, 2000). O IL-6 é uma citocina que pode afetar a massa óssea.

Sua expressão crônica aumenta a remodelação óssea e provoca perda de massa óssea pelo aumento de sua reabsorção (DE BENEDETTI *et al.*, 2006; RUFO et al*.*, 2011).

Estudos “in vitro” demonstraram que o IL-6 induziu inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose. “In vivo” esta citocina induz alterações metabólicas encontradas em estados catabólicos, aumentando as concentrações plasmáticas de glicose (CARVALHO, 2006). Os níveis séricos de IL-6 são baixos em condições fisiológicas. No entanto, sua produção é regulada por vários fatores como dieta, exercício, stress entre outros. A IL-6 também aumenta a atividade do estradiol 17 β-hidroxiesteróide desidrogenase, inibindo atividade anti-osteoclastogênica do estrógeno, promovendo osteólise e hipercalcemia (ARA; DECLERCK, 2010).

Os resultados do presente estudo revelou aumento nas concentrações plasmáticas de cálcio no grupo OVX-F em comparação ao controle. Sabe-se que em mulheres, a osteoporose está associada à menopausa (diminuição de estrógenos) que acelera a perda óssea. Além disso, a doença pode apresentar outras causas (mecânicas, genéticas e nutricionais) sendo o cálcio o componente nutricional importante (BEDANI; ROSSI, 2005). Existem outros mecanismos que podem levar à hipercalcemia como aumento da reabsorção óssea e da absorção intestinal de cálcio e diminuição da excreção renal de cálcio (MARTIN; KAYATH, 1999).

Recentemente, o cálcio foi correlacionado como um marcador de reabsorção óssea associado à alta ingestão de sódio. Park *et al.* (2014) avaliou 86 mulheres na pós-menopausa que foram inicialmente diagnosticadas com osteopenia ou osteoporose. Estes autores demonstraram uma correlação entre o consumo elevado de sódio e altos níveis de excreção de cálcio por meio da urina. Além disso, demonstraram correlação entre excreção urinária de cálcio e o marcador da reabsorção óssea por meio da proteína telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-I), que é produto da degradação do colágeno tipo I.

Estudos realizados com cultura de osteoblastos (MC3T3-E1) tratada com fluoreto e cálcio demonstraram que canais de cálcio tipo L desempenham um papel importante na homeostase deste mineral, pois afetam a expressão osteogênica de fatores de transcrição como, ativador de proteína 1 (AP-1), fator de transcrição 2 relacionado com runt (Runx2) e osterix (OSX) em osteoblastos expostos em baixa concentração (2,0mg/L) de flúor. Estes resultados sugerem que a regulação da expressão ou da atividade dos canais de cálcio tipo L pode regular a sinalização de

cálcio em células ósseas e a modulação destes canais pode influenciar a remodelação óssea em condições de fluorose (DUAN *et al.*, 2014).

O flúor (fluoreto de sódio e monofluorofosfato) pode ser um estimulador da formação de osso trabecular. No entanto, a dose efetiva é muito próxima da dose tóxica e há controvérsias a respeito da qualidade do osso formado, pois pode haver formação de osso fluorado que limita sua utilização. No intuito de se evitar efeitos tóxicos, o flúor pode ser administrado junto ao cálcio e à vitamina D (CAMPOS *et al.*, 2003). Conforme descrito anteriormente, o flúor além de atuar tanto no metabolismo ósseo como no metabolismo de carboidratos. E existe uma ligação entre o metabolismo energético e o metabolismo ósseo por meio da insulina (FERRON *et al.*, 2010). No contexto da interação entre osteoblastos e osteoclastos que caracterizam a remodelação óssea, a sinalização da insulina em osteoblastos interfere nesta função, favorecendo a decarboxilação da osteocalcina. Fulzele et al. (2010) observaram redução na concentração plasmática de osteocalcina decarboxilada e na massa óssea devido à diminuição da formação óssea e números insuficientes de osteoblastos em camundongos “knockout” para receptor de insulina em osteoblastos. A sinalização insulínica promove a formação óssea porque suprime a proteína 2 relacionada com twist (Twist2 - um inibidor de desenvolvimento de osteoblastos) e aumenta a expressão de osteocalcina (um mediador de sensibilidade e secreção de insulina) (FULZELE et al., 2010).

Desta forma a insulina exerce um papel fundamental entre a remodelação óssea e o metabolismo energético (FERRON *et al.*, 2010). Sabe-se que a osteocalcina é metabolizada sob ação de enzimas osteoclásticas, entretanto ela não é utilizada como marcador bioquímico de reabsorção óssea, mas como marcador de formação óssea (AVOLIO et al., 2008).

Estudos realizados por Brown et al. (1984), mostraram que as concentrações séricas de osteocalcina em pacientes com osteoporose pós-menopáusica tiveram correlação linear significativa com formação óssea, mas não com os índices de reabsorção óssea. Embora a osteocalcina esteja na matriz óssea, pequenas porções podem ganhar a circulação sanguínea e ser hidrolizadas no fígado e rim pelas metaloproteases tornando sua meia vida bastante curta (AVOLIO et al., 2008; DELMAS et al., 1983).

Ferron et al. (2010), mostraram que a sinalização da insulina em osteoblastos influencia a homeostase da glicose, estimulando a produção de osteocalcina. A

osteocalcina é uma proteína específica do osso (20% das proteínas não colagenosas) secretada pelos osteoblastos (RAIF; HARMAND, 1993). Antes de ser secretada por estas células, a osteocalcina, dependente de vitamina-K, sofre carboxilação em três resíduos de Gla (ácido γ-carboxiglutâmico) que contribui para afinidade com a matriz óssea. Devido a esses resíduos Gla a osteocalcina (OC) já foi denominada proteína óssea plasmática GLA - BGP (DELMAS et al., 1983). Huo *et al.* (2013) observaram em cultura de osteoblastos humanos, (Saos-2) expostos a doses variadas de NaF (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, e 1,6 mM) durante 24, 48 e 72 horas, um aumento na expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina nestas células somente na dose de 0,2 mM de NaF em 72h de exposição a este elemento. Estudos de Hu et al. (2012) observaram em cultura de células de calvária de ratos expostas a doses baixas de fluoreto (2,0 e 8.0 mgF/L) um aumento na expressão de OC, porém em altas doses de NaF (20 mgF/L) evidenciaram uma diminuição na expressão da OC. Estes pesquisadores também avaliaram o efeito do tratamento com 100mg F/L na água de beber em ratos durante um ano e constataram que este tratamento promoveu um incremento na concentração plasmática de OC. Dandona et al. (1988), realizou um estudo com homens saudáveis submetidos ao tratamento com fluoreto de sódio durante 3 semanas e as concentrações séricas de osteocalcina foram mensuradas antes, durante e depois 3 semanas do tratamento. Os resultados revelaram aumento das concentrações plasmáticas deste hormônio ao final do tratamento e as concentrações da osteocalcina voltaram aos níveis basais após 3 semanas do tratamento. Estes pesquisadores concluíram que a administração de fluoreto em indivíduos normais durante um curto período de tempo aumenta a concentração de osteocalcina sérica. Nossos resultados estão de acordo com esses dados, pois observamos que o grupo OVX-F apresentou concentrações plasmáticas de osteocalcina maiores do que o grupo OVX-C (Figura 8). Apesar da osteocalcina ser um marcador de formação óssea, a concentração e o aumento deste marcador no plasma pode não refletir um incremento na formação óssea. Estudos demonstraram que em ratas OVX houve diminuição da incorporação da osteocalcina na matriz óssea (LUVIZUTO et al., 2013) e isto poderia levar um aumento deste marcador na circulação sanguínea.

Camundongos "knockout" para osteocalcina apresentam aumento na glicemia e diminuição na insulinemia em relação aos camundongos selvagens (Lee *et al., 2007*). Nesse estudo também se verificou que a secreção de insulina e sensibilidade

a este hormônio estavam reduzidas nesses camundongos "knockout" para osteocalcina. Como descrito acima, nossos resultados demonstraram aumento na concentração plasmática osteocalcina. Esse aumento também pode ter propiciado um aumento da insulinemia, conforme já descrito. Por outro lado, em nossos estudos, este aumento de OC não promoveu aumento na sensibilidade à insulina. Esta resposta pode ser decorrente da ação do NaF em aumentar a concentração de TNF-α, que promove resistência à insulina (CHIBA et al.,2012). E parece que em relação à sensibilidade à insulina, esta citocina sobrepuja o efeito da osteocalcina.

O fluoreto também parece alterar a quantidade de massa óssea em ratos de um modo dependente da dose, conforme demonstrado por Duan et al. (2014), citado anteriormente. Matsuda *et al.* (2014), utilizaram doses variadas de fluoreto de sódio (0, 5, 10, 25, 50, e 75 μM) durante 28 dias em células de calvária de camundongos das linhagens C57BL/6J (B6) e BMDC3H/HeJ (C3). Estes pesquisadores não observaram efeitos destas variadas doses de NaF sobre a atividade da fosfatase alcalina, mas observaram diminuição de nódulos mineralizados nas doses 50 e 75μM em C3 e nas doses 10, 25, 50 e 75μM em B6. O efeito de NaF na dose de 10 μM, aumentou a produção de colágeno tipo I e acima de 50μM afetou a produção e degradação da matriz extracelular, provavelmente durante o período de mineralização.

Os resultados do presente estudo revelaram que o grupo OVX-F apresentou diminuição da área total óssea (Figura 13 A-C), entretanto não houve alterações no CMO e DMO.

Nem sempre há uma correlação direta entre a ocorrência de fraturas e resultado de densitometria. A densitometria mensura a massa óssea calcificada, mas não afere a qualidade desta massa óssea (SOUZA et al., 2010). Alguns estudos clínicos demonstraram que a utilização de fluoreto para tratamento de osteoporose aumenta a DMO, mas não diminui o risco de fratura vertebral (DAMBACHER et al., 1986; HAGUENAUER *et al.,* 2000; KLEEREKOPER; BALENA, 1991; RIGGS et al., 1990).

Haguenauer *et al.* (2000), estudaram o tratamento com flúor (<30mg NaF) em mulheres pós-menopáusicas e observaram que apesar do tratamento com flúor aumentar a DMO da coluna lombar destas pacientes, não foi constatado redução das fraturas vertebrais durante um período de 4 anos de acompanhamento. Ao

aumentar a dose de flúor, estes pesquisadores observaram aumento de risco de fraturas não vertebrais, além de efeitos colaterais relacionados ao sistema digestório.

