UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA INFANTIL E SOCIAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA PREVENTIVA E SOCIAL

FERNANDO YAMAMOTO CHIBA

**AVALIAÇÃO DA ETAPA INICIAL DO SINAL
INSULÍNICO EM TECIDO MUSCULAR E HEPÁTICO
DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM NaF**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Odontologia Preventiva e Social”.
Orientadora: Profª Adj. Drª Doris Hissako Sumida

Araçatuba-SP

2010

Catálogo na publicação (CIP)
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

C532a Chiba, Fernando Yamamoto.
Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF / Fernando Yamamoto Chiba. -- Araçatuba : [s.n.], 2010
104 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientadora: Profa. Doris Hissako Sumida

1. Flúor 2. Proteínas substratos do receptor de insulina
3. Intoxicação por flúor 4. Diabetes mellitus 5. Insulina
6. Ratos

Black D5
CDD 617.601

Dados Curriculares

Nascimento: 15.10.1986, São Paulo - SP.

Filiação: Armando Seiti Chiba

YokoYamamoto Chiba

2004/2007: Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2007/2009: Curso de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Armando Seiti Chiba e Yoko Yamamoto Chiba pelo incentivo, constante apoio, aprendizado de vida e esforço realizado para a minha educação. Exemplos de garra, humildade e perseverança, ensinando-me a lutar pelos meus objetivos.

À minha irmã Erika Kiyoko Chiba, pelo imenso companheirismo, incentivo e carinho.

Aos queridos professores e Mestres, pelos conhecimentos e pelas orientações que me fizeram chegar até este momento.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos pela enorme demonstração de amizade, durante os momentos mais difíceis na realização deste estudo.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Doris Hissako Sumida, a grande responsável pela trajetória acadêmica que tenho seguido, pela sua orientação, ensinamentos transmitidos, competência e confiança a mim depositada. A toda sua família, Bráulio, Bruna e Lucas, pela paciência, apoio, companheirismo, ensinamentos e pelo apoio nos momentos difíceis.

À professora Nemre Adas Saliba e professor Orlando Saliba por terem acreditado em mim e mostrado o caminho da saúde coletiva. Pela confiança, disposição em sempre ajudar, estímulos renovadores, dedicação e oportunidades oferecidas, minha eterna gratidão.

Às professoras Cléa Adas Saliba Garbin e Suzely Adas Saliba Moimaz pelo apoio, grande incentivo, ensinamentos, confiança, oportunidades, e por serem exemplos de garra e profissionalismo.

Aos professores Artênio José Ísper Garbin, Maria Lúcia Mazza Sundefeld, Renato Moreira Arcieri e Tânia Adas Saliba Roviada pela colaboração constante, amizade e oportunidade de aprendizado.

A todos os meus amigos, pois, parte da minha história deve-se a todos vocês.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Titular Pedro Felício Estrada Bernabé e à Vice-Diretora Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia, pelo apoio.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Artênio José Ísper Garbin, à vice-coordenadora, Suzely Adas Saliba Moimaz pelo trabalho, amor e dedicação constantes ao referido programa.

À Profa. Nemre Adas Saliba pela iniciativa, coragem e espírito empreendedor ao constituir o Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, o que possibilitou o meu crescimento e participação em importantes projetos na área da Saúde Coletiva.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Profa. Titular Nemre Adas Saliba, Prof. Titular Orlando Saliba, Profa. Adjunto Cléa Adas Saliba Garbin, Profa. Adjunto Suzely Adas Saliba Moimaz, Prof. Adjunto. Artênio José Isper Garbin, Prof. Dr. Renato Moreira Arcieri, Profa. Dra. Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld, Profa. Dra. Tânia Adas Saliba Roviada pela orientação, confiança, incentivo, amizade, por todos os ensinamentos ministrados e ótima convivência.

À professora Kikue Takebayashi Sasaki e todos os professores e alunos do departamento de ciências básicas, pela disposição e colaboração com esta pesquisa.

Aos colegas do Curso de pós-graduação Adriana, Ana Carolina, Ana Paula, Carlos, Daniela Coelho, Daniela Pereira, Fabiano, Luiz Fernando, Karina, Kléryson, Márcio, Marco Aurélio, Milene, Najara, Nelly, Patrícia, Renata, Ronald, Sérgio, Tatiana, Thaís e Wanilda pela amizade, lealdade e paciência durante esta caminhada. Principalmente àqueles que estiveram mais próximos, tornando-se verdadeiros amigos e companheiros de todas as horas.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de fisiologia que estão sempre dispostos a me ajudar, Daisy Jaqueline Shirakashi, João Paulo Silva Servato, Larissa Ferreira da Silva Bergamini, Marjorie de Oliveira Gallinari, Natália Helena Colombo, Viviane Clície da Silva e Wendrew Douglas de Souza Gomes, pela amizade e colaboração.

Aos funcionários e queridos amigos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social, Neusa Martins Rovina Antunes, Nilton César Souza e Valderéz Freitas Rosa, que estão sempre presentes para nos auxiliar.

Aos funcionários e estimados amigos da Biblioteca, Izamar, Cláudio, Ana Cláudia, Ivone, Luzia, Maria Cláudia, Júnior, Fernando, Luana, Ana Paula, Luís Cláudio, sempre prontos para ajudar.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Diogo Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

Às funcionárias da Diretoria Técnica Administrativa, Isabel e Célia, pela atenção dispensada.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Camilo, Alan, João Batista e José Lúcio, pela atenção e presteza no atendimento

Aos estagiários do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, pela amizade e pelo agradável convívio.

A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela ajuda e atenção que me dispensaram desde a graduação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de estudos; ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP), que proporcionaram os recursos necessários para a realização das pesquisas em nosso laboratório.

Epígrafe

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

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

(Eclesiastes 3:1-8)

CHIBA, FY. **Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

RESUMO

Nos últimos anos, tem havido uma redução acentuada nos índices de cárie dentária em diversas regiões do mundo, fato que tem sido atribuído à exposição às substâncias fluoretadas, principalmente na forma de água de abastecimento público e dentifrício. Simultaneamente, nota-se a ocorrência do aumento da prevalência de fluorose dentária. Estudo realizado em 25 pacientes (15 a 30 anos de idade) com fluorose endêmica mostrou que 40% destes tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém esta anomalia foi revertida com a remoção do excesso do flúor na água consumida. O NaF ocasiona inibição da glicólise, diminuição da secreção de insulina e hiperglicemia. Muitas destas respostas sugerem que o NaF pode ocasionar resistência à insulina. Se isto for confirmado, é recomendável diminuir a concentração de fluoreto nos dentifrícios utilizados principalmente por crianças diabéticas, pois a ingestão de pasta dental contendo flúor pode levar à piora na situação de saúde destas crianças. Sabendo-se que o fluoreto pode alterar o metabolismo de carboidratos, tornou-se fundamental caracterizar o efeito do NaF sobre: 1) a sensibilidade à insulina; 2) o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina - pp185 (IRS-1/IRS-2); 3) a fluoremia, glicemia e insulinemia. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos (1 mês de idade) castrados. Após 30 dias da castração, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (CN), 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 fluoreto de sódio; 2) grupo NaF (FN) que será submetido ao tratamento com NaF (4,0 mg de flúor/kg p.c.) na água de beber e na ração durante 42 dias. Após 6 semanas, foi realizada a avaliação da sensibilidade à insulina e a quantificação do grau de fosforilação da pp185, após estímulo insulínico, em tecidos sensíveis à insulina. Também foi realizada a avaliação de insulinemia, glicemia e conteúdo de fluoreto na ração e plasma. O tratamento crônico com NaF resultou em: 1) nenhuma alteração na glicemia e insulinemia; 2) um aumento significativo na fluoremia; 3) diminuição na sensibilidade à insulina; 4) redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 no tecido muscular após o estímulo insulínico; 5) nenhuma alteração na fosforilação em tirosina da pp185 em tecido hepático. Sabendo que o NaF pode alterar o metabolismo de carboidratos em doses altas, é recomendável diminuir a concentração (1100 ug F/g) de fluoreto nos dentifrícios utilizados principalmente por crianças diabéticas, pois a ingestão de pasta dental contendo flúor pode levar à piora na situação de saúde destas crianças.

Palavras-chave: Flúor; proteínas substratos do receptor de insulina; intoxicação por flúor; diabetes mellitus; insulina; ratos.

CHIBA, FY. **Evaluation of the initial stage of the insulin signal in the muscle tissue and liver of rats chronically treated with NaF.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

ABSTRACT

Over the last years, there has been a significant reduction in the incidence of dental caries in several regions of the world. This has been attributed to ingestion of fluoridated products, especially in the form of public water supplies and toothpaste. Simultaneously, there has been an increase in the prevalence of dental fluorosis. A study conducted in 25 patients (15 to 30 years of age) with endemic fluorosis showed that 40% of these had to impaired glucose tolerance, but this anomaly was reversed by removing the excess of fluoride from drinking water. NaF causes glycolysis inhibition, decrease on insulin secretion and hyperglycemia. These responses suggest that NaF can cause insulin resistance. If this is confirmed, the use of dentifrices with lower fluoride content is recommended, especially for diabetic children, for whom excessive F consumption may lead to worsening the condition of these children's health. Knowing that F can interfere with carbohydrate metabolism, we felt it was important and fundamental to undertake a study to examine the chronic effect of NaF on: 1) insulin sensitivity; 2) pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation in gastrocnemius muscle and liver of rats; 3) fluoremia, glycemia and insulinemia. For this study, castrated Wistar male rats (1 month of age) were used. Thirty days after castration, the animals were randomly divided in two groups: 1) control group (CN) which was subjected to treatment without NaF, but with a solution of NaCl (9.54 mg / kg bw) which contains the same amount of sodium in relation to the group NaF; 2) group NaF (FN) that was submitted to treatment with NaF

administered in the drinking water and F contained in food pellets (F total inferred: 4.0 mg F / Kg bw / day in the form of NaF) during 42 days. After 6 weeks, the following experiments were conducted: 1) assessment of insulin sensitivity; 2) and determination of the pp 185 tyrosine phosphorylation status (IRS-1/2) after insulin stimulus in insulin sensitive tissues; 3) assessment of insulinemia, glycemia and fluoride content in the food pellets and plasma. The chronic treatment with NaF promoted: 1) no alteration in glycemia and insulinemia; 2) increase in plasma F level; 3) insulin resistance; 4) decrease in the pp185 tyrosine phosphorylation status in the muscle tissue 5) no alteration the pp185 tyrosine phosphorylation status in the liver. Therefore, knowing that chronic NaF intake is capable of decreasing insulin signal and causing insulin resistance, the use of dentifrices with lower fluoride content is recommended, especially for diabetic children, for whom excessive F consumption may lead to worsening the condition of these children's health.

Keywords: Fluorine; insulin receptor substrate proteins; fluoride poisoning; diabetes mellitus; insulin; rats.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média da somatória de ingestão alimentar (g) total diária do grupo controle (CN) e tratado com flúor (FN) durante 42 dias (n=17) – Pag. 42.

Tabela 2. Somatória da ingestão total de ração (g) durante 42 dias dos grupos controle (CN) e tratado com flúor (FN) de 17 animais – Pag. 42.

Tabela 3. Características dos ratos CN e FN quanto aos parâmetros: glicemia, insulinemia, fluoremia e índice HOMA IR (n=10) – Pag. 42.

Lista de Figuras

Figura 1. As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (figura extraída e adaptada de CARVALHEIRA et al., 2002c) – Pag. 21.

Figura 2. Peso corpóreo (g) de ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F inferido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 17 (CN) e 17 (FN) animais - Pag. 40.

Figura 3. Ingestão alimentar de ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F inferido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 17 (FN) e 17 (FN) animais. * $p < 0,05$ FN vs. CN – Pag. 41.

Figura 4. Velocidade de desaparecimento da glicose (Kiit) em ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial

(total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O Kiit foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 10 experimentos. * $p < 0,05$ FN vs. CN – Pag. 43.

Figura 5. Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2), no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio) do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Em **A**, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 μ g) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em **B**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM de 6 experimentos. * $P < 0,05$ Insulina (-) vs. Insulina (+). # $p < 0,05$ FN (+) vs. CN (+) - Pag. 45.

Figura 6. Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2), no tecido hepático do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Em **A**, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína (185 μ g) foram submetidas ao SDS-PAGE. Em **B**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM de 6 experimentos. * $p < 0,05$ Insulina (-) vs. Insulina (+) – Pag. 47.