Um estudo biomecânico revelou uma diminuição na qualidade óssea em ratos tratados com flúor nas doses de 100 e 150 ppm durante 90 dias (SØGAARD *et al.*, 1995).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Søgaard et al. (1997), foi observado diminuição em todos os parâmetros biomecânicos (rigidez, tenacidade e força) em vértebras de ratas OVX tratadas com NaF (Figura 14 A-C).

Carvalho, (2005) e Fernandes (2010), trataram ratos com doses variadas de NaF administrado na água de beber e verificaram que uma dose de 5 ppm de F não promoveu alterações na formação óssea, enquanto que a dose de 50 ppm promoveu danos na formação do osso. Os resultados do presente estudo também demonstraram diminuição nos parâmetros histomorfométricos (Figura 11 e 12) e biomecânicos (Figura 14). Observamos uma condição de fragilidade óssea, que pode ser verificado por meio da diminuição da $F_{máx}$, nas tíbias do grupo OVX-F quando comparado ao grupo controle. Além disso, houve diminuição da área óssea, número e espessura trabecular.

Turner *et al.* (2001) observaram em vértebras de ratos senis que a concentração de 50 mg/L de NaF, adicionado a água potável, promoveu a mineralização óssea danificada, que pode ser explicado devido ao aumento da quantidade de osteóide não mineralizado, resultando na diminuição da força das vértebras.

Em outros estudos, Reid *et al.* (2007), observou em seres humanos que o monofluorofosfato, (20mg) promoveu aumento da DMO em 22% enquanto que os pacientes que receberam placebo apresentaram aumento de 6%. Embora constatado aumento da DMO, foi observado interferência na mineralização óssea nas vértebras do grupo tratado. Jiang *et al.* (1996), também observaram aumento da DMO em ratos que ingeriram doses de 0,5 mg NaF/kg/dia, sem apresentar melhora na força óssea destes animais.

A National Osteoporosis Foundation (2010), relata que o fluoreto de sódio (NaF) estimula a formação óssea, no entanto, a qualidade da massa óssea desenvolvida é prejudicada, e as indicações de que o fluoreto reduz o risco de fratura são conflituosas e controversas.

Em cultura celular, por meio do ensaio de MTT (Metil Tiazolil Tetrazólio) que tem por finalidade avaliar a viabilidade celular, o tratamento com NaF inibiu a proliferação de osteoblastos em ratos e caprinos (WANG *et al.*, 2011), bem como interrompeu o ciclo celular em células da mucosa bucal, hepatócitos e neurônios do hipocampo (ZHANG *et al.*, 2008). Além disso, WANG *et al.* (2011), demonstraram que o tratamento com NaF em altas doses, aumentou os níveis intracelulares de ROS (espécies reativas de oxigênio) e a LPO (peroxidação lipídica), sugerindo que o flúor pode estar associado ao aumento de danos oxidativos.

Grey *et al.* (2013) observaram em pacientes que o tratamento com placebo e fluoreto em baixas doses (2,5mg, 5mg e 10mg), durante 1 ano, não promoveram efeitos significativos no esqueleto e concluíram que a terapia com NaF é ineficaz contra a osteoporose.

Estudo realizado por Shin *et al.* (2014), em homens, investigou a associação entre a resistência à insulina e a densidade mineral óssea e observou-se que a resistência à insulina é um fator preditivo negativo para a saúde óssea. Além disso, a associação entre o nível de insulina e DMO variaram de acordo com o grau de resistência à insulina, ou seja, quando mais o indivíduo é resistente à insulina, a massa óssea diminui.

A Agência Europeia de Medicamentos não se manifestou sobre o uso de flúor no tratamento da osteoporose. A FDA (Food and Drug Administration) defende a falta de eficácia na prevenção de fraturas e na modulação da massa óssea. Em decorrência disto, a FDA não iniciou um processo de revisão formal para a aceitação desta terapia para tratamento de desordens ósseas (WHO, 2004).

Resumo dos principais resultados

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o tratamento com NaF (50mg/L) em ratas ovariectomizadas promoveu:

Aumento:

- da insulinemia;
- do índice HOMA-IR;
- de osteocalcina;
- da calcemia;
- da fluoremia no plasma e osso;
- de triacilglicerol e VLDL;
- de TNF-α e IL-6 no plasma.

Diminuição:

- do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS1/IRS2) da pp185 após estímulo insulínico em tecido adiposo branco;
- da Kitt;
- da área óssea total;
- do número de trabéculas;
- da espessura trabecular;
- da rigidez, tenacidade e força máxima da tíbia.

Nenhuma alteração:

- no peso corpóreo;
- na ingestão alimentar e hídrica;
- na glicemia;
- no colesterol total no plasma;
- no HDL e LDL plasmático;
- no conteúdo mineral ósseo;
- na densidade mineral óssea.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nesses resultados, podemos concluir que o tratamento com dose alta de NaF não promoveu alteração na DMO, mas piorou os parâmetros biomecânicos na tíbia, demonstrando que esse tratamento promoveu a formação de um osso de menor qualidade. Ademais, o NaF promoveu diminuição do sinal insulínico e resistência à insulina. Salientamos que esta resistência hormonal piora com o envelhecimento. Em decorrência disso, o uso de NaF para o tratamento de osteoporose deve ser feito com cautela, principalmente em mulheres após a menopausa.

Referências

REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2012.

ARA, T.; DECLERCK, Y. A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. **Eur. J. Cancer**, v. 46, n. 7, p. 1223-1231, May 2010.

ARROTÉIA, K. F.; PEREIRA, L. A. V. Osteoblastos. In: CARVALHO, H. F., COLLARES-BUZATO, C. B. (Org.). Célula uma abordagem multidisciplinar**.** São Paulo: Ed. **Manole**, 2005, p.34-49.

AVOLIO, G.; BRANDÃO, C. M. A.; OLIVEIRA, J. X.; COSTA, C.; ALONSO, G. O papel da vitamina D3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde.** v. 26, n. 3, p. 347-350, 2008.

AVRAMOGLU, R. K.; BASCIANO, H.; ADELI, K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. **Clin. Chim. Acta**, v. 368, n. 1-2, p. 1-19, Jun. 2006.

BEDANI; R.; ROSSI, E. A. O consumo de cálcio e a osteoporose. **Semina**, v. 26, n. 1, p. 3-14, jan./jun. 2005.

BIANCO, A.C.; LAZARETTE-CASTRO, M. Fisiologia do metabolismo osteomineral. In: AIRES, M. M. Fisiologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008. p. 1137-1162.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J. Periodontal Res.**, v. 28, n. 6, Pt 2, p. 500-510, Nov. 1993.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R. C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M. B.; MONAUNI, T.; MUGGEO, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity:

studies in subjects with various degrees of glucosetolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, 2000.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, May 2003.

BROWN, J. P.;DELMAS, P. D.;MALAVAL, L.;EDOUARD, C.;CHAPUY, M. C.;MEUNIER, P. J. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. **Lancet**., v. 19, n. 1, p. 1091-1093, May, 1984.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. In: BRUNTON, L. L. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12. ed. São Paulo: **McGraw-Hill**, 2012. p. 1301-1302.

BUZALAF, M. A. R. Fluoretos e saúde bucal. São Paulo: **Santos**, 2008.

CAMPOS, L. M. A.; LIPHAUS, B. L.; SILVA, C. A. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporose na infância e na adolescência. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 6, p. 481-487, Nov. 2003.

CARO, J. F.; CARO, J. F.; ITTOOP, O.; PORIES, W. J.; MEELHEIM, D.; FLICKINGER, E. G.; THOMAS, F.; JENQUIN, M.; SILVERMAN, J. F.; KHAZANIE, P. G.; SINHA, M. K. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes - insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin-receptor structure, and kinase-activity. **J. Clin. Invest.**, v. 78, n. 1, p. 249-258, Jul. 1986.

CARO, J. F.; CARO, J. F.; SINHA, M. K.; RAJU, S. M.; ITTOOP, O.; PORIES, W. J.; FLICKINGER, E. G.; MEELHEIM, D.; DOHM, G. L. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 5, p. 1330-1337, May 1987.

CARVALHEIRA, J.; ZECCHIN, H.; SAAD, M. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 419-425, Aug. 2002.

CARVALHO, J. G. **Avaliação de várias concentrações de flúor na formação óssea ectópica em ratos jovens e velhos**. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 304-312, Abr. 2006.

CASTELO-BRANCO, C. Management of osteoporosis: an overview. **Drugs Aging**, v. 12, Suppl. 1, p. 25-32, 1998.

CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; ROGGIA, C.; NAMBA, N.; NOVACK, D.; WOODRING, J.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 10, p. 1229-1237, Nov. 2000.

CHEN, J. R.; LAZARENKO, O. P.; WU, X.; TONG, Y.; BLACKBURN, M. L.; SHANKAR, K.; BADGER, T. M.; RONIS, M. J. Obesity reduces bone density associated with activation of PPARγ and suppression of Wnt/β-catenin in rapidly growing male rats. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13704, 2010.

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

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

CHOU, C. K.; DULL, T. J.; RUSSELL, D. S.; GHERZI, R.; LEBWOHL, D.; ULLRICH, A.; ROSEN, O. M. 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.**, v. 262, n. 4, p. 1842-1847, Feb. 1987.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Ver. Eletr. Mater. Proces.** v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

CUSI, K.; MAEZONO, K.; OSMAN, A.; PENDERGRASS M.; PATTI, M. E.; PRATIPANAWATR, T.; DEFRONZO, R. A.; KAHN, C. R.; MANDARINO, L. J. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 3, p. 311-320, Feb. 2000.

DAMBACHER, M. A.; ITTNER, J.; RUEGSEGGER, P. Long-term fluoride therapy of postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v. 7, n. 3, p. 199-205, 1986.

DANDONA, P.; COUMAR, A.; GILL, D. S.; BELL, J.; THOMAS, M. Sodium fluoride stimulates osteocalcin in normal subjects. **Clin. Endocrinol.**, v. 29, n. 4, p. 437-441, Oct. 1988.

DE BENEDETTI, F.; RUCCI, N.; DEL FATTORE, A.; PERUZZI, B.; PARO, R.; LONGO, M.; VIVARELLI, M.; MURATORI, F.; BERNI, S.; BALLANTI, P.; FERRARI, S.; TETI, A. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. **Arthritis Rheum.**, v. 54, n. 11, p. 3551-3563, Nov. 2006.

DELMAS, P. D.; WILSON, D. M.; MANN, K. G.; RIGGS, B. L. Efeito da função renal sobre os níveis plasmáticos de osso Gla-proteína. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 57, n. 5, p. 1028-1030, Nov. 1983.

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, n. 1, p. 2-17, Jan. 2013.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M. On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. **Acta Cient. Venez.**, v. 54, n. 1, p. 58-75, 2003.