Lista de Abreviaturas

- Akt /PKB: proteína quinase B
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
- APS: Molécula adaptadora contendo domínio pleck-strin e SH2
- Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
- CN: Grupo controle
- CO₂: Dióxido de carbono
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- F: Flúor
- FN: Grupo submetido ao tratamento com flúor
- FYN: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*
- Gab-1: *GRB2-associated-binding protein 1*
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose
- Grb10: Proteína 10 ligada a receptor de fator de crescimento
- Grb2: Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento
- HMDS: Hexametil-disiloxano
- HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
- IKK β : Quinase inibidora do fator nuclear $\kappa\beta$
- IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina
- IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina
- ITT: Teste endovenoso de tolerância à insulina
- JAK2: Janus quinase 2
- kDa: kilodalton
- Kiit: Velocidade de desaparecimento da glicose
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- NaCl: Cloreto de sódio
- NaF: Fluoreto de sódio
- NaOH: Hidróxido de sódio

- NO: Óxido nítrico
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- OPAS: Organização Panamericana de Saúde
- p62^{dock}: *62kDa protein downstream of tyrosine kinase*
- PC1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular
- PDK-1: Proteína quinase - 1 dependente de fosfoinosídeo
- PI 3-k: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PKC: Proteína quinase C
- ppm: Partes por milhão
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B [Danio rerio]
- Ratos TG: Ratos transgênicos com excesso crônico de hormônio de crescimento
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SH2: *C-terminal Src homology-2*
- Shc: *Src homology collagen*
- SHP2: Proteína tirosina fosfatase com domínio SH2
- SOS: *Son of sevenless*
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.
- SK6 (p70S6k): Proteína serina/treonina quinase
- SOCS1: Supressor 1 de sinalização de citocinas
- SOCS3: Supressor 3 de sinalização de citocinas
- TC10: *small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein*
- TEMED: *Tetramethylethylenediamine*
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- Tris: Hidroximetil aminometano

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	32
3.3 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2)	33
3.3.1 Preparação das amostras	33
3.3.2 “Western blotting”	33
3.4 Determinação da concentração de íon flúor no plasma sanguíneo	36
3.5 Determinação da concentração de íon flúor na ração	37
3.6 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)	37
3.7 Determinação de insulinemia	38
3.8 Análise da resistência à insulina	38
3.9 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Peso corporal (g)	40
4.2 Ingestão alimentar (g)	41
4.3 Glicemia, insulinemia e fluoremia	42
4.4 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT)	43
4.5 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) em músculo gastrocnêmio	44
4.6 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2): em tecido hepático	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para: manutenção da homeostase de glicose; armazenamento de substratos no tecido adiposo, hepático e muscular; estímulo da lipogênese; síntese de glicogênio e de proteínas; inibição da lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas; crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (CARVALHEIRA et al., 2002c; KAHN et al., 2009).

O efeito da insulina é exercido através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto (KASUGA et al., 1982a). A subunidade alfa é inteiramente extracelular, com peso molecular de 135 kDa, e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade beta é uma proteína transmembrânica (95 kDa) responsável pela transdução do sinal insulínico (KASUGA et al., 1982a, 1982b).

Kasuga et al. (1982b, 1982c) descreveram que a subunidade beta do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica (EBINA et al., 1987). O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo, a pp185. Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE et al., 1985). Sun et al. (1991) observaram que

em células transfectadas com o receptor de insulina humano, há um expressivo aumento da fosforilação da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

Em 1991, Sun et al. clonaram a pp185 e denominaram-na de substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que foi denominada de IRS-2 (ARAKI et al., 1994; SUN et al., 1995; TAMEMOTO et al., 1994). Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2) e ativá-las. Entre essas proteínas, está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-k). Alessi et al. (1997) demonstraram que esta proteína, uma vez ativada, pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase - 1 dependente de fosfoinositideo (PDK-1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). Esta proteína tem três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3 - e todas são ativadas pela fosforilação em treonina e serina (BELLACOSA et al., 1998; KOHN et al., 1996). A ativação desta proteína é essencial para síntese de glicogênio (CROSS et al., 1995), ação antiapoptótica (FRANKE et al., 1997), regulação da síntese lipídica (KITAMURA et al., 1999), síntese de proteínas (HAJDUCH et al., 1998), regulação da expressão gênica (VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000) e transporte de glicose estimulado pela insulina (WANG et al., 1999). A PDK-1, além de fosforilar a AKT, conforme descrito acima, teve demonstrada em alguns estudos a sua capacidade de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da PKC (ζ e λ) envolvidas na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, para promover a captação de glicose em tecido adiposo e músculo (FARESE, 2002). Diminuição da ativação das isoformas atípicas PKC (aPKC) tem sido reportadas em músculo de roedores e humanos

diabéticos do tipo 2 (FARESE et al., 2005). A aPKC também está envolvida na regulação da síntese de lipídios no fígado (FARESE et al., 2005).

Outras proteínas da mesma família do IRS-1, como o IRS-3 e IRS-4 podem também estimular o transporte de glicose (ZHOU et al., 1999). Cai et al., (2003) descobriram dois novos substratos do receptor de insulina, o IRS-5 e IRS-6. Além destes IRSs, existem outros substratos do receptor de insulina, como as proteínas Shc, Gab-1, p62^{dock}, Cbl, JAK2 e APS (CARVALHEIRA et al., 2002b; HU & HUBBARD, 2006; KAHN et al., 2009; WICK et al., 2001).

Renström, et al. (2005) mostraram que o longo tempo de exposição a um ambiente de altos níveis de glicose e insulina leva ao prejuízo na capacidade de captação de glicose e à redução do conteúdo de IRS-1 e IRS-2 em adipócitos primários de ratos. A depleção de IRS-2 pode ser explicada pela supressão da expressão gênica, considerando que a depleção de IRS-1 parece ser causada por mecanismos pós-translacionais, presumivelmente alterações no caminho de degradação de proteína.

Buren et al. (2003) demonstraram que altos níveis de insulina e glicose, em longo prazo e particularmente em combinação, podem produzir, dentro de 24 h de cultura de células adiposas de ratos, alterações marcadas na capacidade de captação de glicose, no conteúdo de IRS-1/2 e de GLUT4 e na habilidade da insulina para fosforilar proteína kinase B (PKB).

Em suma, a ação insulínica envolve uma cascata de interações covalentes e não covalentes centralizadas, em primeiro nível, nos substratos do receptor de insulina. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação destes substratos. Estes servem, então, como proteínas-ancoradouros para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações

determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais (as vias de sinalização da insulina podem ser vistas de maneira resumida na figura 1). Portanto, os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação da insulina presentes na resistência à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e ou curativo para o *diabetes mellitus*.

Figura 1- As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (figura extraída e adaptada de CARVALHEIRA et al., 2002c).

O *diabetes mellitus* (DM) é considerado um problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto de vista social e econômico e com potencial reconhecido para prevenção (GEORG et al., 2005). É uma doença crônica causada por uma deficiência do pâncreas na produção de insulina, ou por

incapacidade da insulina exercer adequadamente suas funções (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2003).

Existem dois tipos principais de diabetes, que são o diabetes tipo 1 (DM1) e o diabetes tipo 2 (DM2). O DM1 é quando o pâncreas não produz a insulina essencial à sobrevivência. Esse tipo de diabetes ocorre mais freqüentemente nas crianças e nos adolescentes, mas também pode ocorrer em pessoas com mais idade (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2003). O DM1, segundo a Organização Mundial da Saúde, é uma das mais importantes doenças crônicas da infância (ZANETTI; MENDES, 2001). Nos Estados Unidos da América, dos 651 mil casos novos diagnosticados a cada ano, 11 mil são em crianças e adolescentes (POND et al., 1995). Os pais dessas crianças enfrentam vários tipos de problemas, sendo que os mais frequentes estão relacionados à administração de insulina, dieta, dinâmica familiar e testes de glicose no sangue e na urina (WARZAK et al., 1993).

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) resulta da incapacidade do corpo de responder adequadamente à ação da insulina produzida pelo pâncreas. O DM2 ocorre com maior frequência nos adultos, mas está sendo observado cada vez mais nas crianças e nos adolescentes. A maioria dos diabéticos apresenta este tipo da doença (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2003). A resistência à insulina no tecido e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum, alterações bastante frequentes em indivíduos obesos, parecem ser os primeiros sinais para o desenvolvimento do DM2. Este tipo de diabetes tem contribuído com mais de 30% dos novos casos de diabetes, mostrando uma possível relação do aumento da prevalência de obesidade infantil com o desenvolvimento desta doença (OLIVEIRA et al., 2004). Na infância, a resistência à insulina associada com hiperinsulinemia

são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da diminuição da tolerância à glicose em crianças obesas (SINHA et al., 2002).

Baseado nesses relatos tornou-se imprescindível realizar estudos e pesquisas direcionados para prevenção e/ou cura do DM. Sabe-se que esta doença promove alterações, principalmente no metabolismo de lipídeos e carboidratos. E verificou-se que dentre os elementos químicos, o flúor pode interferir no metabolismo de lipídeos e de carboidratos (DOST et al., 1977; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2004; HANDLER et al., 1946; RIGALLI et al., 1990, 1995; SHASHI et al., 1988). Estudo realizado em 25 pacientes (15 a 30 anos de idade) com fluorose endêmica mostrou que 40% destes tinham a tolerância à glicose prejudicada, porém esta anomalia foi revertida com a remoção do excesso do flúor na água consumida (TRIVEDI et al., 1993). De La Sota et al., 1997, observaram em testes de tolerância à glicose realizados em argentinos residentes em áreas de fluorose endêmica, uma relação inversa entre fluoremia e a área sob a curva da concentração de insulina em função do tempo. Em outro estudo, glicemias mais altas e atraso no pico plasmático de insulina foram observados após o teste de tolerância à glicose em habitantes com alta ingestão de F (XIE et al., 2000).

O flúor pode estar presente naturalmente na água. Na maioria dos municípios brasileiros a quantidade é muito baixa, variando de 0,1 a 0,3 ppm; entretanto em algumas fontes de cidades como Piracicaba e Pereira Barreto, no Estado de São Paulo, a concentração pode atingir mais de 4ppm. Deve-se notar que em quase todos os estados brasileiros, foram detectados pontos de concentração de flúor na água de abastecimento público superior a 1,0 ppm (KRIGER, 2003).

O flúor é facilmente absorvido pela parede do estômago e do intestino delgado, e a absorção é mais rápida com o estômago vazio do que com a ingestão

associada a outros elementos, ou seja, substâncias como cálcio, magnésio e alumínio reduzem a absorção, em função da formação de compostos complexos insolúveis (BUZALAF, 2008; EKSTRAND; EHRNEBO, 1979; WHITFORD, 1999). Durante o seu trajeto no trato gastrointestinal, o flúor atravessa as membranas celulares por difusão passiva e alcança a corrente sanguínea. A maior parte do flúor absorvido é captada por tecidos calcificados e excretados pela urina (BUZALAF, 2008; WHITFORD, 1999).

O declínio da cárie dentária verificado nas últimas décadas, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento, se deve em grande parte ao aumento da ingestão de produtos fluoretados (LIMA; CURY, 2001). No Brasil, 43% dos habitantes são abastecidos com água fluoretada, com cobertura de até 63% no Estado de São Paulo (LIMA; CURY, 2001). Cury (1989) observou que em 1988 os dentifrícios passaram a ser uma fonte significativa de flúor devido à sua fluoretação. E além do mais, a partir de 1990, praticamente 100% dos dentifrícios vendidos no Brasil passaram a conter flúor na sua composição. A pasta dental deve ser considerada uma forma indireta de exposição sistêmica ao flúor, devido à sua ingestão por crianças durante a escovação dos dentes, ingerindo em média 50% do dentifrício utilizado (LIMA; CURY, 2001; PAIVA; CURY, 2001). A associação de água de abastecimento e dentifrícios fluoretados seria uma das explicações para o aumento da prevalência da fluorose (PENDRYS et al., 1996).

A fluorose dentária é uma alteração do esmalte que está relacionada com a ingestão excessiva e prolongada de fluoreto durante a formação dos dentes, ou seja, no período da amelogenese (formação do esmalte dentário). Dessa forma, podemos nos referir a um período de suscetibilidade para a fluorose dentária. Nos dentes permanentes, esse período compreende do nascimento até os 5-6 anos de idade

(BUZALAF, 2008). Thylstrup e Fejerskov (1978) observaram as características histopatológicas do esmalte fluorótico e relacionaram-nas com a aparência clínica da fluorose. Clinicamente a fluorose pode se apresentar de diversas formas (desde linhas brancas na superfície do esmalte até maior perda do esmalte, alterando a anatomia dentária), dependendo das concentrações e do tempo de exposição ao fluoreto.

Diante de uma exposição prolongada ao fluoreto, toda a face de um mesmo dente é afetada. Entretanto, se houve períodos de não exposição ao fluoreto, existe a possibilidade de ocorrerem lesões restritas aos terços incisais ou cervicais, em que o esmalte é menos espesso (BUZALAF, 2008).

Devido ao aumento da prevalência da fluorose dentária, deve-se determinar corretamente a dose apropriada para produzir o máximo de redução de cáries, porém o mínimo de fluorose dentária (PAIVA; CURY, 2001). Para tanto, foram desenvolvidas pesquisas no intuito de determinar uma dose ideal de exposição ao flúor. O limite de ingestão de flúor capaz de evitar graus indesejáveis de fluorose dentária está estimado em torno de 0,05 a 0,07 mg F/kg p.c./dia (BURT, 1992; BUZALAF et al., 2001).

Estudos realizados em crianças (20 a 30 meses de idade) mostraram que os dentifrícios fluoretados contribuíram com 55% para a dose total de exposição diária ao flúor. Os dados deste trabalho mostram que, em média de 0,052 mg F/kg p.c./dia, as crianças estão expostas pelo dentifrício a uma dose próxima ao limite, conforme descrito acima. Entretanto, há crianças expostas a doses excessivamente altas (por exemplo, 0,185 mg F/kg p.c./dia). Isto poderia estar relacionado à ingestão de até 90% do dentifrício colocado na escova (LIMA; CURY, 2001). Pessan et al. (2003) observaram que, em crianças de 4 a 7 anos, o dentifrício foi sua principal

fonte de flúor ingerida, com percentuais de 57% e em média de 0,037 mg F/kg p.c./dia, com variabilidade de 0,000 a 0,155 mg de F/kg p.c./dia. O restante da ingestão de F foi pela dieta, na qual os valores foram em média 0,018 mg F/kg p.c./dia, variando de 0,002 a 0,045 mg de F/kg p.c./dia. Estudo de Almeida, et al. (2007) realizado em crianças de 1 a 3 anos encontrou valores ainda maiores nos valores máximos de F ingerido pelo dentífrico e pela dieta (0,401 e 0,070 mg F /kg p.c./dia, respectivamente).

Roldi et Cury (1986) realizaram uma pesquisa com voluntários de 20 a 30 anos de idade e observaram que após ingestão de 6g de pasta de dente suspensa em água destilada, os níveis na concentração plasmática de íon flúor foram significativos a partir de 30 minutos após a ingestão.

Rigalli et al. (1990) constataram uma diminuição da secreção de insulina tanto em pacientes, como em ratas, após ingerirem 0,84 e 16,8 mg/kg p.c. de NaF, respectivamente. Em estudos posteriores com ratos, Rigalli et al. (1995) demonstraram que NaF difundido no plasma afeta a homeostasia da glicose quando estiver acima de 5µmol/l. E além do mais, o fluoreto ocasiona inibição da glicólise (DOST et al., 1977) e hiperglicemia e depleção de glicogênio hepático, muscular e baço (CHEHOUD et al., 2008; DOST et al., 1977; HANDLER et al., 1946; SHASHI et al., 1988). Muitas destas respostas sugerem que o fluoreto pode ocasionar resistência à insulina. Vários autores correlacionaram resistência à insulina com a diminuição do sinal insulínico (CHOU et al., 1987; EBINA et al., 1987; KASUGA et al., 1982a; WHITE; KAHN, 1994). Se essa correlação for confirmada em estudos de tratamento crônico com NaF, reforçará a importância de se diminuir a concentração de fluoreto nos dentífricos utilizados principalmente por crianças (que geralmente

ingerem altas quantidades de pasta de dente) diabéticas, pois a ingestão de pasta dental contendo flúor pode levar à piora na situação de saúde destas crianças.

No presente estudo, a dose de flúor utilizada foi calculada com base nos valores máximos de ingestão de F pelo dentifrício (0,155 mg F/kg p.c./dia) e pela dieta (0,045 mg F/kg p.c./dia) descritos por Pessan, et al. (2003), e corrigida, ou seja, multiplicada por 20, de acordo com os valores de conversão determinados por Rigalli, et al. (1990). Esta dose foi utilizada porque Rigalli et al. (1990), realizando estudos em humanos e ratos, observaram que eles precisavam aumentar, nesta proporção, a dose de flúor administrada nos ratos em relação à administrada nos humanos para atingir um pico plasmático similar em ambos os modelos. E isto provavelmente deve-se à grande diferença na taxa de “turnover” do osso (RIGALLI et al., 1990). Convém salientar que recentemente publicamos um artigo na revista Fluoride (CHEHOUD et al., 2008), no qual avaliamos o efeito agudo do NaF na sensibilidade à insulina e na transdução do sinal insulínico, e o cálculo utilizado neste trabalho foi o mesmo do presente projeto.

Sabe-se que, em crianças, as duas grandes fontes de ingestão de fluoreto são a dieta e o dentifrício (BUZALAF, 2008). Na maioria dos estudos realizados em crianças pequenas, nos quais se estimou a ingestão diária total de F, o dentifrício foi considerado como o principal colaborador na ingestão total de F (ALMEIDA et al., 2007). Convém salientar que no projeto proposto, a dose a ser utilizada será menor que os valores máximos de ingestão de F do trabalho publicado por Almeida et al. (2007), no qual as doses máximas de F provenientes do dentifrício e da dieta foram 0,401 e 0,070 mg/kg/dia, respectivamente. Esta discordância de resultados pode ser decorrente da diferença entre as idades das crianças (1 a 3 anos de idade) avaliadas no trabalho de Almeida et al. (2007) e das crianças (4 a 7 anos de idade)

do trabalho de Pessan, et al. (2003), pois crianças com menor idade tendem a ingerir mais dentifrício e leite em pó combinado com água. Ademais, o leite em pó mais a água são responsáveis pela maior parte da ingestão de F pela dieta (ALMEIDA et al., 2007).

O presente estudo baseou-se no trabalho de Pessan, et al. (2003) ao invés dos estudos de Almeida et al. (2007), pois sabemos que o pico de incidência de *diabetes melitus* é entre 3 e 5 anos de idade e um outro pico no início da puberdade, entre os 12 e 14 anos (KAUFMAN et al., 2002).

2 OBJETIVO

Sabendo-se que o fluoreto pode alterar o metabolismo de carboidratos, tornou-se fundamental caracterizar o efeito do tratamento crônico com NaF sobre: 1) a sensibilidade à insulina; 2) o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), após o estímulo insulínico, em tecido muscular esquelético e hepático; 3) fluoremia, glicemia e insulinemia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar machos (52 animais) de 1 mês de idade foram mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}$ C. Antes de iniciar o tratamento com fluoreto (F) foi aferida a concentração de F na ração LABINA (Indústria de rações do Brasil LTDA, Paulínia, Brasil). Os ratos foram castrados e após 30 dias foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) grupo controle (CN), 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 fluoreto de sódio; 2) grupo fluoreto de sódio (FN) que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Durante este período, o peso corpóreo e a ingestão de ração e hídrica foram aferidos a cada 2 ou 3 dias. Após 6 semanas, os ratos foram submetidos ao jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Thiopentax[®] 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob anestesia, foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se o sangue pela veia cava inferior, e as amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800 g (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -20°C até o dia da quantificação de glicemia, de insulinemia e fluoremia.

Outro grupo de animais foi submetido ao teste endovenoso de tolerância à insulina. Estes animais também foram anestesiados, conforme descrito acima, e, sob esta anestesia, foi realizada a canulação da veia jugular direita (cânula de

“Sylastic”), introduzindo-se a mesma até a proximidade do átrio (veia cava superior). Esta cânula serviu para a injeção de insulina que foi ministrada na dose de 0,75U / kg p.c.. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Outro grupo de animais foi utilizado para quantificar, em tecidos muscular esquelético (gastrocnemius) e hepático, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico. Nestes experimentos, os animais foram anestesiados conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta) em tempos variáveis (30s para tecido hepático e 90s para o tecido muscular).

3.2 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto

Os testes foram realizados pela manhã, após jejum de 14 horas. Os animais foram anestesiados e, sob esta anestesia, realizou-se a canulação da veia jugular direita (cânula de “Sylastic”), introduzindo-se a mesma até a proximidade do átrio (veia cava superior). Esta cânula serviu para a injeção de insulina que foi ministrada na dose de 0,75U / kg p.c.. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $\ln^2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, ou seja $t_{1/2} = \ln^2/\text{coeficiente de } x$ (BONORA et al., 1989).

3.3.1 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2)

3.3.2 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24.000 rpm durante 10 s) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM, Pirofosfato de Na 10 mM, Ortovanadato de Na 10 mM), e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 min, transferidos para gelo, e então centrifugados 16.000g durante 40 min (4 °C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), e para estoque em tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%).

3.3.3 “Western blotting”

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por GARFIN (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o

gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 6%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0,115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

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

Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares da Amersham Biosciences (Full Range Rainbow - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

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

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

- **Imunodeteção**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER & HAMMOND, 1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2h à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpo antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de "horseradish" ("kit" de quimioluminescência -ECL- Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL- Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR).

A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se um programa da Media Cybernetics – GEL-PRO ANALYSER - Hartland, USA.

3.4 Determinação da concentração de íon flúor no plasma sanguíneo

Para a análise do flúor no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , que teve que ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (60X15 mm) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico a 6 M saturado por hexametil-disiloxano (HMDS - Aldrich) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Esta solução (denominada de ácido aquecido) foi previamente aquecida até que seu volume 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 6 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Tecnal, modelo TE 141) em velocidade 2-3, por 12 horas. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota final, contendo todo o flúor da amostra, foi analisada com um eletrodo específico para o íon flúor (Orion Research, Cambridge, Mass., USA, modelo 9409) e um 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).

3.5 Determinação da concentração de íon flúor na ração

A dosagem de F na ração (0,2 g de amostra) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por TAVES (1968), modificada por WHITFORD (1996), conforme descrito acima.

3.6 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

Este é um método enzimático, específico para quantificação de glicose (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

No método de glicose-oxidase, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada. A H_2O_2 , em presença de peroxidase, produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, dando origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda.

Para a dosagem de glicemia foram utilizados 10 μ L da amostra ou de padrão (100mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 505 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

1. Glicose (mg/dl) = (Absorbância do teste $\div$ Absorbância do padrão) x 100
2. Fator de calibração = 100 $\div$ Absorbância do padrão
3. Glicose (mg/dl) = Absorbância do teste x Fator
4. Glicose (mmol/L) = mg/dl x 0,0556

3.7 Determinação de insulinemia

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIE (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA).

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 de massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, mais foi formado complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

Para a dosagem da insulinemia foram pipetados 200µL de amostras de plasma ou dos padrões (0, 5, 15, 50, 100, 200 e 350 µIU/mL) nos tubos do “kit” que contém anticorpo frio de insulina. Adicionou-se 1,0 mL de insulina ¹²⁵I a todos os tubos. Esta solução foi bem homogeneizada, e incubada por 18 horas em temperatura ambiente para que ocorra a reação de ligação competitiva de insulina fria e da marcada pelo anticorpo. Terminada a incubação, todo o líquido foi descartado, restando no fundo do tubo o complexo hormônio-anticorpo, e deste, foi quantificada a emissão de radiação gama da curva padrão e das amostras de plasma. As insulinemias de ratos foram aferidas nesta curva padrão.

3.8 Análise da resistência à insulina

A resistência à insulina foi avaliada por dois índices: a) HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue:
$$\text{HOMA - IR} = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (µUI/ml)} / 22,5$$
 (LIMA et al., 1998); b) velocidade de desaparecimento de glicose, Kitt, calculada

pela fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al., 1989).

3.9 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Peso corporal (g)

Os resultados do peso corporal dos grupos CN e FN, do início aos 42 dias de observação, estão ilustrados na Figura 2. Neste parâmetro não houve diferença estatística entre os dois grupos durante esse período.

Figura 2- Peso corpóreo (g) de ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 17 (CN) e 17 (FN) animais.

4.2 Ingestão alimentar (g)

A ingestão alimentar avaliada (a cada 2 ou 3 dias, totalizando 19 aferições ao longo de 42 dias) e resumida na Figura 3, mostrou que o grupo FN ingere ração a mais em relação ao grupo CN no 6º, 13º, do 20º ao 38º (exceto no 31º, 34º) dia no qual foi aferida a ingestão alimentar.

A tabela 1 mostra que a média da somatória da ingestão alimentar total diária dos animais do grupo FN (n=17) é significativamente maior que a dos ratos do grupo controle (n=17). E a tabela 2 mostra que a somatória da ingestão total durante 42 dias do grupo FN foi 4% maior do que a do grupo controle CN.

Figura 3- Ingestão alimentar de ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM de 17 (FN) e 17 (CN) animais.

* $p < 0,05$ FN vs. CN

Tabela 1- Média da somatória da ingestão alimentar (g) total diária de 17 animais controle (CN) e tratados com flúor (FN) durante 42 dias

Ingestão diária (g)	
CN	FN
391,5 ± 2,542	406,6 ± 1,587*

Valores são média ± EPM de 17 ratos

*p<0,05 FN vs. CN

Tabela 2- Somatória da ingestão total de ração (g) durante 42 dias dos grupos controle (CN) e tratado com flúor (FN) de 17 animais

Ingestão total (g)		
	CN (n=17)	FN (n=17)
Valor absoluto	17.294,95	17.929,05
Valor em %	100%	104%

n= nº de animais

4.3 Glicemia, insulinemia e fluoremia

A Tabela 3 mostra as características dos ratos. Observa-se que houve aumento significativo (p<0,05) na fluoremia do Grupo FN. Entretanto, não foram observadas diferenças nas glicemias e insulinemias entre os dois grupos estudados. A partir desses valores, calculou-se o índice HOMA-IR para a verificação da presença de resistência à insulina. Por esta tabela constata-se que o valor do índice de HOMA-IR foi significativamente maior no grupo FN (p<0,05).

Tabela 3- Características dos ratos CN e FN

Parâmetros	CN	FN
Fluoremia (µg F/mL)	0,0496 ± 0,0038	0,121 ± 0,00814*
Glicemia (mmol/L)	6,567 ± 0,1521	6,935 ± 0,1365
Insulinemia (µU/mL)	5,543 ± 0,769	7,236 ± 0,781
HOMA IR	1,526 ± 0,154(21)	2,208 ± 0,2613*

Valores são média ± EPM de 10 ratos. O índice de HOMA-IR foi calculado utilizando-se glicemia (mmol/L) e insulinemia (µU/mL) de jejum.