DOST, F.N.; KNAUS, R. M.; JOHNSON, D. E.; WANG, C. H. Fluoride impairment of glucose utilization: nature of effect in rats during and after continuous NaF infusion. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 41, n. 3, p. 451-458, Sep. 1977.

DUAN, X. Q.;ZHAO, Z. T.; ZHANG, X. Y.; WANG, Y.;WANG, H.;LIU, D. W.;LI, G. S.; JING, L. Fluoride affects calcium homeostasis and osteogenic transcription factor expressions through L-type calcium channels in osteoblast cell line. **Biol. Trace Elem. Res.,** 2014. In press.

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

EGERDIE, B.; SAAD, F. Bone health in the prostate cancer patient receiving androgen deprivation therapy: a review of present and future management options. **Can. Urol. Assoc. J.**, v. 4, n. 2, p. 129-135, Apr. 2010.

EINHORN, T. A.; WAKLEY, G. K.; LINKHART, S.; RUSH, E. B.; MALONEY, S.; FAIERMAN, E.; BAYLINK D. J. Incorporation of sodium fluoride into bone does not impair the mechanical properties of the appendicular skeleton in rats. **Calcif. Tissue Int**., v. 51. n. 2, p. 127-131, Aug. 1992.

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, Dec. 1993.

FERNANDES, M. S. Avaliação **da influência do fluoreto no reparo ósseo em alvéolo de ratos. Estudo dos processos de reabsorção e neoformação óssea.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2010.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R. A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296-308, Jul. 2010.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem**., v.18, n.6, p.499-502, Jun. 1972.

FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B.; FOX, S. W.; CHAMBERS, T. J. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 1108-1118, Mar. 2002.

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**, v. 142, n. 2, p. 309-319, Jul. 2010.

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

GARTNER, P. L.; HIATT, J. L. Tratado de histologia em cores. 2. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2003.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arq. Bras. Endocrinol Metabol**., v. 50, n. 2, p. 208-215, Apr. 2006.

GOLDSTEIN, B.; KAHN, C. R. Insulin allergy and insulin resistance. In: LINCHESTEIN, L. M.; FAUCI, A. S. (Ed.) **Current therapy in allergy immunology and rheumatology**. Lewiston: BC Decker. p. 327-330, 1988.

GRAHAM, L. S.; TINTUT, Y.; PARHAMI, F.; KITCHEN, C. M.; IVANOV, Y.; TETRADIS, S.; EFFROS, R. B. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. **J Bone Miner. Res**., v. 25, n. 11, p. 2460-2469, Nov. 2010.

GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Osteoclastos. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. (Org.). Célula uma abordagem multidisciplinar**.** São Paulo: **Manole**, 2005. p.50-67.

GREY, A.; GARG, S.; DRAY, M.; PURVIS, L.; HORNE, A.; CALLON, K.; GAMBLE, G.; BOLLAND, M.; REID, I. R.; CUNDY, T. Low-dose fluoride in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 6, p. 2301-2307, Jun. 2013.

GRUCKA-MAMCZAR, E.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; CHLUBEK, D.; SAMUJŁO, D.; CEGŁOWSKA, A. Lipid balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. **Fluoride**, v. 37, n. 3, p. 195-200, Aug. 2004.

HAGUENAUER, D.; WELCH, V.; SHEA, B.; TUGWELL, P.; ADACHI, J. D.; WELLS, G. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. **Osteoporos. Int.**, v. 11, n. 9, p. 727-738, 2000.

HOFBAUER, L. C.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L.; KHOSLA, S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. **Bone**, v. 25, n. 3, p. 255-259, Sep. 1999.

HORWOOD, N. J.; ELLIOTT, J.; MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4743-4746, Nov. 1998.

HOTAMISILIGIL, 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, Feb. 1996.

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. U S A**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, May 1994.

HU, C.; REN, L.; LI, X.; WU, N.; LI, G.; LIU, Q.; XU, H. Effect of fluoride on insulin level of rats and insulin receptor expression in the MC3T3-E1 cells. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 150, n. 113, p. 297-305, 2012.

HUO, L.;, LIU, K.; PEI, J.; YANG, Y.; YE, Y.; LIU, Y.; SUN, J.; HAN, H.; XU, W.; GAO, Y. Fluoride promotes viability and differentiation of osteoblast-like Saos-2 cells via BMP/Smads signaling pathway. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 155, n. 1, p. 142-149, Oct. 2013.

JIANG, Y.; ZHAO, J.; VAN, A. R.; DEQUEKER, J.; GEUSEN, P. Effects of low-dose long-term sodium fluoride preventive treatment on rat bone mass and biomechanical properties. **Calcif. Tissue Int.** v. 58, n. 1, p. 30-39, 1996.

KAHN, C. R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism**, v. 27, n. 12, Suppl. 2, p. 1893-1902, Dec. 1978.

KAHN, C. R. et al. (Ed.) **Joslins Diabetes Mellitus**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KASUGA, M.; HEDO, J. A.; YAMADA, K. M.; KAHN, C. R. The 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.

KLEEREKOPER, M.; BALENA, R. Fluorides and osteoporosis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 11, p. 309-324, 1991.

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. 155-161, Jun. 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. 275-285, Jan. 2000.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Molecular comparison of pyrophosphate- and ATP-Dependent fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferases from potato tuber. **Plant Physiol.,** v. 86, n. 3, p. 645-648, Mar 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran, bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

KURIHARA, N.; CHENU, C.; MILLER, M.; CIVIN, C.; ROODMAN, G.D. Identification of committed mononuclear precursors for ostoclast-like cells formed in long-term marrow cultures. **Endocrinology,** v. 126, n. 5, p. 2733-2741, May 1990.

LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P. J.; MCKEE, M. D.; JUNG, D. Y.; ZHANG, Z.; KIM, J. K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G.Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell,** v. 130, n. 3, p. 456-469, 2007.

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. 934-941, Dec.1998.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**., v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LUVIZUTO, E. R.; DIAS, S. M.; QUEIROZ, T.P.; OKAMOTO, T.; GARCIA, I. R. JR.; OKAMOTO, R.; DORNELLES, R.C. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1021-1029, Apr. 2010.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 42, n. 6, p. 413-421, Dec. 1998.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 177-189, 2006.

MARTIN, L. N. C.; KAYATH, M. J. Abordagem clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial de hipercalcemia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo , v. 43, n. 6, p. 472-479, Dec. 1999.

MATSUDA, S. S.;SILVA, T. L.;BUZALAF, M. A.;RODRIGUES, A. C.;DE OLIVEIRA, R. C. Differential effects of fluoride during osteoblasts mineralization in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred strains of mice. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 161, n. 1, p. 123-129, Oct. 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.

NASCIMENTO, T. B.; GLANER, M. F.; PACCINI M. K. Influência da composição corporal e da idade sobre a densidade óssea em relação aos níveis de atividade física. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 53, n. 4, p. 440-445, Jun. 2009.

NOF - NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION - Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation, 2010.

PAGE, C. P.; CURTIS, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. Farmacologia Integrada.2. ed. São Paulo: **Manole**, 2004.

PAK, C. Y.; SAKHAEE, K.; PIZIAK, V.; PETERSON, R. D.; BRESLAU, N. A.; BOYD, P.; POINDEXTER, J. R.; HERZOG, J.; HEARD-SAKHAEE, 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, n. 8, p. 625-632, Apr. 1994.

PARK, S. M.; JEE, J.; JOUNG, J. Y.; CHO, Y. Y.; SOHN, S. Y.; JIN, S. M.; HUR, K. Y.; KIM, J. H.; CHUNG, J. H.; LEE, M. K.; MIN, Y. K. High dietary sodium intake assessed by 24-hour urine specimen increase urinary calcium excretion and bone resorption marker. **J. Bone Metab.,** v. 21, n. 3, p. 189-194, Aug. 2014.

PERALDI, P.; SPIEGELMAN, B. TNF-alpha and insulin resistance: Summary and future prospects. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 182, n. 1-2, p. 169-175, May 1998.

PIHLAJAMÄKI, J.; GYLLING, H.; MIETTINEN, T. A.; LAAKSO, M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. **J. Lipid Res.**, v. 45, n. 3, p. 507-512, Mar. 2004.

PINTO NETO, A. M.; PEDRO, A. O.; HARDY, E.; OSIS, M.J.D.; COSTA-PAIVA, L.H.S.D.; MARTINEZ E. Z.; Caracterização das usuárias de terapia de reposição hormonal do Município de Campinas, São Paulo. **Cad. Saúde Pública,**v. 18, n. 1, p. 121-127, 2002.

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

RAIF, E.M.; HARMAND, M.F. Molecular interface characterization in human bone matrix. **Biomaterials**, v.14, n.13, p. 978-984, 1993.

REID, I. R.; CUNDY, T.; GREY, A. B.; HORNE, A.; CLEARWATER, J.; AMES, R.; ORR-WALKER, B. J.; WU, F.; EVANS, M. C;. GAMBLE, G. D.; KING, A. Addition of monofluorophosphate to estrogen therapy in postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **J.Clin.Endocrinol.Metab**., v. 92, n. 7, p. 2446-2452, 2007.

RICH, C.; ENSINCK, J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. **Nature**, v. 191, p. 184-185, Jul. 1961.

RIGALLI, A.; BALLINA, J. C.; ROVERI, E.; PUCHE, R. C. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. **Calcif. Tissue Int.**, v. 46, n. 5, p. 333-338, 1990.

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.289-292, Mar. 1995.

RIGGS, B. L.; HODGSON, S. F.; O'FALLON, W. M.; CHAO, E. Y. S.; WAHNER, H. W.; MUHS, J. M.; CEDEL, S. L.; MEXTON, J. L. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. **New Engl. J. Med.,** v. 332, n. 12, p. 802-809, Mar. 1990.

ROCHA, N. P.; SIQUEIRA-CATANIA, A.; BARROS, C. R.; PIRES, M. M.; FOLCHETTI, L. D.; FERREIRA, S. R. Analysis of several anthropometric measurements for the identification of metabolic syndrome, with or without disturbance of glucose metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 54, n. 7, p. 636-643, Out. 2010.

ROSENBERG, A. Bone, joints, and soft tissue tumors In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; Collins, T. (Eds.) **Robbins pathologic basis of disease.**6 ed. Philadelphia:Saunders, p. 1215-1268, 1999.

ROSSI, A. C.; FREIRE, A. R.; DORNELLE, R. C. M. Osteoporose: considerações sobre terapêuticas atuais e metabolismo ósseo.**Int. J. Dent.**, v. 9, n. 4, p. 210-214, out/dez. 2010.

RUFO, A.; DEL FATTORE, A.; CAPULLI, M.; CARVELLO, F.; DE PASQUALE, L.; FERRARI, S.; PIERROZ, D.; MORANDI, L.; DE SIMONE, M.; RUCCI, N.; BERTINI, E.; BIANCHI, M. L.; DE BENEDETTI, F.; TETI, A.Mechanisms inducing low bone density in duchenne muscular dystrophy in mice and humans. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 8, p. 1891-1903, Aug 2011.

RUI, L.; FISHER, T. L.; THOMAS, J.; BRANCO, M. F. Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 43, p. 40362-40367, Oct. 2001.

RUSSO, L. A. T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n. 4, p. 401-406, Ago. 2001.

SAAD, M. J. A.; ZECCHIN, H. G. Resistência à insulina no diabetes tipo 2. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETO, A. (Ed.) Diabetes na prática clínica. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2011.

SAKURAI, T.; SUZUKI, K.; TAKI, T.; SUKETA, Y. The mechanism of changes in metabolism and transport ofglucose caused by fluoride administration to rats. **Fluoride**, v. 26, p. 210, 1993.

SEIKE, M.; SAITOU, T.; KOUCHI, Y.; OHARA, T.; MATSUHISA, M.; SAKAGUCHI, K.; TOMITA, K.; KOSUGI, K.; KASHIWAGI, A.; KASUGA, M.; TOMITA, M.; NAITO, Y.; NAKAJIMA, H. Computational assessment of insulin secretion and insulin sensitivity from 2-h oral glucose tolerance tests for clinical use for type 2 diabetes. **J. Physiol. Sci.**, v. 61, n. 4, p. 321-330, Jul. 2011.

SHIN, D.; KIM, S.; KIM, K. H.;LEE, K.;PARK, S. M. Association between insulin resistance and bone mass in men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 99, n. 3, p. 988-995, Mar. 2014.

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, Jan. 1995.

SØGAARD, C. H.; MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J. S.; RICHARDS, A.; MCOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 439-449, May 1997.

SOUZA, M. C.; ASSEMANY, F. S.; LIMA, A. T. C.; SOUZA, R. F. Glicocorticoides e osteoporose: artigo de revisão. **Rev. Cienc. Medi. Biol.,** v. 9,supl. 1 p. 57-64, 2010.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; MARTÍN T. J. Modulation of osteoclast differentiation: Update 1995. **Endocrinol. Rev.,** v. 4, p. 266-270, 1995.

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

THOMSON, B. M.; MUNDY, G. R.; CHAMBERS, T. J. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. **J. Immunol.**, v. 138, n. 3, p. 775-779, Feb. 1987.

THRAILKILL, K. M.; THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN, C. K. Jr.; BUNN, R. C.; KEMP, S. F.; FOWLKES, J. L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,**v. 289, n. 5, p. E735-E745, Nov. 2005.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol. Med.**, v. 14, n. 3-4, p. 222-231, Mar./Apr. 2008.

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.

VELDHUIS-VLUG, A. G.; FLIERS, E.; BISSCHOP, P. H. Bone as a regulator of glucose metabolism. **Neth. J. Med.,** v. 71, n. 8, p. 396-400, Oct. 2013.

VIÑALS, F.; TESTAR,X.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. **Biochem. J.**, v. 291, Pt. 2, p. 615-622, Apr. 1993.

VIRKAMÄKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 7, p. 931-943, Apr. 1999.

WANG, Z.;YANG, X.;YANG, S.;REN, G.;FERRERI, M.;SU, Y.;CHEN, L.;HAN, B. Sodium fluoride suppress proliferation and induce apoptosis through decreased insulin-like growth factor-I expression and oxidative stress in primary cultured mouse osteoblasts. **Arch. Toxicol.**, v. 85, n. 11, p. 1407-1417, Nov. 2011.

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

WHO - Organização Mundial de Saúde. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: 2004.

ZHANG, M.; WANG, A.; XIA, T.; HE, P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. **Toxicol. Lett.**, v. 179, n. 1, p. 1–5, 2008.

ZHANG, Y.; ZHOU, P.; KIMONDO, W. J. Adiponectin and osteocalcin: relation to insulin sensitivity. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 90,n. 5, p. 613-620, 2012.

Anexos

ANEXOS

Anexo – A

Certificado do comitê de Ética em Pesquisa.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Avaliação da sensibilidade insulínica, transdução do sinal insulínico e da densidade mineral óssea em ratas tratadas com fluoreto de sódio"** sob responsabilidade da Pesquisadora **DÓRIS HISSAKO SUMIDA** e colaboração de Rita da Cássia Alves Nunes, Fernando Yamamoto Chiba, Maria Sara de Lima Coutinho, Max Sander de Oliveira da Mota, Nayara Rodrigues Alves e Leda Maria Pescinini Salzedas está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00941-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research **"Evaluation of insulin sensitivity, transduction of insulin signaling and bone mineral density in rats treated with sodium fluoride"**, process number **FOA-00941-2013**, under responsibility of **DÓRIS HISSAKO SUMIDA** and with collaboration of Rita da Cássia Alves Nunes, Fernando Yamamoto Chiba, Maria Sara de Lima Coutinho, Max Sander de Oliveira da Mota, Nayara Rodrigues Alves and Leda Maria Pescinini Salzedas agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça
Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@foa.unesp.br

Anexo – B

Artigo enviado à Revista Bone.

Effect of sodium fluoride on the bone biomechanical and histomorphometric parameters and on the insulin signaling and sensitivity in ovariectomized rats

Rita de Cássia Alves Nunes[a], Amanda Gomes Pereira[a], Fernando Yamamoto Chiba[b], Edilson Ervolino[a], Mário Jefferson Quirino Louzada[c], Roberta Okamoto[a], Marília Afonso Rabelo Buzalaf[d], Alfredo Rigalli[e], Doris Hissako Sumida[a]

Effect of sodium fluoride on the bone biomechanical and histomorphometric parameters and on the insulin signaling and sensitivity in ovariectomized rats

Rita de Cássia Alves Nunes[a], Amanda Gomes Pereira[a], Fernando Yamamoto Chiba[b], Edilson Ervolino[a], Mário Jefferson Quirino Louzada[c], Roberta Okamoto[a], Marília Afonso Rabelo Buzalaf[d], Alfredo Rigalli[e], Doris Hissako Sumida[a]

[a]Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas-SBFis - Department of Basic Sciences - Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

[b]Department of Child and Social Dentistry - Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

[c]Department of Support, Animal Production and Health - Araçatuba School of Veterinary Medicine, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680

[d]Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Alameda Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, 17012-901, Bauru, São Paulo, Brazil.

[e]Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, Argentina. Facultad de Ciencias Médicas – Santa Fe 3100 - 2000. Rosario. Argentina.

*Corresponding author:

Doris Hissako Sumida, DDS, PhD

Department of Basic Sciences - Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista - Rua José Bonifácio 1193. CEP 16015-050

Tel.: (55) 18-3636-2819 Fax: (+55) 18 3636 3233

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

Highlights

The chronic treatment with NaF (50 mg/L) in ovariectomized rats promoted:

- decrease in the insulin sensitivity and the insulin signal
- decrease in biomechanical and histomorphometric parameters
- increase in plasma concentration of insulin, osteocalcin, fluoride, calcium, triglyceride, VLDL, TNF-α, IL-6 .

Abstract

Osteoporosis is defined as a systemic disease characterized by bone degradation and decreased bone mass, which promotes increased bone fragility and eventual fracture risk. Several studies have investigated the use of sodium fluoride (NaF) for the treatment of osteoporosis. However, fluorine can alter glucose homeostasis. Therefore the aim of the study was to evaluate the effect of water intake with NaF at a dose of 50 mg/L in ovariectomized rats: 1) tyrosine phosphorylation status of insulin receptor substrate (pp185 - IRS-1/IRS- 2) in white adipose tissue (WAT); 2) insulin sensitivity; 3) plasma concentration of glucose, insulin, cholesterol, triglyceride, TNF-α, IL-6, osteocalcin, calcium and fluoride; 4) bone density and biomechanical properties in the tibia; 5) tibia histomorphometric analysis. Forty-two Wistar rats (two months old) were ovariectomized and randomly distributed into two groups: 1) control (OVX-C); 2) NaF group (OVX-F) which was subjected to treatment with NaF (50 mg/L) administered in drinking water for 42 days. The chronic treatment with NaF promoted: 1) decrease in: the tyrosine phosphorylation status of pp185 (IRS1/IRS2) after insulin infusion in WAT, the insulin sensitivity, the trabecular width, the bone area, stiffness, maximum strength and tenacity; 2) increase in plasma concentration of insulin, fluoride, osteocalcin, calcium, triglyceride, VLDL-cholesterol, TNF-α and IL-6; 3) no change in body weight, food and water intake, plasma glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, bone mineral content and bone mineral density. It was concluded that chronic treatment with NaF (50 mg/L) in OVX rats caused a decrease in insulin sensitivity, insulin signaling transduction, and the biochemical, biomechanical and histomorphometric bone parameters.

Keywords: Fluorine; Bone Density; Osteoporosis; Insulin Resistance; Rats

Introduction

Patients with type 1 Diabetes mellitus showed lack of insulin and do not reach the peak of bone mass, leading to a decrease in bone mineral density and increase in the risk of fractures, while patients with type 2 Diabetes mellitus showed hyperinsulinemia that stimulates bone formation. This can be explained by the fact that insulin is an anabolic factor to the bones [1].

Osteoporosis is defined as a systemic disease affecting the skeleton, characterized by decreased bone mass and microarchitectural deterioration and consequent increase in bone fragility and risk of fracture [2].

Several studies investigated the use of fluoride for the treatment of osteoporosis [3,4]. Fluoride can accumulate in calcified tissues as teeth and bones, and this fluoride accumulation in bone tissue can alter the quality of this tissue [5,6]. Researchers have demonstrated that fluoride has osteogenic effect, for example, increasing the number of osteoblast in response to stimulation and proliferation of osteoblast precursors and also antiresorptive capacity [7].

Furthermore, studies have demonstrated that fluoride treatment increases bone density; however, it may decrease biomechanical properties, so the increase in bone mass induced by the treatment with sodium fluoride does not necessarily correspond to increased bone strength [8].

Besides influencing in the bone metabolism, the fluorine can also alter glucose homeostasis [9,10]. Studies with castrated male rats demonstrated that chronic treatment with NaF promoted insulin resistance and decreased insulin signal [11-13]. In addition, the chronic treatment with fluoride in rats also increase the IRS-1 serine phosphorylation status in adipose tissue of castrated rats, resulting in attenuation of insulin signal transduction [11,13].