*p<0,05 FN vs. CN

4.4 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT)

A Figura 4 mostra, graficamente, a velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}), durante o teste de tolerância à insulina, realizado nos primeiros 16 minutos após infusão do hormônio, nos animais CN e FN. O grupo tratado com fluoreto de sódio (FN) apresentou uma velocidade de desaparecimento de glicose (K_{itt}) significativamente menor em relação ao grupo controle (CN).

Figura 4- Velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) em ratos castrados do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O K_{itt} foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo.

* $p < 0,05$ FN vs. CN.

4.5 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) em músculo gastrocnêmio

A figura 5A mostra uma autorradiografia típica referente ao grau de fosforilação em tirosina da pp185, antes e após o estímulo insulínico, no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio). A figura 5B mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. Em ambos os grupos, verificou-se que após o estímulo insulínico houve um aumento no grau de fosforilação da pp185 com relação ao estado basal, ou seja, sem a estimulação insulínica imposta. Comparando-se os dois grupos (CN e FN), observou-se que no estado basal não houve diferenças significativas na fosforilação em tirosina da pp185. Entretanto, após estímulo insulínico constatou-se redução ($\downarrow$ 31%) significativa ($p < 0,05$) no grau de fosforilação em tirosina da pp185 no grupo FN.

Figura 5- Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2), no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio) do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F ingerido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Em **A**, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas ao SDS-PAGE (185µg). Em **B**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM de 6 experimentos.

* $p < 0,05$ Insulina (-) vs. Insulina (+).

$p < 0,05$ FN (+) vs. CN (+).

4.6 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido hepático

A Figura 6A mostra uma típica imagem referente ao grau de fosforilação em tirosina da pp185, antes e após o estímulo insulínico, no tecido hepático. A Figura 6B mostra os resultados expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. Observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no grau de fosforilação deste substrato, após estímulo insulínico, em relação ao estado basal tanto no grupo FN como no grupo CN, mas não houve diferenças significativas nestes dois parâmetros (estado basal e sob estímulo insulínico) entre os ratos controles e FN.

Figura 6- Efeito do estímulo insulínico sobre o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2), no tecido hepático do grupo controle (CN) e do grupo fluoreto de sódio (FN), que foi submetido ao tratamento com NaF administrado na água de beber e F contido na ração comercial (total de F inferido: 4,0 mg de F /kg p.c./dia na forma de NaF) durante 42 dias. Em **A**, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas ao SDS-PAGE (185µg). Em **B**, valores do grau de fosforilação em tirosina, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM de 6 experimentos.

* $p < 0,05$ Insulina (-) vs. Insulina (+)

5 DISCUSSÃO

A resistência à insulina é um mecanismo chave na fisiopatologia do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), assim como de suas alterações degenerativas. A investigação das alterações do mecanismo de ação da insulina presentes na resistência a este hormônio representa um passo importante na busca de mecanismos preventivos e/ou curativos para o DM2.

Em mamíferos, a insulina é o principal hormônio no controle da glicemia: estimulando a utilização de glicose nos tecidos muscular e adiposo, e no tecido hepático, inibindo gliconeogênese e a glicogenólise e estimulando a síntese de glicogênio. Este hormônio age também modificando a expressão ou atividade de uma série de enzimas e sistemas de transporte. Além disso, como a insulina é um hormônio anabólico, estimula a síntese de triacilglicerol e proteínas, assim como a captação de lipídeos circulantes e aminoácidos, promovendo assim o armazenamento de substratos e o crescimento celular (KAHN et al., 2009).

Segundo Cesaretti e Kohlmann Júnior (2006), resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta biológica subnormal, como por exemplo, diminuição na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e adiposas. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas, para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se, desta forma, os níveis circulantes de insulina e, portanto, a situação de resistência a ela se faz acompanhada de hiperinsulinemia.

Na maioria das vezes, o termo resistência à insulina é empregado tendo-se como referência o controle glicêmico, refletindo um efeito inadequado da insulina na homeostase da glicose. No entanto, a insulina tem ações pleiotrópicas, modulando

diversas funções celulares, como por exemplo, o metabolismo de lipídeos e proteínas, o transporte de íons e aminoácidos, a proliferação e o ciclo celular, a diferenciação celular, apoptose e a síntese de óxido nítrico (NO). Assim, quando consideramos situações de resistência à insulina, não devemos levar em conta apenas o metabolismo de glicose, mas sim toda a gama de ações metabólicas e de crescimento da insulina. Devemos considerar, também, que a resistência à insulina pode afetar essas funções de forma heterogênea (CARVALHO-FILHO et al., 2007).

Essa resistência hormonal ainda pode ser dividida em estados nos quais há desvio para a direita na dose-resposta do hormônio, mas a resposta máxima permanece normal (sensibilidade diminuída à insulina) ou estados em que a dose-resposta está normal, mas a resposta máxima está diminuída (responsividade diminuída), ou uma combinação dos dois. Esta resistência hormonal é extremamente comum, ocorrendo tanto em estados de doenças como o diabetes tipo 2, obesidade, hipertensão, doença ovariana policística e uma variedade de síndromes genéticas quanto em condições fisiológicas como puberdade e gestação (KAHN et al., 2009; REUSCH, 2002; TAYLOR; ARIOGLU, 1998). A resistência à insulina também está presente em muitos estados de estresse, em associação com a infecção e secundária ao tratamento com uma variedade de drogas, particularmente o glicocorticóides (KAHN et al., 2009).

Segundo Kahn et al. (2009), de uma perspectiva molecular, a resistência insulínica pode ocorrer em vários níveis: 1) pré-receptor: é rara hoje em dia, mas antigamente era exemplificado por pacientes com altos níveis de anticorpos circulantes contra insulina, que bloqueavam a ligação do ligante ao seu receptor; 2) receptor: pode resultar de alterações genéticas na expressão do receptor ou sua estrutura, como alterações na atividade do receptor devido à fosforilação em serina;

3) pós-receptor: pode ocorrer em quase todos os locais, em uma das vias comuns ou ramificadas da sinalização insulínica.

Nos estados mais comuns de resistência à insulina, parece haver defeitos em vários níveis. Por exemplo, no diabetes tipo 2 há redução na concentração do receptor, na atividade quinase do receptor, na concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, na atividade da PI3-quinase e na translocação do transportador de glicose, bem como em defeitos na atividade das enzimas intracelulares (CARO et al., 1989; CUSI et al., 2000; KAHN et al., 2009). Fato curioso no diabetes tipo 2, é que parece não haver uma redução na ação da insulina na via da MAP quinase. Esse bloqueio da via da PI3-quinase com uma sinalização continuada da MAP quinase pode ser responsável por alguns dos efeitos prejudiciais da hiperinsulinemia.

Nos últimos anos, um aumento da incidência *diabetes mellitus* (DM) vem ocorrendo, com tendência de crescimento na próxima década (MOKDAD et al., 2000; SCHAAN et al., 2003). As complicações do DM, tanto micro como macrovasculares, são consideradas como uma das maiores ameaças à saúde em todo mundo, com imensos custos econômicos e sociais (GEORG et al., 2005; VERROTI et al., 2003).

A doença cardiovascular é responsável por até 80% das mortes em indivíduos com DM (SCHAAN et al., 2003). De fato, o risco relativo de morte por eventos cardiovasculares ajustado para a idade em diabéticos é 3 vezes maior do que da população em geral (STAMLER et al., 1993).

As razões para a aterosclerose acelerada manifestada com DM ainda não são completamente compreendidas, tendo sido sugeridos como mecanismos prováveis os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco (HAFFNER et al., 1998). O

aumento de glicose intra-celular é o principal determinante do dano tecidual causado pelo DM, dano este que pode ser reversível quando restaurada a condição de normoglicemia, ou irreversível, mesmo que revertida a hiperglicemia, pois originou-se de alterações acumulativas em macro-moléculas de vida longa (NISHIKAWA et al., 2000).

Hiperglicemia também ocorre por tratamento agudo ou prolongado com altas doses de fluoreto de sódio (APPLETON, 1995; GRUCKA-MAMCZAR et al., 2004; RIGALLI et al., 1990, 1995; SAKURAI et al., 1993) evidenciando que a homeostase da glicose sofre influência do NaF e esta alteração é similar a do observado em *diabetes mellitus*.

O mecanismo pelo qual NaF induz hiperglicemia pode envolver um ou mais fatores, tais como, a) aumento na glicogenólise devido ao aumento de AMPc (ALLMANN; KLEINER, 1980); b) incremento na liberação de adrenalina (ALLMANN; KLEINER, 1980; MCGOWN; SUTTIE, 1977; c) ativação ou inibição de certas enzimas (ALLMANN; KLEINER, 1980); d) redução na secreção de insulina que provavelmente aumenta a taxa de glicogenólise e gliconeogênese e diminui a taxa de glicólise e síntese de glicogênio (RIGALLI et al., 1990).

Entretanto, tanto os valores das glicemias como insulinemia de jejum do presente trabalho não apresentaram alteração no grupo FN, em comparação ao grupo controle. Este resultado pode ser decorrente do tempo em que os animais ficaram sem a solução de NaF. A atividade do rato varia ao longo do período de 24h: aumenta a partir das 16h e diminui novamente ao redor das 4h (SUMIDA, 1996). Os experimentos foram realizados às 9h, e isto significa que os animais praticamente ficaram sem NaF durante 4 horas. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Rigalli et al. (1990) e Menoyo et al. (2008), que demonstraram que

após 4 h da infusão com solução contendo NaF (16,8 mg/kg. de p.c.) a glicemia e a insulinemia retornaram a valores basais ou seja, antes da infusão de NaF. E eles também relatam que o retorno da insulinemia a valores normais está relacionado com a diminuição de F nos tecidos moles (fígado e rins). Entretanto, os valores de F nestes tecidos e plasma após este mesmo período não retornaram a valores normais. Em nossos estudos, também observamos que a fluoremia do grupo FN (0,121 $\mu\text{g/mL}$) foi maior em relação ao grupo CN. Entretanto, essa maior concentração de NaF no plasma não ocasionou uma diminuição na secreção de insulina. Este resultado corrobora os estudos de Menoyo et al. (2008) que demonstraram que somente uma fluoremia acima de 0,209 $\mu\text{g/mL}$ causa diminuição na secreção de insulina. Rigalli et al. (1992) também observaram que o tratamento crônico com 5 mM de NaF na água de beber em ratos não alterou tanto a glicemia como a insulinemia e salientamos que este estudo também foi realizado entre 9 e 10h da manhã.

Reconhecendo a influência do NaF sobre o processo de homeostase da glicose, tornou-se importante a realização de estudos para averiguação dos métodos de utilização do fluoreto e suas consequências sobre o organismo.

O presente estudo constatou que o grupo tratado cronicamente com NaF apresentou diminuição na sensibilidade à insulina em relação ao grupo controle, demonstrada tanto pelo aumento no índice de HOMA-IR como pela diminuição da velocidade de decaimento da glicose (Kitt), durante o teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT). Estes achados podem indicar a ocorrência de uma menor eficiência alimentar no grupo FN, pois este grupo ingeriu mais ração, no entanto não apresentou diferença no peso corpóreo em relação ao grupo controle. Menoyo et al. (2008) também observaram um aumento de resistência à insulina após uma única

dose de NaF (16,8 mg/kg p.c.). Entretanto, Chehoud et al. (2008) demonstraram que o tratamento agudo com NaF (3,1 mg NaF/kg p.c.) não ocasionou alteração na sensibilidade à insulina. Esta discordância de resultados destes dois últimos estudos pode ser resultante da diferença na dose de NaF utilizada.

Como foi mencionado anteriormente, a fosforilação em tirosina de receptor de insulina é importante para a sinalização insulínica. A ativação do receptor de insulina é altamente regulada, e alterações nesta ativação podem promover grandes conseqüências metabólicas (FRÖJDÖ et al., 2009; TANIGUCHI et al., 2006). Diminuição na atividade do receptor é uma característica comum em quadros de resistência à insulina, como DM2 e obesidade. Um aumento na fosforilação em serina de IRS-1 leva a menor fosforilação em tirosina de IR e IRS, ocasionando inibição do sinal insulínico. A inibição do sinal em FN pode ser também devida a outros fatores, como a uma maior atividade de proteínas tirosinas fosfatases, como PTP1B. Esta fosfatase interage diretamente com o receptor de insulina e desfosforila, importantes resíduos tirosina, portanto, reduzindo sua atividade. Camundongos *knockout* para PTP1B têm aumento da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e das proteínas IRS no músculo, consequentemente apresentam aumento da sensibilidade à insulina (ELCHEBLY et al., 1999). Outras proteínas também podem diminuir a função do receptor de insulina bloqueando sua interação com proteínas IRS ou modificando sua atividade quinase, tais como supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3), proteína 10 ligada a receptor de fator de crescimento (Grb10) e glicoproteína-1 de membrana plasmática celular (PC1).