There is no consensus about the effectiveness of fluoride in promoting the formation of healthy bone [14] and, depending of the dosage, fluorine can promote changes in glycemic homeostasis [11,13,15] and insulin sensitivity [16].

Therefore, the aim of this study was to examine the effect of chronic treatment with 50ppm of NaF in drinking water in insulin sensitivity, insulin signal transduction, biomechanical and histomorphometric parameters in the bone of ovariectomized rats.

Methods

All experimental procedures were approved by the Institutional Committee on Animal Research and Ethics (Protocol No. 00941-2013). Forty two 2-month-old female Wistar rats were kept on a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 0700) and room temperature of 21 ± 2 ºC, with free access to a regular laboratory rat diet (Presence® - Evialis Industry of Brazil Ltda, Paulinia, Brazil) and water. Under anesthesia (ketamine -80mg/kg and xylazine -10mg/kg), bilateral ovariectomies (OVX) were performed in all rats. These rats were distributed into two groups: control group (OVX-C) which was subjected to the treatment without NaF group but with a solution of NaCl (9.54 mg/kg bw) containing the same amount of sodium in relation to the NaF group; NaF group (OVX-F), which was treated with NaF (50 mg/L) administered in drinking water. During 42 days, daily volume of water consumed per rat in the groups was measured 3 days per week. At the end of this period, the animals from OVX-C and OVX-F groups were fasted for 14 h from food and deprived for 4 h from the NaF solution before the day of the experimental measurements to avoid an acute F effect. OVX-C and OVX-F groups were then anesthetized with sodium thiopental (Thiopentax® - Cristália Pharmaceutical Chemicals Ltd., Itapira, Brazil, 3%, 5 mg/100g bw, ip). Ten control and ten F-treated rats were submitted to the intravenous insulin tolerance test (0.75 U insulin/kg bw). Six control and six F-treated rats were used to quantify the pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status in the WAT after regular human insulin (1.5 U, i.v.) administration. Median laparotomy was performed in ten control and ten F-treated rats, and blood was collected from the inferior vena cava. The plasma was stored at -70 °C until quantification of plasma concentrations of quantification of glucose, insulin, cholesterol, triglyceride, TNF-α, IL-6, calcium and fluoride and from these animals, tibias were also acquired for biomechanical and histomorphometric analysis.

Evaluation of BMD and biomechanical parameters

The total area (cm^2), bone mineral content (BMC; g), and bone mineral density (BMD) (g/cm^2) were measured in whole tibia DXA (lunar DPX alpha, WI, USA). The biomechanical properties of tibiae of rats were evaluated by 3-point bending using a universal testing machine (DL 3000, EMIC®, SP, Brazil). Each tibia was loaded centrally in the diaphysis medium, with a support distance range of 2/3 of the bone length, and a 2000-N load cell was applied at a rate of 5 mm/min until the bone fractured. The load and displacement of the cross bar of the machine was monitored and recorded using a software. From these data, the load-

displacement curves were obtained. The tensile strength of the bone (N) is the breakdown strength that represents the force at which the bone was broken. In fact, it is a more precise parameter for directly evaluating the resistance to bone fracture. The slope of the elastic region of the load-displacement curve is the extrinsic stiffness (N/mm) of the structure, and the area under the load-displacement curve (i.e., the area of the elastic strain region plus the area of the plastic strain region) is a measure of the amount of energy required to cause a bone fracture [17].

Analysis methods

Samples from plasma were used for determination of glycemia by the oxidase glucose method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and insulinemia by the radioimmunological assay (RIA) method (Coat–A–Count, DPC, Diagnostic products, Los Angeles, CA, USA). Insulin resistance was evaluated by index of homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), calculated using the formula: HOMA-IR = fasting glycemia (mmol/L) × fasting insulinemia (μUI/mL)/22.5 [18].

Determination of TNF-α

Blood samples were collected from the inferior vena cava to measure plasma TNF-α concentration. After centrifugation, supernatant was collected and maintained at -70 °C until use. The 96-well plate was coated with monoclonal antibody to TNF-α. Samples and recombinant TNF-α and were added to the wells and after 2 h, unbound proteins were washed away, and an enzyme-linked polyclonal antibody was added to the wells; this antibody acted as a link between TNF-α and the dye, whereby a color change proportional to the amount of TNF-α was observed. This color change was quantified by comparing the optical densities of the samples to those of known dilutions using a plate reader at 450 nm. The concentration of TNF-a was calculated from standard curve in pg/ml.

Determination of IL-6

The concentration of plasma IL-6 was determined by ELISA using commercial kits following the manufacturers instructions (BD Biosciences, San Diego, USA; Biovedor, Heidelberg, Germany).

Determination of osteocalcin

The concentration (pg/ml) of plasma osteocalcin was determined by ELISA using commercial kits following the manufacturers instructions (Uscn Life Science Inc. Houston, USA).

Determination of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and very low-density lipoprotein cholesterol levels

Blood samples were collected from the inferior vena cava to measure the plasma concentrations of TG, TC, and HDL-C. After centrifugation, the supernatant was collected and stored at –20°C until use. Plasma concentrations of triglycerides, total cholesterol, and HDL-C were measured using an enzymatic colorimetric method (Labtest Diagnostica S.A. Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) using a spectrophotometer at wavelengths of 505, 500, and 500 nm, respectively.

Levels of LDL-C and VLDL-C were determined from the values for triglycerides, total cholesterol, and HDL-C, using the Friedewald equation [19].

Determination of F ion concentration in blood plasma

For analysis of F in plasma, pre-diffusion with heated HMDS-H2SO4 was done to remove CO2. The F concentration in plasma was determined after 12 hr of diffusion facilitated by the hexamethyldisiloxane (HMDS) [20] as modified by Whitford [21] using a F ion selective electrode (Orion Research, Cambridge, Mass., USA, model 9409) and a calomel reference microelectrode (Accumet, #13-620-79) joined and coupled to a potentiometer (Orion Research, model EA 940), as described by Buzalaf et al. [22].

Determination of F ion concentration in bone

Bone fluoride levels were measured by direct potentiometry using an ion-selective electrode, ORION 94-09, Orion Research (MA, USA), after isothermal distillation [23]. Prior to the measurements, bone tissue was incinerated for 6 h at 550 °C.

Determination of calcium

Calcium measurements were performed by a spectrophotometric method using commercial kits following the manufacturers instructions (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil).

Short Intravenous Insulin Tolerance Test

Test was carried out intravenous insulin tolerance (ITT) in ten animals each group (OVX-C and OVX-F) as follows: the test was performed with the animals anesthetized as described previously and was held cannulation of the right jugular vein, introducing the cannula (cannula "Sylastic") proximity to the atrium (superior vena cava). This cannula served for the injection of insulin was administered at a dose of 0.75 U/kg bw. Blood samples (50µ/L) were collected from nicked tails at 0 (before hormone administration), 4, 8, 12, and 16 minutes after insulin administration and glucose was measured using a glycemia monitor (ACCU-CHEK Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The results were analyzed by comparison of the constant rate for glucose disappearance (Kitt value) from 0 to 16 minutes of the test. The Kitt value was calculated using the equation 0.693/t 1/2. The glucose t 1/2 was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase [24].

Evaluation of the Tyrosine Phosphorylation Status of the Insulin Receptor Substrate

Samples of white adipose tissue (WAT) were collected from six animals of each group (OVX-C and OVX-F) before and after (120s) administration of 1.5 U regular insulin. Tissue samples were prepared according to the method described by Carvalho et al. [5] and submitted to the Western blotting method for quantification of the pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status using anti-phosphotyrosine antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) according to the instructions of the manufacturer. Quantitative analysis of the blots was performed using software (NIH Image v.b3b, National Institutes of Health, Bethesda, MD) [24].

Histomorphometric analysis

For histomorphometric analysis six animals from each group were used. The right tibia was collected then fixed in 4% formaldehyde for 24h. Decalcification was performed in solution-Rychlo Plank. Specimens were routinely processed, embedded in paraffin and sectioned longitudinally. Semi-serial sections of 5-µm thickness were obtained of the right tibia and stained with hematoxylin and eosin.

Equidistant sections from each specimen were selected and imaged using a digital camera coupled to light microscopy. Images containing tibial proximal metaphysis were obtained. Analysis was carried out by an IMAGE J public domain image analysis system. The following bone histomorphometric parameters were measured: B.Ar, cancellous bone area (mm^2); Tb.N, trabecular number (number per mm^2); and Tb.Wi, trabecular width (mcm). All nomenclature, symbols and units for bone histomorphometry were expressed as recommended by the American Society for Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee [25].

Immunohistochemistry

The slides were separated and destined for immunohistochemical analysis. Endogenous peroxidase activity was inhibited with hydrogen peroxide, antigen recovery obtained with citrate buffer at 60 °C for 20 min, and nonspecific reactions blocked with defatted milk and bovine serum albumin during antibody incubations.

Primary antibodies against Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP – code SC 30832 – Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, USA), a biotinylated secondary antibody (Pierce Biotechnology), Streptavidin Biotin amplifier (Dako), and diaminobenzidine (Dako) as chromogen, which gives a brown colour to the markings, were used. On conclusion of reactions, the slides were counterstained with Harris Hematoxylin.

To perform the analysis an optical microscope with a magnification objective of 160× Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Benshein, Germany) was used, coupled to an image capturing camera (Leica DFC 300FX, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) and connected to a Pentium III microcomputer with digitized image analyser software (Leica Camera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software).

Statistical analysis

For analysis of insulin signal: The statistical analyses were performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference between groups ($p < 0.05$).

For analysis of Kitt values, plasma glucose, insulin, cholesterol, triglyceride, TNF-α, IL-6, osteocalcin, calcium and fluoride; and biomechanical properties into the tibia: the statistical analyses were performed by the Student t test. The value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

Data analysis was performed with a statistical program (Graph Pad Prism (version 5.0) software program).

Results

Biochemical parameters

As seen in Table 1, the OVX-F group exhibited no changes in plasma glucose concentrations, however there was a significant increase ($p<0.05$) in plasma insulin concentration. From these values, the HOMA-IR index was calculated (HOMA-IR = fasting glucose (mmol/L) × fasting insulin level (μUI/mL)/22.5). It was found that the index value HOMA-IR was significantly higher ($p<0.05$) in the OVX-F group.

The OVX-F group showed a glucose disappearance rate (Kitt) significantly lower ($p<0.05$) than OVX-C group. Additionally, OVX-F group showed increased plasma concentrations of calcium, osteocalcin, fluoride, IL-6, TNF-α, triglyceride and VLDL cholesterol compared to the OVX-C group. However, the treatment with sodium fluoride did not cause changes in plasma concentrations of total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol between the groups (table 1).