Portanto, a partir dos nossos resultados, podemos inferir que a resistência à insulina observada em FN pode ser decorrente da diminuição no grau de

fosforilação em tirosina da pp185 em músculo esquelético (gastrocnêmio) de ratos FN em relação ao CN.

Esses resultados estão de acordo com os estudos *in vitro* de VIÑALS et al. (1993, 1997), em receptores de insulina isolados de tecido muscular de ratos e placenta humana, nos quais demonstraram que o fluoreto induziu uma diminuição na autofosforilação induzida por insulina e fosforilação dos substratos exógenos usados. Entretanto, Chehoud et al. (2008), utilizando uma dose menor, observaram que o tratamento agudo *in vivo* com NaF não induziu alteração significativa no grau de fosforilação da pp185, após o estímulo insulínico, tanto no gastrocnêmio como no adiposo branco.

Após a estimulação insulínica, o receptor fosforila diretamente as proteínas IRS. Esta fosforilação em tirosina destas proteínas cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a SRC 2 (SH2). As proteínas SH2 que se ligam às proteínas IRS fosforiladas são divididas em duas categorias principais. As mais bem estudadas são as moléculas adaptadoras, como a subunidade regulatória da PI 3-quinase ou a molécula GrB2, que se associa com a SOS para ativar a via da proteína quinase ativada por Ras-mitógeno (MAPK) (SALTIEL; KAHN, 2001; CHEATHAM; KAHN, 1995; JHUN et al., 1994; SKOLNIK et al., 1993). A outra categoria importante de proteínas que se liga às proteínas IRS são as enzimas, como a fosfotirosina fosfatase SHP2 (CASE, et al., 1994; KUHNE, et al., 1993) e as tirosinas quinases citoplasmáticas, como FYN (KAHN et al., 2009).

As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta retardo de crescimento, resistência à insulina, primariamente no músculo e na

gordura, mas não é hiperglicêmico (ARAKI et al., 1994; FONSECA et al., 1998; YAMAUCHI et al., 1996). Foi demonstrado que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo *knockout* de IRS-1. O camundongo que não expressa o IRS-2 (WITHERS et al., 1998) apresenta resistência à insulina, mas primariamente no fígado, e hiperglicemia acentuada devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e à falência da atividade secretória das células β , acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas (WITHERS et al., 1998; KUBOTA et al., 2000). Em contraste, camundongos *knockout* para o IRS-3 têm crescimento e metabolismos normais, enquanto os camundongos *knockout* para o IRS-4 exibem anormalidades mínimas na tolerância à insulina (FANTIN et al., 2000; LIU et al., 1999;).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (CARVALHEIRA et al., 2002a). Estudos recentes indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente da ativação seqüencial da proteína quinase C (PKC) e da quinase inibidora do fator nuclear $\kappa\beta$ (IKK β) (KIM et al., 2001; YUAN et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que o TNF- α ativa a SK6 (p70S6k- uma serina quinase), através do IKK β , e que SK6 fosforila diretamente o IRS-1 em múltiplos resíduos de serina para inibir a sinalização insulínica (ZHANG et al., 2008).

No tecido hepático, não observamos alteração na fosforilação em tirosina da pp185. Estas respostas estão de acordo com modelos de resistência à insulina, como os ratos transgênicos (TG) com excesso crônico de hormônio de crescimento (CHO et al., 2006). Similarmente aos nossos resultados, observou-se que esses animais TG apresentaram em relação ao grupo controle: 1) resistência à insulina sem hiperglicemia; 2) nenhuma alteração na fosforilação do receptor de insulina após estímulo insulínico no tecido hepático. Por outro lado, foram observados em fígado de ratos TG, após estímulo insulínico: a) uma redução na fosforilação de IRS-1; b) um aumento significativo na fosforilação de IRS-2. No caso de nossos resultados, como a pp185 contém tanto IRS-1 como IRS-2, a inexistência de alteração do grau de fosforilação desta proteína pode ser decorrente do equilíbrio proveniente entre o aumento e a diminuição da fosforilação em tirosina de IRS-2 e de IRS-1, respectivamente. Cho et al. (2006) sugerem que esses resultados encontrados no tecido hepático de ratos TG podem compensar a resistência à insulina encontrada em tecido adiposo e muscular para prevenir a hiperglicemia. Recentemente, o tecido hepático tem mostrado ser importante na manutenção da homeostase lipídica e glicídica em ratos knockout para GLUT4 músculo-específicos (KOTANI et al., 2004). Estes achados sugerem que o prejuízo na regulação glicídica dependente da insulina provocada pelo excesso crônico de hormônio de crescimento nos tecidos adiposo e muscular, é compensado pela regulação da glicose no fígado e que a sinalização da insulina através da IRS-2 no tecido hepático, em condições de excesso de hormônio de crescimento, promove aumento na síntese de lipídio e glicogênio, resultando no acúmulo dos mesmos no fígado. Convém salientar que, conforme descrito acima, o IRS-2 tem grande importância na resistência à insulina, primariamente no fígado.

Em suma, observamos que o tratamento crônico com NaF (com dose baseada em valores máximos de ingestão de F pelo dentifrício e pela dieta de criança em torno de 4-7 anos) em ratos promoveu uma diminuição de sensibilidade à insulina e alterações no sinal insulínico em tecido muscular, mas não no fígado. Convém salientar que esta dose utilizada foi bem acima da preconizada (0,05 a 0,07 mg/F/dia/kg) por Burt (1992), para evitar graus indesejáveis de fluorose dentária. Portanto, essa dose além de aumentar o risco de aparecimento de fluorose, também pode ocasionar resistência à insulina.

Como citado anteriormente, o fluoreto, ministrado em doses adequadas, tem sido usado de diversas maneiras na prevenção da cárie dental. Entre os vários métodos de utilização do flúor, o uso do dentifrício fluoretado associado a outros métodos, como a água de abastecimento público têm sido os grandes responsáveis pelo declínio desta doença (NARVAI, 2000; PAIVA; CURY, 2001).

Entretanto, se o fluoreto for consumido em excesso observa-se um aumento da fluorose dentária. Alguns estudos foram realizados no intuito de averiguar a dose em que as crianças estão expostas ao flúor (LIMA; CURY, 2001; PESSAN et al., 2003). Pessan et al. (2003) demonstraram que somente pelo dentifrício, as crianças podem ingerir até 0,155 mg/F/dia/kg. Esta dose está acima da dose preconizada por Burt (1992) citada acima.

RAMIREZ e BUZALAF (2007) relatam que o aumento na prevalência da fluorose dentária tem sido associado essencialmente ao uso precoce de dentifrícios fluoretados, uso indiscriminado de suplementos fluoretados na dieta e o consumo prolongado de fórmulas infantis. Estima-se que mais de 60% da fluorose observada atualmente é consequência da ingestão das diferentes fontes de flúor, que não a água de abastecimento público. (RAMIREZ; BUZALAF, 2007).

Convém salientar que além do abastecimento público de água e dentifrício fluoretado, o flúor também é consumido através das bebidas e alimentos. O flúor está presente em quantidades significativas nos chocolates em barra, bolachas (BUZALAF et al., 2003) cereais matinais e salgadinhos (CARDOSO et al., 2003) que são guloseimas altamente apreciadas pelas crianças. Concentrações significativas de flúor também foram encontradas no chá preto e em bebidas a base de chá com potencial de expor uma criança a doses mais altas do que a dose limite de 0,07mg F/kg/dia (HAYACIBARA et al., 2004). Outro aspecto importante é o fato de que o benefício da fluoretação da água de abastecimento tem uma ação difusa (fenômeno da difusão), ou seja, os produtos e bebidas processados em áreas fluoretadas acabam beneficiando áreas não fluoretadas, onde são consumidos (RAMIREZ; BUZALAF, 2007). Portanto, há necessidade de controle ou até mesmo da diminuição de produtos fluoretados em locais com fluoretação da água de abastecimento, pois isso pode ocasionar ingestão de fluoreto acima da dose limite, principalmente por crianças e adolescentes portadores de *diabetes mellitus* tipo 2, no qual o flúor poderá potencializar o efeito da doença, se for consumido em doses excessivas.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o tratamento crônico com NaF promoveu:

- diminuição na eficiência alimentar;
- aumento significativo na fluoremia;
- nenhuma alteração na glicemia e insulinemia;
- diminuição na sensibilidade à insulina;
- redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 no tecido muscular, após o estímulo insulínico;
- nenhuma alteração no grau de fosforilação em tirosina da pp185 no tecido hepático, após o estímulo insulínico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabendo que o NaF pode alterar o metabolismo de carboidratos em doses altas, é recomendável diminuir a concentração (1100 ug F/g) de fluoreto nos dentifrícios utilizados principalmente por crianças diabéticas, pois a ingestão de pasta dental contendo flúor pode levar à piora na situação de saúde destas crianças.

Os estudos “in vitro” de Brighenti et al. (2006) demonstraram que o dentifrício acidificado (pH=5,5) com 550 ug F/g apresentou as mesmas ações anticariogênicas que a pasta neutra com 1100 ug F/g. Alves et al. (2007) utilizando uma pasta mais acidificada (pH=4,5) com 412 e 550 ug F/g também observaram que estes cremes dentais ácidos apresentavam a mesma eficácia do dentifrício neutro (pH=7,0) com 1100 ug F/g e pasta comercial com 1100 ug F/g.

Se esses dentifrícios (acidificados com baixo teor de F) fossem testados em humanos, e constatadas suas eficácias, seriam uma ótima opção para crianças pequenas que normalmente ingerem grandes quantidades de dentifrício, com grande impacto para a saúde das diabéticas, conforme descrito acima.

Em relação ao alto consumo de dentifrício fluoretado pelas crianças, os pais devem estar atentos, informados e supervisionar a escovação de seus filhos.

REFERÊNCIAS

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

ALLMANN, D.W.; KLEINER, H.S. Effect of NaF on rat tissue cAMP levels in vivo. **Pharmacol. Ther. Dent.**, v.5, n. 3-4, p.73-78, 1980.

ALMEIDA, B.S.; CARDOSO, V.E.S.; BUZALAF, M.A.R. Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1-to 3-year-old brazilian children. **Comm. Dent. Oral. Epidemiol.**, v.35, n.1, p.53-60, Feb. 2007.

ALVES, K.M.R.P.; PESSAN, J.P.; BRIGHENTI, F.L.; FRANCO, K.S.; OLIVEIRA, F.A.L.; BUZALAF, M.A.R.; SASSAKI, K.T.; DELBEM, A.C.B. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. **Caries Res.**, v.41, n.4, p.263-267, 2007.

APPLETON, J. Changes in the plasma electrolytes and metabolites of the rat following acute exposure to sodium fluoride and strontium chloride. **Arch. Oral Biol.**, v.40, n.4, p.265-268, 1995.

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

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

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.68, n.2, p.374-378, Feb. 1989.

BRIGHENTI, F.L.; DELBEM, A.C.B; BUZALAF, M.A.R.; OLIVEIRA, F.A.L.; RIBEIRO, D.B.; SASSAKI, K.T. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. **Caries Res.**, v.40, n.3, p.239-244, 2006.

BUREN, J; LIU, H.X; LAURITZ, J; ERIKSSON, J.W. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitization in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. **Eur. J. Endocrinol.**, v.148, n.1, p.157–167, Jan. 2003.

BURT, B.A. The changing patterns of systemic fluoride intake. **J. Dent. Res.**, v.71, n.5, p.1228-1237, May. 1992.

BUZALAF, M.A.R. **Fluoretos e saúde bucal**. São Paulo: Santos, 2008. 316p.

BUZALAF, M.A.R.; CURY, J.A.; WHITFORD, G.M. Fluoride exposures and dental fluorosis: a literature review. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.9, n.1/2, p.1-10, Jan./Jun. 2001.

BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M.; CARDOSO, V.E.S.; SILVA, T.L.; OLYMPIO, K.P.K. Fluorine content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.17, n.2, p.223-227, Jul./Sep. 2003.

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

CARDOSO, V.E.S.; OLYMPIO, K.P.K; GRANJEIRO, J.M.; BUZALAF, M.A.R. Fluoride content of several breakfast cereals and snacks found in Brazil. **J. Appl. Oral Sci.**, v.11, n.4, p. 306-310, Oct./Dec. 2003.

CARO, J.F.; DOHM, L.G.; PORIES, W.J.; SINHA, M.K. Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. **Diabetes Metab. Rev.**, v.5, n.8, p.665-689, Dec. 1989.

CARVALHEIRA, J.B.C.; RIBEIRO, E.B.; GUIMARÃES, R.B.; TELLES, M.M.; VELLOSO, L.A.; GONTIJO, J.A.R.; SAAD, M.J.A. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes**, v.51, suppl.2, p.A41, Jun. 2002a. (Abstract)

CARVALHEIRA, J.B.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina. **Hipertensão**, v.5, n.1, p.33-38, Jun. 2002b.

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

CARVALHO-FILHO, M.A.; CARVALHEIRA, J.B.C.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.51, n.2, p.195-203, Mar. 2007.

CASE, R.D.; PICCIONE, E.; WOLF, G.; BENETT, A.M.; LECHLEIDER, R.J.; NEEL, B.G.; SHOELSON, S.E. SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by

direct interaction with platelet-derived growth factor β -receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate 1-derived phosphopeptides. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.14, p.10467-10474, Apr. 1994.