Insulin signal

In the OVX-C group there was intra-group significant difference ($p<0.05$) after insulin stimulation. There was a decrease ($p<0.05$) in the pp185 phosphorylation status, after insulin stimulation, in the white adipose tissue of the OVX-F group compared to the OVX-C group (Fig. 1).

Bone mineral density

It was observed that the value of the total bone area of the tibia was significantly lower ($p<0.05$) in the OVX-F group compared to the OVX-C group. In addition, the treatment with sodium fluoride did not cause changes either in the bone mineral density or in the bone mineral content (figure 2 A-C).

Bone microstructure

Figure 3 shows histomorphometric parameters of the OVX-C group and the OVX-F group. The OVX-F group showed significant decrease ($p<0.05$) in all parameters analyzed:

(A) bone area (B.Ar); (B) trabecular number (Tb.N); and (C) trabecular width (Tb.Wi) when compared to control.

Histological analysis

Histological analysis (Figure 4) shows: A) the OVX-C group and B) the OVX-F group. Qualitative analysis reveals decreased trabecular width in the group treated with sodium fluoride and increased space between the bone trabeculae.

Biomechanical parameters

Figure 5 shows the values of stiffness (A), maximum strength (B) and tenacity (C), obtained by three point bending flexural test made in the tibia of the animals. Significantly lower values in stiffness, maximum strength and tenacity were observed in the OVX-F group compared to the OVX-C group.

Assessment of fluoride concentration in bone

Figure 6 shows that treatment with NaF was able to promote significant increase in fluoride concentration in bone of the OVX-F group compared to the OVX-C group.

Discussion

Chronic treatment with NaF in drinking water during 42 days promoted insulin resistance and changes in the insulin signal and the bone biomechanical and histomorphometric properties in OVX rats.

The present study showed that chronic treatment with sodium fluoride in OVX rats caused a decrease in the pp185 (IRS-1 / IRS-2) tyrosine phosphorylation status in the white adipose tissue, promoting decreased insulin signal. Previous studies performed in our laboratory using another dosage of NaF (4.0 mg F/kg bw/day), observed that castrated male rats subjected to chronic ingestion of NaF showed a reduction in the pp 185 tyrosine phosphorylation status in muscle and adipose tissue, resulting in decreased insulin signal in these tissues [12,13]. These responses suggest that fluoride can cause insulin resistance, because several authors correlated insulin resistance with decrease in insulin signal [26,27,28,12].

The treatment with NaF promoted an increase in plasma insulin concentration in the OVX-F group, however no difference in blood glucose was observed between the groups. This increase in insulin may be due to a response of the organism to the decrease in glucose

uptake by the cells due to insulin resistance, making it necessary to increase the production of insulin by the pancreas to maintain normal blood glucose concentration [29]. From the values of glycemia and insulinemia, HOMA-IR index, which expresses the insulin resistance, was calculated. The value of this index was higher in the OVX-F group compared to the OVX-C group, demonstrating that treatment with NaF induced insulin resistance. The results of this study also demonstrates that the rate constant for glucose disappearance (Kitt) in the OVX-F group is reduced in comparison to their control, reinforcing that the OVX-F group is insulin resistant .

Studies performed in normoglycemic men with insulin resistance have shown that cholesterol synthesis is increased in these patients. Insulin resistance and type 2 diabetes have been consistently associated with high plasma concentrations of triglycerides and low plasma concentrations of HDL-cholesterol. The increased synthesis of VLDL-cholesterol in the liver appears to be the main cause of increased concentrations of triglyceride-rich lipoproteins. This excess of VLDL-cholesterol and triglyceride in the liver is associated with elevated plasma levels of fatty acids in patients with insulin resistance [30]. The results of this study showed that treatment with NaF promoted an increase in plasma concentrations of triglyceride and VLDL-cholesterol.

Graham et al. [31] showed that rats fed with a hyperlipidic diet developed osteopenia, investigated "in vitro" the involvement of the lymphocytes T from bone marrow of these animals and observed an increase of several cytokines including TNF-α, IL-6 and RANKL. From these results they suggested that lymphocytes T play a key role in the diet-induced osteoclastogenesis and can contribute to bone loss associated with osteopenia.

The results of this present study showed that plasma concentration of TNF-α and IL-6 in ovariectomized rats treated with NaF were higher compared to the control group. Studies have shown that treatment with NaF in castrated male rats promoted insulin resistance and increased plasma concentration of TNF-α [11]. The results of this study are in agreement with the results of Chiba et al. [11] so that treatment of NaF in OVX rats caused increased plasma concentration of TNF-α and insulin resistance. Peraldi and Spiegelman [32] suggested that TNF-α may alter the insulin signal transmission by increasing of the IRS-1 serine phosphorylation. The IRS-1 serine phosphorylated inhibits the tyrosine kinase activity of the insulin receptor, thereby reducing insulin signaling [33].

In obesity condition, macrophages produce high levels of TNF- α and IL-6 that promote osteoclast activity leading to bone resorption [34]. IL-6 is a cytokine that can affect

bone mass. Their chronic expression increases bone remodeling and causes loss of bone mass by increasing its reabsorption [35].

The results of this study showed an increase in plasma concentration of calcium in the OVX-F group compared to the control. It is known that in women, osteoporosis is associated with decrease of estrogen which accelerates bone loss. There are other mechanisms that can lead to hypercalcemia as increase in bone resorption and in the intestinal calcium absorption and decrease of the urinary excretion of calcium [36]. Studies performed with osteoblasts (MC3T3-E1) "in vitro" treated with calcium and fluoride showed that L-type calcium channels play an important role in this mineral homeostasis, because they affect the osteogenic expression of transcription factors such as activator protein 1 (AP-1), runt-related transcription factor 2 (Runx2) and osterix (OSX) in osteoblasts exposed at low concentration (2.0 mg/L) of fluoride. These results suggest that the regulation of the expression or activity of the L-type calcium channels can regulate calcium signaling in bone cells and the modulation of these channels can influence the bone remodeling in conditions of fluorosis [37].

Dandona et al. [38] performed a study in healthy men undergoing treatment with sodium fluoride for 3 weeks and serum osteocalcin concentrations were measured before, during and after 3 weeks from the treatment. Results showed increased plasma concentrations of this substance at the end of the treatment. These researchers concluded that fluoride administration in normal individuals during a short period of time increases the serum osteocalcin. Our results are in agreement with these data,because it was observed that the OVX-F group showed higher plasma concentrations of osteocalcin than the OVX-C group. Osteocalcin knockout mice exhibit increased blood glucose and decreased insulin compared to wild-type mice [39]. In this study it was also found that the insulin secretion and sensitivity to this hormone were reduced in these mice "knockout" for osteocalcin. Our results showed an increase in plasma osteocalcin in OVX-F group. This increase may also have promoted an increase in plasma insulin. On the other hand, in our studies this increase in plasma osteocalcin did not increase insulin sensitivity. In fact, it got worse. This response may be due to treatment with NaF to promote increased concentration of TNF-α, which promotes insulin resistance [11]. In relation to insulin sensitivity, the effect of this cytokine seems to overcome the effect of OC in this hormone sensitivity.

The results of this study revealed that the OVX-F group showed a decreased total bone area, however there was no change in bone mineral content and in bone mineral density. There is not always a direct correlation between the occurrence of fractures and the

densitometry results. Densitometry measures the calcified bone mass, but not the quality of this bone mass. Some clinical studies have demonstrated that the use of fluoride for the treatment of osteoporosis increases the bone mineral density, but does not decrease the risk of vertebral fracture [8,40-42].

A biomechanical study showed a decrease in bone quality in fluorine-treated rats with doses of 100 and 150 ppm for 90 days [43]. The results of this present study are in agreement with Søgaard et al. [44], because a decrease was observed in all the biomechanical parameters in the bones of OVX rats treated with NaF.

Fernandes et al. [45] performed studies with rats treated with variable doses of NaF administered in drinking water and observed that a dose of 5 ppm F did not promote any change in bone formation, while the dose of 50 ppm promoted damage in bone formation. The results of this study also showed impairment in histomorphometric and biomechanical parameters of the bone. A condition of bone fragility was observed, which was verified by the decrease of maximum strength in the tibia of the OVX-F group compared to the control group. In addition, there was a decrease in the bone area, trabecular number and trabecular width. Grey et al. [4] observed that patients treated with placebo and low dose of fluoride (2.5 mg, 5 mg and 10 mg) for 1 year did not show significant changes on the skeleton and concluded that therapy with NaF is ineffective for the treatment of osteoporosis.

Shin et al. [46] in a study performed in men, investigated the association between insulin resistance and bone mineral density and it was observed that insulin resistance is a negative predictor of bone health. In addition, the association between insulin level and bone mineral density changed according to the degree of insulin resistance, that is, when the individual is more insulin resistant, the bone mass decreases.

Conclusion

Based on these results, we conclude that treatment with high dose of NaF did not promote change in bone mineral density, but it decreased biomechanical and histomorphometric parameters in the tibia, demonstrating that this treatment promoted the formation of a bone of lower quality. Furthermore, the NaF promoted reduction in insulin signal, and insulin resistance. We emphasize that this hormone resistance worsens with aging. Therefore, the use of NaF for the treatment of osteoporosis should be made cautiously, especially in women after menopause.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel – CAPES, Pro-rector for research, and graduate of UNESP – Univ Estadual Paulista.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Veldhuis-Vlug AG, Fliers E, Bisschop P. H. Bone as a regulator of glucose metabolism. Neth J Med 2013;71:396-400.
2. Bonucci E, Ballanti P. Osteoporosis: bone remodeling and animal models. Toxicologic Pathology 2013;000:1-13.
3. Schnitzler CM, Solomon L. Trabecular stress-fractures during fluoride therapy for osteoporosis. Skeletal Radiology 1985;14:276-9.
4. Grey A, Garg S, Dray M, Purvis L, Horne A, Callon K, Gamble G, Bolland M, Reid IR, Cundy T. Low-dose fluoride in postmenopausal women: a randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metabol 2013;98:2301-7.
5. Carvalho CRO, Brenelli SL, Silva AC, Nunes ALB, Velloso LA, Saad MJA. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. Endocrinology 1996;137:151-9.
6. Román LDA, de la Fuente AR, de Luis J, Pérez JL, González M. Papel del flúor en la osteoporosis. Endocrinologia y Nutrición 2004;1:426-32.
7. Jiang Y, Zhao J, Van Audekercke R, Dequeker J, Geusens P. Effects of low-dose long-term sodium fluoride preventive treatment on rat bone mass and biomechanical properties. Calc Tissue Int 1996;58:30-9.
8. Riggs BL, Hodgson SF, Ofallon WM, Chao EYS, Wahner HW, Muhs JM, Cedel SL, Melton LJ. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med 1990;322:802-809.
9. Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM. Reversible impairment of glucose-tolerance in patients with endemic fluorosis. Diabetologia 1993;36:826-8.

10. Grucka-Mamczar E, Birkner E, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Chlubek D, Samujlo D, Ceglowska A. Lipid balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. Fluoride 2004;37:195-200.
11. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, da Silva VC, Saliba Moimaz SA, Saliba Garbin CA, Antoniali C, Sumida DH. NaF treatment increases TNF-alpha and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. J Fluoride Chem 2012;136:3-7.
12. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, de Souza Gomes WD, Saliba Moimaz SA, Saliba Garbin CA, Silva CA, Sumida DH. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. Fluoride 2010;43:25-30.
13. Chiba FY, Saliba Garbin CA, Sumida DH. Effect of fluoride intake on carbohydrate metabolism, glucose tolerance, and insulin signaling. Fluoride 2012;45:236-41.
14. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. Science 1983;222:330-2.
15. Chehoud KA, Chiba FY, Sassaki KT, Saliba Garbin CA, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. Fluoride 2008;41:270-5.
16. Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. Calc Tissue Int 1990;46:333-8.
17. Claro FA, Sa Lima JR, Salgado MAC, Gomes MF. Porous polyethylene for tissue engineering applications in diabetic rats treated with calcitonin: Histomorphometric analysis. Int J Oral & Maxillofacial Implants 2005;20: 211-9.
18. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care 2000;23:57-63.
19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.
20. Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. Talanta 1968;15:969-74
21. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. Karger 1996.
22. 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;35:185-92.

23. Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. Measurement of total and diffusible serum fluoride. J Clin Lab Anal 1999;13:151-7.

24. Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH, Chiba FY, Garbin CAS, Jardim EG, Jr., Antoniali C, Sumida DH. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. J Periodontol 2013;84:407-14.

25. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. J Bone Miner Res 2013;28:1-16.

26. Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. J Biol Chem 1982;257:10392-9.

27. Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebwohl 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.

28. Ebina Y, Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Craik CS, Siddle K, Pierce SB, Roth RA, Rutter WJ. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:704-8.

29. Cesaretti MLR, Kohlmann OJ. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. Arq Bras Endocrinol Metabol 2006;50:190-7.

30. Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. J Lipid Res 2004;45:507-12.

31. Graham LS, Tintut Y, Parhami F, Kitchen CM, Ivanov Y, Tetradis S, Effros RB. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. J Bone Miner Res 2010;25:2460-9.

32. Peraldi P, Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. Mol Cellular Biochem 1998;182:169-75.

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

34. 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

TJ, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Experimental Med 2000;191:275-85.

35. de Benedetti F, Rucci N, del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarell M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice - A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. Arthritis and Rheumatism 2006;54:3551-63.
36. Martin LNC, Kayath MJ. Abordagem clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial de hipercalcemia. Arq Bras Endocrinol Metab 1999;43.
37. Duan XQ, Zhao ZT, Zhang XY, Wang Y, Wang H, Liu DW, Li GS, Jing L. Fluoride affects calcium homeostasis and osteogenic transcription factor expressions through l-type calcium channels in osteoblast cell line. Biol Trace Elem Res 2014;9.
38. Dandona P, Coumar A, Gill DS, Bell J, Thomas M. Sodium fluoride stimulates osteocalcin in normal subjects. Clin Endocrinol 1988;29:437-41.
39. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, Mckee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell 2007;130:456-69.
40. Dambacher MA, Ittner J, Ruegsegger P. Long-term fluoride therapy of postmenopausal osteoporosis. Bone, 1986;7:199-205.
41. Kleerekoper M, Peterson EL, Nelson DA, Phillips E, Schork MA, Tilley BC, Parfitt AM. A randomized trial of sodium fluoride as a treatment for postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int 1991;1:155-61.
42. Haguenauer D, Welch V, Shea B, Tugwell P, Adachi JD, Wells G. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. Osteoporos Int 2000;11:727-38.
43. Søgaard CH, Mosekilde L, Schwartz W, Leidig G, Minne HW, Ziegler R. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. Bone 1995;16:163-9.
44. Søgaard CH, Mosekilde L, Thomsen JS, Richards A, Mcosker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. Bone 1997;20: 439-49.
45. Fernandes MS, Yanai MM, Martins GM, Iano FG, Leite AL, Cestari TM, Taga R, Buzalaf MAR, Oliveira RC. Effects of fluoride in bone repair: an evaluation of RANKL, OPG and TRAP expression. Odontology 2014;102:22–30.

46. Shin D, Kim S, Kim KH, Lee K, Park SM. Association between insulin resistance and bone mass in men. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:988-95.

Figure Legends

Fig.1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation status of pp185 (IRS-1/IRS-2) in the white adipose tissue of control (n=6) and F-treated rats (n=6). A) typical autoradiograms of white adipose tissue. B) depict the results of the insulin stimulated tyrosine phosphorylation status of pp185 in the white adipose tissue, expressed in arbitrary units per μg of protein (mean ± SEM; n=6). # p <0.05 OVX-C (-) vs. OVX-C (+); * p <0.05 OVX-C (+) vs. OVX-F (+).

Fig.2. Analysis of bone mineral density emissions by dual X-ray absorptiometry (DXA) in the control group (OVX-C) and the group treated with sodium fluoride (OVX-F). (A) Bone Mineral Content (g), (B) total area (cm2), and (C) bone mineral density (g/cm2). The results were presented as mean ± SEM, n = 10. *p<0.05 compared to control group.

Fig.3. Microstructural properties of the proximal tibial metaphysis of OVX-C group and OVX-F group. The bone morphometric parameters are represented: (A) cancellous bone area (B.Ar); (B), trabecular number (Tb.N); and (C), trabecular width (Tb.Wi). The results were presented as mean ± SEM, n = 10. *p<0.05 compared to control group.

Fig.4. Photomicrographs showing the histological appearance of the cancellous bone in the tibial metaphysis in the OVX-C group (A) and OVX-F group (B). Abbreviations and symbols: bt, trabecular bone. Stain: hematoxylin and eosin. Original magnification: 250x. Scale bars: 100 μm.

Fig.5. Biomechanical properties of the tibia of rats from OVX-C group and OVX-F group evaluated by testing three-point bending. A) extrinsic stiffness (× 10-3 N/m); B) Fmax (N) – maximum strenght; and C) fracture energy (mJ). The results are presented as the mean ± SEM, n=10. *p<0.05 compared to control group.

Fig 6 - Fluoride concentration in the tibia of the OVX-C group an in the OVX-F. Values are presented as mean ± SEM, n = 10. *p<0.05 compared to control group.

Table.1. The plasma concentrations of glucose, insulin, Kitt, IL-6, TNF-α, calcium, osteocalcin, triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and very low-density lipoprotein cholesterol levels fluorine and HOMA-IR of the OVX-C group and OVX-F group.

Parameters	**OVX-C**	**OVX-F**
Glycemia (mmol/L)	6.86 ± 0.18	6.77 ± 0.23
Insulinemia (μU/mL)	10.83 ± 2.11	18.03 ± 1.79*
K_{itt} (%/min)	3.80 ± 0.80	1,90 ± 0,30*
IL-6 (pg/mL)	28.70 ± 0.58	32.71 ± 1.64*
TNF-α (pg/mL)	06.00 ± 0.19	06.97 ± 0.41*
Calcium (mg/dL)	9.57 ± 0.15	10.49 ± 0.15*
Osteocalcin (pg/ml)	52.08 ± 7.51	110.70 ± 20.0*
Fluorine (mg/mL)	0.04 ± 0.006	0.14 ± 0.02*
HOMA-IR	3.30 ± 0.64	5.62 ± 0.51*
Total cholesterol	90.98 ± 2.71	92.85 ± 3.29
Triglyceride	88.63 ± 2.93	99.80 ± 3.93*
HDL-cholesterol	45.21 ± 0.73	45.54 ± 1.03
VLDL-cholesterol	17.73 ± 0.58	19.96 ± 0.78*
LDL-cholesterol	28.95 ± 2.72	26.00 ± 3.08

Results are expressed as mean ± SEM, n=10. *$p<0.05$ compared to control group.