CESARETTI, M.L.R.; KOHLMANN, JR.O. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.50 , n.2, p.190-197, May. 2006.

CHEATHAM, B.; KAHN, C.R. Insulin action and insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, v.16, n.2, p.117-142, Apr. 1995.

CHEHOUD, K. A.; GARBIN, C. A. S.; SASSAKI, K. T.; CHIBA, F. Y.; SUMIDA, D. H. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. **Fluoride**, v.41, n.4, p.270-275, Oct./Dec. 2008.

CHO, Y.; ARIGA, M.; UCHIJIMA, Y.; KIMURA, K.; RHO, J.; FURUHATA, Y.; HAKUNO, F.; YAMANOUCHI K.; NISHIHARA M.; TAKAHASHI S. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. **Endocrinology**, v.147, n.11, p.5374-5384, Nov. 2006.

CHOU, C.K.; DULL, T.J.; RUSSEL, D.S.; GHERZI, R.; LEWOHL, 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.

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

CURY, J.A. Representatividade dos dentifrícios fluoretados no mercado brasileiro e sua confiabilidade como método preventivo. São Paulo: Associação Brasileira de Odontologia Preventiva, 1989.

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 PI3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J. Clin. Invest.**, v.105, n.3, p.311-320, Feb. 2000.

DE LA SOTA, M.; PUCHE, R.; RIGALLI, A.; FERNÁNDEZ, L.M.; BENASSATI, S.; BOLAND, R. Modificaciones en la massa osea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahia Blanca con alta ingesta espontanea de flúor. **Medicina** (B Aires), v.57, n.4, p.417-420, 1997.

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.

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

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

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A.L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C.C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M.J.; TREMBLAY, M.L.; KENNEDY, B.P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v.283, n.5407, p.1544-1548, Mar. 1999.

FARESE, R.V. Functions and dysfunctions of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin resistant states. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.283, n.1, p.E1-11, Jul. 2002.

FARESE, R.V.; SAJAN, M.P.; STANDAERT, M.L. Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. **Biochem. Soc. Trans.**, v.33, n.PT.2, p.350-353, Apr. 2005.

FANTIN, V.R.; WANG, Q.; LIENHARD, G.E.; KELLER, S.R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.278, n.1, p.E127-133, Jan. 2000.

FONSECA, V.A.; VALIQUETT, T.R.; HUANG, S.M.; Ghazzi, M.N.; Whitcomb, R.W. Troglitazone monotherapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, controlled study. The troglitazone study group. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v.83, p.3169-76, 1998.

FRANKE, T.F.; KAPLAN, D.R.; CANTLEY, L.C. PI3K: downstream AKT ion blocks apoptosis. **Cell**, v.88, n.4, p.435-437, Feb. 1997.

FRÖJDÖ, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1792, n.2, p.83–92, Feb. 2009.

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

GEORG, A.E.; DUNCAN, B.B.; TOSCANO, C.M.; SCHIMIDT, M.I.; MENGUE,S.; DUARTE C.; POLANCZYK, C.A. Grupo de Trabalho de Avaliação da Campanha Nacional de Detecção de Diabetes Mellitus. **Rev. Saúde Pública**, v.39, n.3, p.452-460, Jun. 2005.

GRUCKA-MAMCSAR, E.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; CHLUBEK, D.; SAMUJLO, D.; KATOWICE, A. C.; SZCZECIN. Lipid Balance in rats with fluoride-induced hyperglycemia. **Fluoride**, v.37, n.3, p.195-200, 2004.

HAFFNER, S.M.; LEHTO, S.; RONNEMMA, T.; PYORALA, K.; LAAKSO M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n.4, p.229-234, Jul. 1998.

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

HANDLER, P.; HERRING, H.; JR; HEBB, J.H. The effects of insulin in fluoride – poisoned rats. **J. Biol. Chem.**, v.162, p.679-683, Apr. 1946.

HAYACIBARA, M.F.; QUEIROZ, C.S.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. Fluoride and aluminum in teas and tea-based beverages. **Rev. Saúde Pública**, v.38, n.1, p.100-105, Feb. 2004.

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

HU, J.; HUBBARD, S.R. Structural basis of phosphotyrosine recognition by the Src homology-2 domains of the adapter proteins SH2 and APS. **J. Mol. Biol.**, v.361, n.1, p.69-79, Aug. 2006.

JHUN, B.H.; ROSE, D.W.; SEELY, B.L.; RAMEH, L.; CANTLEY, L.; SALTIEL, A.R.; OLEFSKY, J.M. Microinjection of the SH2 domain of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, n.11, p.7466-7475, Nov. 1994.

KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, C.L.; JACOBSON, A.M.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J. **Joslin**: diabetes melito. 14. ed. São Paulo: Artmed, 2009. 1224p.

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

KASUGA, M.; KARLSSON, F.A.; KAHN, C.R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v.215, n.4529, p.185-187, Jan. 1982b.

KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; CRETAAZ, M.; KAHN, C.R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in cell-free system. **Nature**, v.298, n.5875, p.667-669, Aug. 1982c.

KAUFMAN, F.R.; AUSTIN, F.R.; LLOYD, J.; HALVORSON, M.; CARPENTER, S.; PITUKCHEEWANONT, P. Characteristics of glycemic control in young children with type 1 diabetes. **Pediatr. Diabetes**, v.3, n.4, p.179-183, Dec. 2002.

KIM, J.K.; KIM, Y.J.; FILLMORE, J.J.; CHEN, Y.; MOORE, I.; LEE, J.; YUAN, M.; LI, Z.W.; KARIN, M.; PERRET, P.; SHOELSON, S.E.; SHULMAN, G.I. Prevention of fat-

induced insulin resistance by salicylate. **J. Clin. Invest.**, v.108, n.3, p.437-446, Aug. 2001.

KITAMURA,T.; KITAMURA, Y.; KURODA, S.; HINO, Y.; ANDO, M.; KOTANI. K.; KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; KIKKAWA, U.; OGAWA, W.; KASUGA, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-treonine kinase Akt. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, n.9, p.6286-6296, Sep. 1999.

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

KOTANI, K.; PERONI, O.D.; MINOKOSHI, Y.; BOSS, O.; KAHN, B.B. Glut4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. **J. Clin. Invest.**, v.144, n.11, p.1666-1675, Dec. 2004.

KRIGER, L. (Coord) **ABOPREV**: Promoção de saúde bucal. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003. 594p.

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

KUBOTA, N.; TOBE, K.; TERAUCHI, Y.; ETO, K.; YAMAUCHI, T.; SUZUKI, R.; TSUBAMOTO, Y.; KOMEDA, K.; NAKANO, R.; MIKI, H.; SATOH, S.; SEKIHARA, H.; SCIANCHITANO, S.; LESNIAK, M.; AIZAWA, S.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; AKANUMA, Y.; TAYLOR, S.I.; KADOWAKI, T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. **Diabetes**, v.49, n.11, p.1880-1889, Nov. 2000.

KUHNE, M.R.; PAWSON, T.; LIENHARD, G.E.; FENG, G.S. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. **J. Biol. Chem.** v.268, n.16, p.11479-11481, Jun. 1993.

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

LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. **Rev. Saúde Pública**, v.35, n.6, p.576-581, dez. 2001.

LIU, S.C.; WANG, Q.; LIENHARD, G.E.; KELLER, S.R. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.25, p.18093-18099, Jun. 1999.

MCGOWN, E.L.; SUTTIE, J.W. Mechanism of fluoride induced hyperglycemia in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.40, n.1, p.83-90, Apr. 1977.

MENOYO, I.; PUCHE, R.C.; RIGALLI, A. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. **Fluoride**. v.41, n.4, p.260-269, Oct./Dec. 2008.

MOKDAD, A.H.; FORD, E.S.; BOWMAN, B.A.; NELSON, D.E.; ENGELGAU, M.M.; VINICOR, F.; MARKS, J.S. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. **Diabetes Care**, v.23, n.9, 1278-1283, Sep. 2000.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciênc. Saúde Coletiva** ;v.5,n.2, p.381-392, 2000.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney Int. Suppl.**, v.77, p.S26-S30, Sep. 2000.

OLIVEIRA, C.L.; MELLO, M.T.; CINTRA, I.P.; FISBERG, M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Rev. Nutr.** v.17, n.2, p.237-245, abr./jun. 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade**: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília: OPAS, 2003. 60p.

PAIVA, S.M.; CURY, J.A. Dentifrício fluoretado e risco de fluorose dentária. **RPG Rev. Pos-Grad.**, v.8, n.4, p.322-328, out./dez. 2001.

PENDRYIS, D.G.; KATZ, R.V.; MORSE, D.E. Risk factors for enamel fluorosis in a nonfluoridated population. **Am. J. Epidemiol.**, v.143, n.8, p.808-815, Apr. 1996.

PESSAN, J.P.; SILVA, S.M.B.; BUZALAF, M.A.R. Evaluation of the total fluoride intake of 4-7-year-old children from diet and dentifrice. **J. Appl. Oral. Sci.**, v.11, n.2, p.150-156, Abr./Jun. 2003.

POND J.S.; PETERS, M.L.; PANNELL, D.L.; ROGERS, C.S. Psychosocial challenges for children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Educ.**, v.21, n.4, p.297-299, Jul./Aug. 1995.

RAMIREZ, I.; BUZALAF M.A.R. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária: cinquenta anos no Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v.12, n.4, p.1057-1065, jul./ago. 2007.

RENSTRÖM, F; BURÉN, J; ERIKSSON, J. W. Insulin receptor substrates-1 and -2 are both depleted but via different mechanisms after down-regulation of glucose transport in rat adipocytes. **Endocrinology**, v.146, n.7, p.3044–3051, Jul. 2005.

REUSCH, J.E. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. **Am. J. Cardiol.**, v.90, n.SA, p.19G-26G, Sep. 2002.

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.

RIGALLI, A.; BALLINA, J.C.; PUCHE, R.C. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. 1992 **Bone Miner.**, v.16, n.2, p.101-108, Feb. 1992.

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, May. 1990.

ROLDI, C.R.; CURY, J.A. Metabolismo do flúor após a ingestão de dentifrícios. **Ver. Gaucha Odontol.**, v.34, n.5, p.425-427, set./out. 1986.

SAKURAI, T.; SUZUKI, K.; TAKI, T.; SUKETA, Y. The mechanism of changes in metabolism and transport of glucose caused by fluoride administration to rats [abstract]. **Fluoride**, v.26, n.3, p.210, 1993. (Abstract)

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, Dec. 2001.

SCHAAN, B.D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.47, n.6, p.654-662, dez. 2003.

SHASHI, J.P.; SINGH, J.P.; THAPAR, S.P. Changes in glycogen content in some tissues during fluorosis: an experimental study on rabbits. **Fluoride**, v.21, n.2, p.82-86, 1988.

SINHA, R.; FISCH, G.; Teague B.; TAMBORLANE, W.V.; BANYAS, B.; ALLEN, K.; SAVOYE, M.; RIEGER, V.; TAKSALI, S.; BARBETTA, G.; SHERWIN, R.S.; CAPRIO, S. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. **N. Engl. J. Med.**, v.346, n.11, p.802-810, Mar. 2002.

SKOLNIK, E.Y.; LEE, C.H.; BATZER, A.G.; VICENTINI, L.M.; ZHOU, M.; DALY, R.; MYERS, M.J. JR.; BACKER, J.M.; ULLRICH, A.; WHITE, M.F. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS-1 and Shc: implications for insulin control of ras signaling. **EMBO J.**, v.12, n.5, p.1929-1936, May. 1993.

STAMLER, J.; VACCARO, O; NEATON, J.D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v.16, n.2, p.434-444, Feb. 1993.

SUMIDA, D.H. Sensibilidade celular à insulina decorrente do esquema de restrição alimentar em ratos adultos normais e diabéticos. 1996. 88f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências e Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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

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

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

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insight into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.7, n.2, p.85-96, Feb. 2006.

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

TAYLOR, S.I.; ARIOGLU, E. Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v.9, n.214, p.419-439, 1998.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.6, n.6, p.315-328, Nov. 1978.

TRIVEDI, N.; MITHAL, A.; GUPTA, S.K.; GODBOLE, M.M. Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. Fluoride Collaborative Study Group. **.Diabetologia.**, v.36, n.9, p.826-828, Sep. 1993.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D.R. The PI3K- PDK1 connection: more than just a road to PBK. **Biochem. J.**, v.346, pt.3, p.561-576, Mar. 2000.

VERROTTI, A.; TROTTA, D.; SALLADINI, C.; LAURA, M.; CHIARELLI, F. Preventing microvascular diabetic complications in children and adolescents: looking beyond glycaemic control. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v.4, n.4, p.525-532, Apr. 2003.

VIÑALS, F.; CAMPS, M.; TESTAR, X.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Effects of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor: Inhibition by fluoride is magnesium dependent. **Mol. Cell. Biochem.**, v.171, n.112, p.69-73, Jun. 1997.

VIÑALS, F.; TESTAR, X.; PALACIN, 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.

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

WARZAK, W.J.; MAJORS, C.T.; AYLLON, T.; MILAN, M.A.; DELCHER, H.K.
Parental versus professional perceptions of obstacles to pediatric diabetes care.
Diabetes Educ., v.19, n.2, p.121-124, Mar./Apr. 1993.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.1,
p.1-4, Jan. 1994.

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

WHITFORD, G.M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2.ed. New York:
Karger, 1996. 156p.

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

WICK, M.J.; DONG, L.Q.; HU, D.; LANGLAIS, P.; LIU, F. Insulin receptor-mediated
p62^{dok} tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for
bliding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-
simulated activation of ras and Akt. **J. Biol. Chem.** v.276, n.46, p.42843-42850, Nov.
2001.

WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v.391, n.6670, p.900-904, Feb. 1998.

XIE, Y.P.; GE, X.J.; JIANG, Y.T.; FENG, M.Y.; FAN, Y.H.; WANG, F.L.; et al. Clinical study of the effect of high fluoride on the function of the pancreatic islet's B cells. **Chinese J. Endemiol.**, v.19, n.2, p.84-86, 2000.

YAMAUCHI, T.; TOKE, K.; TAMEMOTO, H.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; YAMAMOTO-HONDA, R.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIZAWA, F.; AIZAWA, S.; AKANUMA, Y.; SONENBERG, N.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. **Mol. Cell. Biol.**, v.16, n.6, p.3074-3084, Jun. 1996.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z.W.; KARIN, M.; SHOELSON, S.E. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**, v.293, n.5535, p.1673-1677, Aug. 2001.

ZANETTI, M.L.; MENDES, I.A.C. Análise das dificuldades relacionadas às atividades diárias de crianças e adolescente com diabetes mellitus tipo1: Depoimento de mães.

Rev. Lat. Am. Enfermagem, v.9, n.6, p.25-30, Nov. 2001.

ZHANG, J.; GAO, Z.; YIN, J.; QUON, M.J.; YE, J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF- α signaling through IKK2. **J. Biol. Chem.**, v.283, n.51, p.35375-35382, Dec. 2008.

ZHOU, L.; CHEN, H.; XU, P.; CONG, L.A; SCIANCHITANO; LI, Y.; GRAHAM, D.; JACOBS, A.R.; TAYLOR, S. I.; QUON, M. J. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT-4 in rat adipose cells. **Mol. Endocrinol.**, v.13, n.3, p.505-514, Mar. 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na
Experimentação Animal da Faculdade de
Odontologia do *Campus* de Araçatuba - UNESP

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

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEAA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "EFEITOS DECORRENTES DA INGESTÃO CRÔNICA DE NAF NA SENSIBILIDADE E TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO" sob responsabilidade de Profa Dra DORIS HISSAKO SUMIDA, FERNANDO YAMAMOTO CHIBA, KATIA APARECIDA BURANELLO, DAISY JAQUELINE SHIRAKASHI, NATÁLIA HELENA COLOMBO, ROSANA LEAL DE MELO, KEILA AZIZ CHEHOUD DE MORAES, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA de acordo com o protocolo nº 2006- 08802.

Araçatuba, 21 de dezembro de 2006.

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

ANEXO B

Artigo submetido à Revista Fluoride

**THE CHRONIC TREATMENT WITH NaF DECREASES
INSULIN SIGNAL IN THE MUSCLE BUT NOT IN THE
LIVER**

THE CHRONIC TREATMENT WITH NaF DECREASES INSULIN SIGNAL IN THE MUSCLE BUT NOT IN THE LIVER

Fernando Yamamoto Chiba,^{a,b} Natália Helena Colombo,^a Daisy Jaqueline Shirakashi,^a Wendrew Douglas de Souza Gomes,^a Suzely Adas Saliba Moimaz,^b Cléa Adas Saliba Garbin,^b Cristina Antoniali Silva,^a Doris Hissako Sumida^a

Araçatuba, Brazil

^aFor Correspondence: Dental School of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Brazil, R. José Bonifácio, 1193, CEP: 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil.

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

^aDepartment of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Brazil.

^bDepartment of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Brazil.

SUMMARY: Thirty two seven-week-old male castrated Wistar rats were randomly divided evenly into a control group and a fluoride (F) group. They were treated with NaF administered in the drinking water and F contained in food pellets (F total inferred: 4.0 mg F / Kg bw / day in the form of NaF). After 42 days, the determination of the insulin receptor substrate (pp185–IRS-1/IRS/2) tyrosine phosphorylation status, and of glycemia and insulinemia were performed. The chronic treatment with NaF promoted: 1) decrease in the pp185 tyrosine phosphorylation status in the muscle tissue, but not in the liver; 2) increase in plasma F level; 3) no alteration in glycemia and insulinemia; 4) insulin resistance.

Keywords: Fluoride; Insulin receptor substrate; Insulin sensitivity; Insulin signal; Rats and insulin.

INTRODUCTION

The development of pathological conditions such as dental fluorosis¹ and alterations in carbohydrate metabolism²⁻⁴ may be caused by excessive fluoride (F) intake. Rigalli et al. found diminished insulin secretion both in patients and in rats that ingested high doses of NaF.² In later studies Rigalli et al. showed that, when NaF disseminated in the plasma is above 5 $\mu\text{mol/L}$, it affects glucose homeostasis.³ Trivedi et al. showed that 40% of patients with endemic fluorosis had impaired glucose tolerance, but this anomaly was reversed by removing the excess of F from drinking water.⁵ De La Sota et al. showed that in standard glucose tolerance tests done on residents of an area of endemic fluorosis, the area under the curve of plasma insulin levels as a function of time showed an inverse relationship with fluoremia.⁶ In another study, higher plasma glucose levels and delay in the peak plasma insulin were observed after a glucose tolerance test in people with high F intake.⁷ Furthermore, NaF causes glycolysis inhibition,⁸ hyperglycemia⁴ and depletion of hepatic and muscular glycogen.^{8,9} Knowing that F can interfere with carbohydrate metabolism, we felt it was important and fundamental to undertake a study to examine the chronic effect of NaF on insulin signal transduction.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Four-week-old male Wistar rats, obtained from the Araçatuba Dental School Central Vivarium (São Paulo State University, Araçatuba – SP) were kept under a 12/12 h light/dark cycle (light on at 07:00) and temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, with free access to regular diet (LABINA Indústria de rações do Brasil LTDA, Paulínia, Brasil) and water (containing NaF or NaCl). The rats were castrated to avoid any influence of testosterone. After twenty one days, thirty two seven-week-old castrated rats were divided into two groups: control group (n=16) received NaCl solution (9.54 mg Na/Kg bw); Fluoride group (n=16) received NaF administered in the drinking water and F contained in food pellets (F total inferred: 4.0 mg F / Kg bw / day in the form of NaF). After 42 days of treatment with NaF, the rats (4 hours without NaF solution before the day of experiment to avoid the acute effect of NaF) were then anesthetized with sodium

thiopental (Thiopentax® 3%, 5mg/ 100g bw, i.p.). Each group was divided into two subgroups in order to measure glycemia, insulinemia and plasma fluoride levels, and to measure the phosphorylation status of the insulin receptor substrate (pp185- IRS1/IRS2). Median laparotomy was performed in 10 control and 10 F-treated rats, and blood was collected from the inferior cava vein. The plasma was stored at –20°C until the F was determined. Six control and 6 F-treated rats were used to quantify the pp185 tyrosine phosphorylation status in gastrocnemius muscle and liver, after insulin (1.5 U, i.v.) stimulation. The design of this research conforms to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Ethics Commission on Animal Experimentation at a meeting on 12/21/2006, in accordance with Protocol n° 2006-08802.

Analysis method: Samples from the plasma were used for determination of glycemia by the oxidase glucose method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil), and for insulinemia by the radio-immunology method – RIA (Coat-A-Count, DPC, Diagnostic products, Los Angeles, CA - USA). The resistance for insulin was evaluated by index of HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance), calculated by the formula: $\text{HOMA} - \text{IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia (}\mu\text{UI/ML)} / 22.5$.¹⁰

Determination of F ion concentration in blood plasma: To analyze F in plasma, pre-diffusion with heated HMDS-H₂SO₄ was done to remove CO₂. The F concentrations in plasma were determined after 12 hours of diffusion facilitated by hexamethyldisiloxane (HMDS)¹¹ modified by Whitford¹² using a F ion selective electrode (Orion Research, Cambridge, Mass., USA, model 9409) and a calomel reference micro-electrode (Accumet, #13-620-79) joined and coupled to a potentiometer (Orion Research, model EA 940), as described by Buzalaf et al.¹³

Assessment of the insulin receptor substrate (pp185-IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status: The tests were performed in accordance with the method described by Carvalho et al.¹⁴ The samples of tissues were submitted to the Western Blotting method to

quantify the tyrosine phosphorylation status of pp185, after insulin stimulation, using the antiphosphotyrosine antibody (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA).

Statistical Analysis: All values were presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was done by the Student t test for non-paired samples, and the differences between the two groups were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

As seen in Table 1, the F-treated rats presented a highly significant increase in plasma F in comparison with the control group.

In the glycemia and insulinemia comparisons (Table 1) the group treated with NaF didn't show difference when compared with the control group. From these values, the HOMA-IR was calculated to verify the presence of insulin resistance. The HOMA-IR index was significantly ($p < 0.05$) higher in Fluoride group in comparison with the control group.

Figures 1A and 1C show a typical autoradiogram with reference to the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation status of pp185 in the muscle and liver, respectively. Figures 1B and 1D show the results, expressed in arbitrary units per μg of protein. The group treated with NaF showed a significantly lower phosphorylation status of this substrate compared with the control group in the muscle tissue. On the other hand, no alteration was found in the phosphorylation of this substrate between control and F groups in the liver.

DISCUSSION

Recently, Menoyo et al.⁷ demonstrated that the acute treatment with fluoride (after a single dose of NaF (16.8 mg / Kg bw) induces insulin resistance. It is in accordance with our results at which was demonstrated that chronic NaF intake also causes insulin resistance, demonstrated by the increase in HOMA-IR. (Table 1). In the other hand, Chehoud et al.⁴ verified that the acute

treatment with NaF (3.1 mg NaF / Kg bw) did not change insulin sensitivity. This divergence of results may be due to the difference in the dose of NaF used.

The values of glycemia and fasting insulinemia didn't show alteration in the F group compared to the control group (Table 1). This result may be due to the time that the animals stayed 4 hours without the NaF solution. These findings are in agreement with the results of Rigalli et al.² and Menoyo et al.⁷ that showed that, after 4 hours of the infusion of a solution containing NaF (16.8 mg / Kg bw), glycemia and insulinemia returned to the baseline.

The chronic treatment with NaF induced decrease in the pp185 tyrosine phosphorylation status after insulin stimulus in the muscle tissue. (Figure 1). These results found in muscle, are in line with the *in vitro* studies of Viñals et al.¹⁵ on insulin receptors isolated from rat muscular tissue and human placenta, showing that F induced a reduction in the insulin-induced auto-phosphorylation, and phosphorylation of the exogenous substrates used. However, no significant alteration was found in the pp185 tyrosine phosphorylation status in liver. This answer can be in agreement with models of insulin resistance, such as the transgenic rats with chronic excess of growth hormone (TRGH).¹⁶ This study found that, in TRGH liver, insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation was decreased, but IRS-2 tyrosine phosphorylation was significantly increased.¹⁶ In our results, as the pp185 contains both insulin substrate the IRS-1 and the IRS-2, the absence of alteration in the phosphorylation status of pp185 may be a result of the balance between the increase and decrease of the tyrosine phosphorylation of IRS-2 and IRS-1, respectively. CHO et al. suggest that the liver should compensate the insulin resistance found in adipose tissue or muscle as to prevent hyperglycemia.¹⁶

When analyzing the plasma fluoride ion concentration, a statistically significant increase was noticed in the F group compared to the control group (Table 1). This confirms the relation between F ingestion and absorption by the body.

In the present study, the F dose used was 20 times higher than the maximum value a child can ingest through diet (0,045 mg/F/day/kg) and during one tooth brushing session (0.155

mg/F/day/kg) with fluoridated dentifrice.¹⁷ This dose was used because Rigalli et al. carrying out studies in humans and in rats, observed that they needed to increase the fluoride dose by this proportion, administered in rats in relation to the dose in humans, to attain a similar plasmatic peak in the two models. This is probably due to the faster bone turnover rate in rats if compared to humans.²

Based on the results obtained here, we can conclude that chronic treatment with NaF promoted: 1) decrease in the pp185 tyrosine phosphorylation status in the muscle tissue, but not in the liver; 2) increase in plasma F level; 3) no alteration in glycemia and insulinemia; 4) insulin resistance.

Therefore, knowing that chronic NaF intake is capable of decreasing insulin signal and causing insulin resistance, the use of dentifrices with lower fluoride content is recommended, especially for diabetic children, for whom excessive F consumption may lead to worsening the condition of these children's health.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants (08/52688-8) from São Paulo Foundation for Research (FAPESP), FUNDUNESP, and CNPq. We are also thanks Mrs. Noemia Akamine Kajimoto (English teacher) for their technical assistance in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- 1 Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res* 1992;71(5):1228-37.
- 2 Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcified Tissue International* 1990;46(5):333-8.
- 3 Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung* 1995;45(3):289-92.