Figure 1

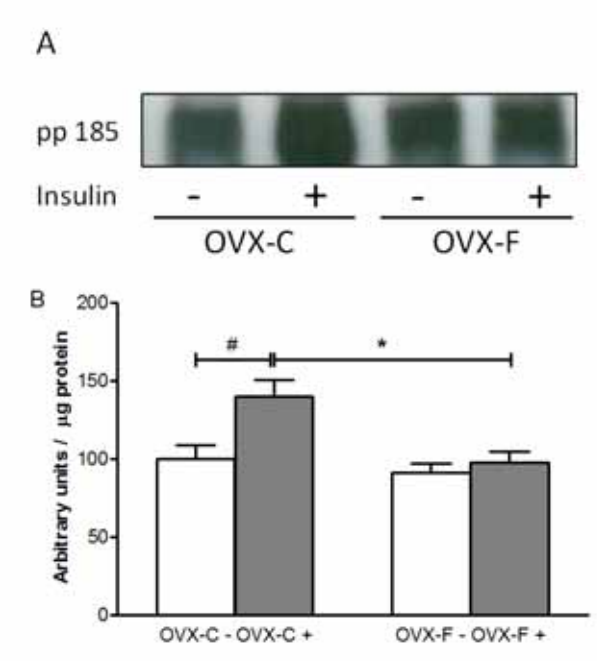


Figure 2

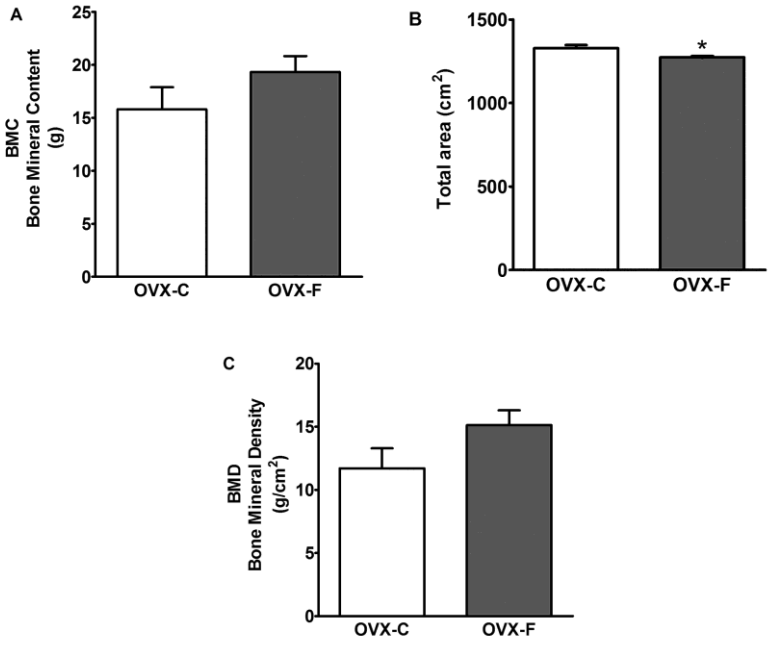


Figure 3

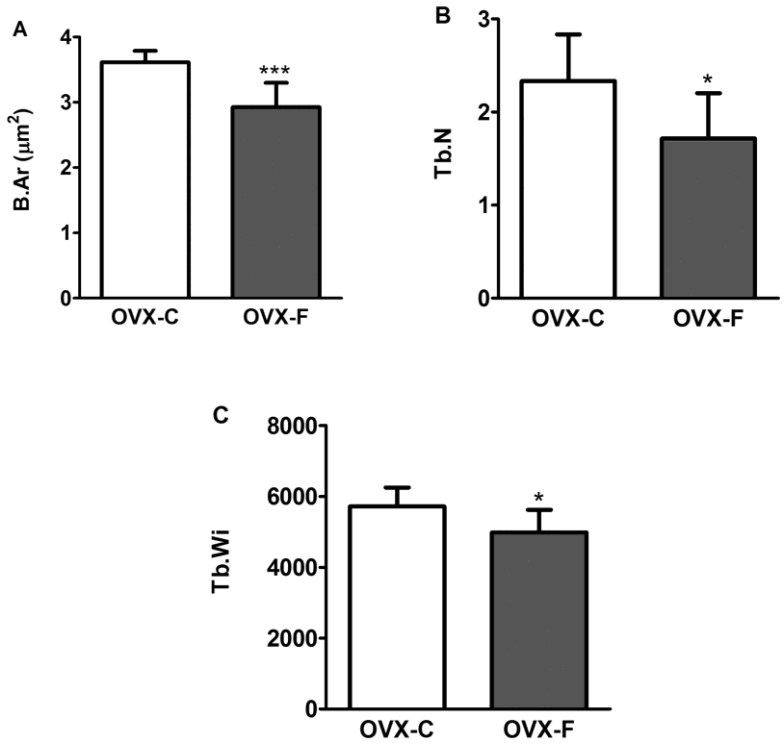


Figure 4

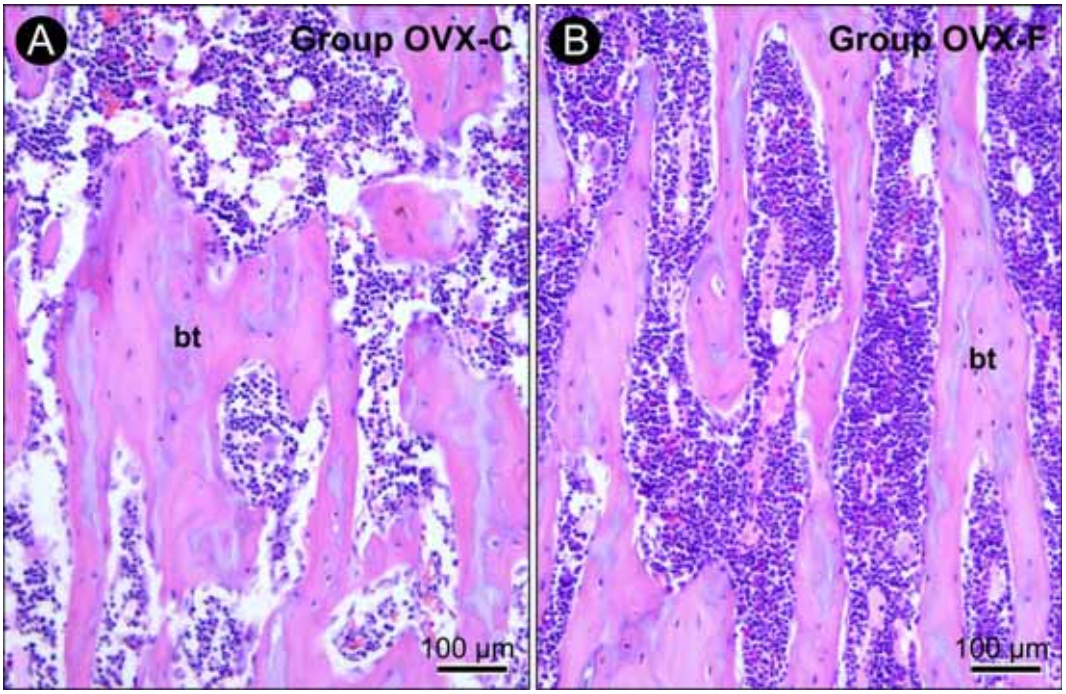


Figure 5

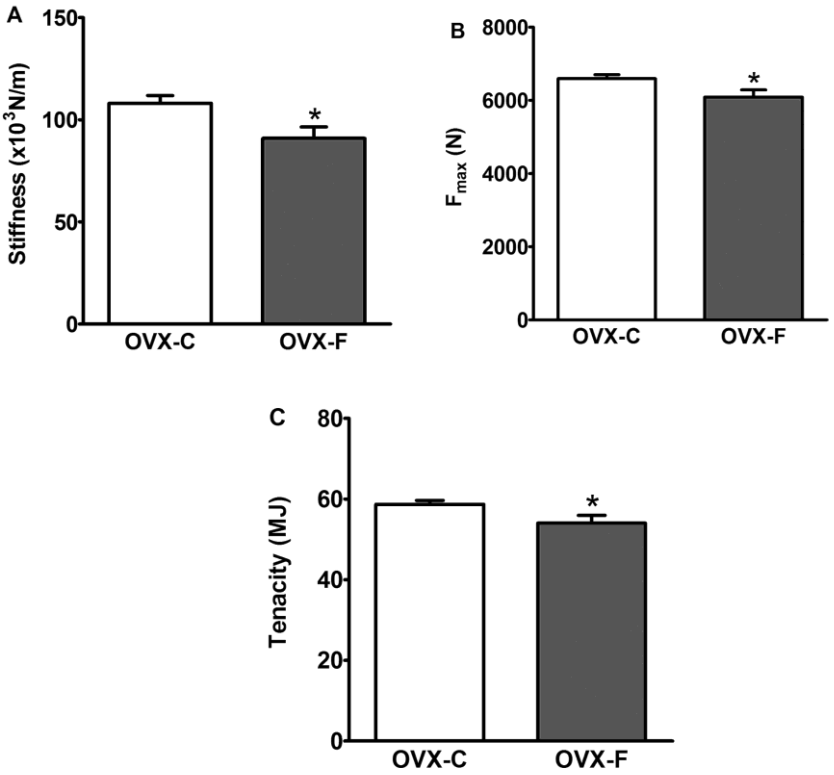
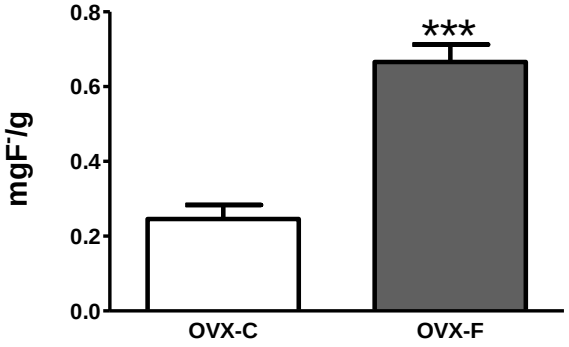


Figure 6



ANEXO – C

Instruções para autores Revista Bone

Ethics in publishing
For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see http://www.elsevier.com/publishingethics and http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics.

Human and animal rights
If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals http://www.icmje.org. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest
All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also http://www.elsevier.com/conflictsofinterest. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification
Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see http://www.elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck http://www.elsevier.com/editors/plagdetect.

Authorship
All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship
This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.*After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service
This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service.

Copyright
This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription. *For subscription articles* Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see http://www.elsevier.com/copyright). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consulthttp://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult http://www.elsevier.com/permissions. *For open access articles* Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see http://www.elsevier.com/OAauthoragreement). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see http://www.elsevier.com/openaccesslicenses).

Retained author rights
As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities.Open access articles please see http://www.elsevier.com/OAauthoragreement.

Role of the funding source
You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies
Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/fundingbodies.

Open access
This journal offers authors a choice in publishing their research:
Open access
Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse. An open access publication fee is payable by authors or their research funder
Subscription
Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (http://www.elsevier.com/access)• No open access publication fee. All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:
Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).
Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The open access publication fee in this journal is **$1,800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:http://www.elsevier.com/openaccesspricing.

Language (usage and editing services)
Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/languageediting/) or visit our customer support site (http://support.elsevier.com) for more information.

Submission
Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees
Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit ourSupport site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

NEW SUBMISSIONS
Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.
As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References
There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text
Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software
Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: http://www.elsevier.com/guidepublication). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections
Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction
State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.
Material and Methods
Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.
Theory/calculation
A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.
Results
Results should be clear and concise.
Discussion
This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.
Conclusions
The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information
• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle

correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.• Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract
A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract
Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See http://www.elsevier.com/graphicalabstracts for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights
Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use*Highlights* in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 20 words per bullet point). Seehttp://www.elsevier.com/highlights for examples.

Keywords
Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations
Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements
Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking
Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See http://www.elsevier.com/databaselinking for more information and a full list of supported databases.

Genbank

Footnotes
Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.*Table footnotes*Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork
General points• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image. • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage. • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.• Supply files that are too low in resolution.• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork
Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article**. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see http://www.elsevier.com/artworkinstructions.
Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services
Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/illustrationservices) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (http://www.endnote.com/support/enstyles.asp) and Reference Manager (http://refman.com/support/rmstyles.asp). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style
Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. *Examples:* Reference to a journal publication: [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51–9. Reference to a book: [2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book: [3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see alsohttp://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source
Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/.

Video data
Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages athttp://www.elsevier.com/artworkinstructions. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides
The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at http://www.elsevier.com/audioslides. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data
Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages athttp://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Submission checklist
The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:
One author has been designated as the corresponding author with contact details:• E-mail address• Full postal address • Telephone All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at http://support.elsevier.com.

Use of the Digital Object Identifier
The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059 When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction
Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor.It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints
The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets).You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at http://www.elsevier.com/trackarticle. You are also welcome to contact Customer Support viahttp://support.elsevier.com.