- 4 Chehoud KA, Garbin CAS, Sassaki KT, Chiba FY, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride* 2008;41(4):270-5.
- 5 Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM. Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. Fluoride Collaborative Study Group. *Diabetologia* 1993;36(9):826-8.
- 6 De La Sota M, Puche R, Rigalli A, Fernández LM, Benassati S, Boland R. Modificaciones en la massa osea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahia Blanca con alta ingesta espontanea de flúor. *Medicina (Buenos Aires)* 1997;57(4):417-20.
- 7 Menoyo I, Puche RC, Rigalli A. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. *Fluoride* 2008;41(4):260-9.
- 8 Dost FN, Knaus RM, Johnson DE, Wang CH. Fluoride impairment of glucose utilization: nature of effect in rats during and after continuous NaF infusion. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977;41(3):451-8.
- 9 Shashi, Singh JP, Thapar, SP. Changes in glycogen contend in some tissues during fluorosis: an experimental study on rabbits. *Fluoride* 1988;21(2):82-6.
- 10 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 glucosetolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
- 11 Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968;15(9): 969-74
- 12 Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. New York: Karger 1996.
- 13 Buzalaf MAR, Fuhushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride* 2002;35(3):185-92.
- 14 Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137(1):151-9.
- 15 Viñals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochem J* 1993;291(pt.2):615-22.
- 16 Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho J, Furuhashi Y, et al. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* 2006;147(11):5374-84.
- 17 Pessan JP, Silva SMB, Buzalaf MAR. Evaluation of the total fluoride intake of 4-7-year-old children from diet and dentifrice. *J Appl Oral Sci* 2003;11(2):150-6.

Table 1. Plasma glucose, insulin and fluoride concentration, and index HOMA-IR in control and Fluoride groups (mean $\pm$ SEM, n=10)

Parameters	Control group	Fluoride group
Glycemia (mmol/L)	6,567 $\pm$ 0,1521	6,935 $\pm$ 0,1365
Insulinemia (μ U/mL)	5,543 $\pm$ 0,769	7,236 $\pm$ 0,781
Fluoremia (μ g F-/mL)	0,0496 $\pm$ 0,0038	0,121 $\pm$ 0,00814*
HOMA IR	1,526 $\pm$ 0,154	2,208 $\pm$ 0,2613*

*p<0,0005 compared to control.

Figure 1. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation status of pp185 (IRS-1/IRS-2) in the muscle and in the liver of control and Fluoride groups, before (-) and after (+) insulin infusion. In A and C, typical autoradiogram of muscle and liver, respectively. In B and D, the results of the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation status of pp185 in the muscle and in the liver, respectively, are expressed in arbitrary units per μ g of protein (mean $\pm$ SEM, n=6).

*P<0,05 Fluoride (+) vs. Control (+).

ANEXO C

Normas para publicação - Revista Fluoride

SUBMITTING MANUSCRIPTS TO FLUORIDE
GUIDELINES FOR AUTHORS—REVISED JANUARY-MARCH 2009

Authors are advised that, for timely processing of their submissions, all the following instructions for submitting manuscripts must be followed exactly. For more efficient processing of submissions, and because far more manuscripts are being received than there is space to publish without a huge increase in the cost of the journal, manuscripts should be written as concisely as possible without unnecessary extraneous information or undocumented claims.

Manuscripts should be submitted to the editor of Fluoride (see below) and must not have been published previously nor be under consideration for publication elsewhere. It is essential that they be written in clear, concise English with either American or British spelling. They should be formatted with generous margins and double-space typing throughout. Although submissions may be made by postal mail or courier, it is strongly recommended that they be submitted by Email as an attachment (Microsoft Word or Microsoft Office XP documents preferred). Preliminary inquiries by E-mail or by letter, especially for research reviews, are encouraged.

Albert W. Burgstahler, PhD

Editor, Fluoride

1620 Massachusetts Street

Lawrence, KS 66044-4254, USA

E-mail: awburg@ku.edu

Because far more manuscripts are being received than we have space to publish, **research reports** should be kept as short as possible, generally limited to 5 or 6 manuscript pages, including figures and tables (but exclusive of references). Exceptions will be made, however, for longer papers of unusually high quality and novelty. For work of limited scope or studies dealing with well-known or wellstudied phenomena, submissions as shorter **research notes** of to 3 or 4 manuscript pages are recommended. Except for tables and figures, for which there are specific Arial font requirements indicated later, the entire text and references of manuscripts should be submitted in 11.5 Times New Roman or similar type.

For uniformity, manuscripts should be prepared according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) titled Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication, the official version of which is available at <http://www.ICMJE.org>. However for Fluoride no periods should be added after journal titles or journal title abbreviations.

All research reports and reviews, including papers presented at ISFR conferences, are evaluated by qualified reviewers and/or members of the Fluoride Editorial Board) before acceptance for publication. When submissions are judged acceptable, authors are asked to incorporate into their paper the suggestions and recommendations of the reviewers and the editorial changes proposed by the editor.

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

The following **guidelines** should be followed closely to facilitate and expedite publication. They refer primarily to research reports and research notes and apply only in part to research reviews and other types of contributions. Manuscripts that do not adhere to these guidelines will be returned for further revision. In particular, authors should make sure that references are complete and accurate. If significant errors are found in the references, the manuscript will not be processed until all errors are corrected. The responsibility for references being correct lies with authors. Our editors are unable to check and verify each reference.

Title and running header title: Care should be taken to make the full or main title as clear and informative as possible. If the full title is longer than 70 characters and spaces, a shorter running page header title that expresses the main points of the full title should also be supplied.

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

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

Introduction: The Introduction should begin with a brief statement about the background (not a mini-review) and nature of the research. Pertinent previous work by the author(s) or by others, especially if published in *Fluoride*, should always be cited in the Introduction and later in the paper as appropriate. Usually the Introduction will be less than one-half page in length. The headings for the Introduction and subsequent sections do not require special formatting and can be in the same type used for the text.

A comma should be used after the penultimate entry of a series before the word “and” or “or,” e.g., The animals were a goat, a horse, and a rabbit. The color was red, white, or blue.

Materials and methods: This section should be written in the past tense as concisely as possible, but all essential details of how the investigation was conducted should be included, especially if new or unusual methodology was involved. When standard or published procedures were used, they should only be referenced unless substantial changes were made in them, in which case appropriate details should be added.

Results: Give a brief presentation of the principal findings of the research, drawing attention to key trends and patterns. *Numerical data in tables, charts, and figures should only be summarized and should not be repeated in the text.*

Discussion: Concentrate on the broad conclusions, interpretation, and implications of the investigation, especially as they relate to other previously published work. In short papers and research notes, the Results and Discussion sections may be combined. In longer papers and reviews a concluding summary may be added. Mention may also be made of presentation of the research at an ISFR conference or other meeting.

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

References: List and number the references in the order they are cited in the text. All references must be cited accurately and completely according to the *International Biomedical Journals* style described below, which follows that of *Index Medicus* and *PubMed*. Titles of journals should be abbreviated according to the style used in *Index Medicus* or *Chemical Abstracts*. The names of books and journals should be submitted in regular type, not in italics. In the text of the paper, use superscripted numbers placed immediately after commas or periods. When more than one reference is cited at a time, use commas without spaces between numbers e.g., 1,4,5,15 or, when in sequence, by a hyphen e.g., 1-3,5.

Abbreviations and acronyms: Except for standard international system (SI) units of measurement, all abbreviations and acronyms should be defined, preferably in parentheses, where they first occur, in both the Summary and the text. For unit-per-unit expressions, use a slash as in mg/L, µg/mL, mg/kg bw/day, mg/m³, L/hr, etc. Unit abbreviations when numbers are involved include sec for second or seconds, min for minute or minutes, hr for hour or hours, mo for month or months, yr for year or years, L for liter or liters, mL of milliliter or milliliters, µL for microliter or microliters. Day or days and week or weeks should be spelled in full, although wk is acceptable for week or weeks. Common abbreviations of Latin words should be in the regular font rather than in italics: e.g., i.e., cf., et al., etc. Fluoride when first mentioned in the summary and introduction should be written as fluoride (F) and then as shown as F.

Tables: Several examples of Tables are given in this issue, e.g.

Table 1. Oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytochrome c
(Values are mean $\pm$ SD)

Sample (Concentration of NaF)	ROS (%) (n=7)	Depolarized (%) (n=5)	Cytochrome (OD450-570nm) (n=5)
0 mg/L(control)	14.0 $\pm$ 2.0	21.1 $\pm$ 3.3	0.1 $\pm$ 0.05
150 mg/L	33.9 $\pm$ 4.8*	49.2 $\pm$ 12.6*	0.3 $\pm$ 0.05 [†]
200 mg/L	51.0 $\pm$ 15.2*	66.2 $\pm$ 15.7*	0.3 $\pm$ 0.11 [†]

Compared with the control *p<0.01, [†]p<0.05.

Tables should be numbered consecutively in bold Arabic numerals as **Table 1.**, **Table 2.**, etc., (except that the numbering is omitted when there is only one table), followed by a brief but informative main header title in regular Arial 8-point font. Tables should be designed for maximum clarity and minimum size to fit in the least amount of space. However, they cannot exceed the maximum page size (132 x 210 mm) of the journal. For ease of reading, tables in portrait mode are preferred over those in landscape mode. Splitting a large landscape mode table into two portrait mode tables should be considered.

To accommodate our page size and to maintain consistency, words, including the title and footnotes, and numerical entries in tables should be formatted in regular Arial 8-point font, with the exception that the table number in the title is in bold, e.g., **Table 1.** In the paragraph indents and spacing drop down menu with Word, use single line spacing, no special effects, indentation right and left of 0, and spacing of 2-points before and after. The alignment is generally centred although sometimes left alignment may be used when columns have lists of words. Tables should be created with a computer program (like Word or Excel) as one table for each table. Do not make tables by using spaces to arrange the results in a table-like form because such tables have to be rebuilt as proper tables at the typesetting stage. Use a sufficient number of rows and columns so that there is one result per cell rather than placing several results in one cell.

When there are groupings of entries in a table separate them by an extra space (or empty cell).

The first row of the table should be straddled or merged and contain the title. Similarly the last row should also be straddled or merged and contain the footnotes to the table such as levels of significance. Short or abbreviated column headings should be placed in the first row following the main header title. *Do not add any horizontal or vertical lines or borders.* The grey grid lines present in Word tables do not show up in the final table if no borders are added. Explanatory footnotes, such as information about p and other statistical values and other material related to the table should be placed under this last line. Brief clarifications and units, usually in parenthesis, are best placed in the table heading or subheadings. Decimals should be expressed with decimal points (periods), not commas. Explanatory footnotes placed at the bottom of the table are identified by superscripted lowercase letters. For footnotes to numerical data in the table, the following *superscripted* symbols are used in the order: *, †, ‡, §, ||, **, ††, ‡‡, §§, |||. Abbreviations and acronyms not already defined in the text should be defined in the headings or in lettered footnotes. Data presented with standard deviation ($\pm$ SD) or standard error of the mean ($\pm$ SEM) should be so labeled. For designating statistical probability, use a lower case p without spacing, e.g., $p < 0.01$. Recent examples of tables in *Fluoride* can be found at www.fluorideresearch.org.

Figures: Lettering and numbering in figures (or charts) should be entirely in regular Arial font. Figures should be numbered consecutively with bold Arabic numerals in regular Arial 9-point font as **Figure 1.**, **Figure 2.**, etc., except that numbering is omitted when there is only one figure. Captions are placed beneath figures and should NOT be part of the figures. They should be separate from the

figures in an editable Word text. Figures and charts should be designed or drawn with a computer program such as Microsoft Excel, PowerPoint, Corel Draw, etc. It is critical that figures with their lettering and numbers be appropriately sized, e.g., in Arial 10-point or even 11-point font, so that, *if they are reduced for printing, they, together with their lettering and numbers, remain large enough to be clearly legible.* To conform to our page size, they cannot exceed 122 mm in width. Electronic jpg submission of photos and radiographs is preferred. If submitted in hard copy, they should be neatly and evenly trimmed with a label taped on the back indicating the figure number and orientation. Captions for photos should be included at the end of the paper.

Style guide for references: Authors should take careful note of the following modified examples of *Index Medicus/PubMed* punctuation and spacing for references, including elimination of italics and periods in name abbreviations; no spaces between year, Volume and issue number, and page numbers for journal articles, etc.). Like many other journals, *Fluoride* does not use periods after journal titles or journal title abbreviations. If an article is not in English the original language should be placed at the end of the reference in square brackets e.g., [in Russian]. The Uniform Requirements For Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, by the International Committee of Medical Journal Editors (available from: <http://www.icmje.org/>, updated October, 2008), should be followed except that in *Fluoride* periods are omitted after journal titles or journal title abbreviations, e.g.:

1. *Journal articles:* List the first six authors followed by et al.

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res* 2002;935:40-6.

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

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

2. *Books:*

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

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

3. *Conference papers:*

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

4. *Dissertations:*

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

5. *Journal articles on the Internet:*

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

Further examples are given in Fluoride 2007;40(1)77-88.