

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

TAMARA TEODORO ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GRP78 EM
FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS À
ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUORETO**

BAURU
2016

TAMARA TEODORO ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GRP78 EM
FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS À
ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA POR FLUORETO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

BAURU
2016

Araujo, Tamara Teodoro

A663a

Avaliação da expressão da grp78 em fígado de ratos submetidos à administração crônica por fluoreto / Tamara Teodoro Araujo. -- 2016.
50f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Eletroforese. 2. Fígado. 3. Reticulo-Endoplasmático. 4. Anticorpos. 5. Ratos. I. Buzalaf, Camila Peres. II. Título.

TAMARA TEODORO ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GRP78 EM FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA POR FLUORETO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Heloísa Aparecido Barbosa Pereira
Universidade de São Paulo

Bauru, 13 de junho de 2016.

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre lutaram para que esse sonho se tornasse realidade, ao meu namorado, amigos e professores que fizeram parte desta incrível e difícil jornada.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por permitir que eu concluísse mais uma etapa desta jornada com muita saúde e perseverança.

Agradeço aos meus pais, pela determinação, luta e muito esforço para que pudessem ter sua filha única formada, obrigado pelo amparo e incentivos que sempre me deram, jamais saberão expressar tanta gratidão a vocês. Amo vocês.

Agradeço ao meu namorado, por sempre estar presente nas dificuldades, me ajudando e sendo a pessoa mais incrível e mais calma que eu já conheci, obrigado por tudo nestes cinco anos, sou muito grata a tudo o que fez e faz por mim, e por ser meu alicerce que me dá força e me segura em todos os momentos. Te amo.

Agradeço aos meus bichos de estimação, que alegram a minha casa e me acompanham no quarto todos os dias de estudo.

Agradeço a minha amiga/irmã Camila Sanchez por estar sempre ao meu lado, me ajudando e apoiando, obrigado por tudo, e agradeço a deus por ter colocado você na minha vida.

Agradeço a minha Co-orientadora e amiga, Heloisa, por sempre ser tão aberta e disposta em sanar minhas dúvidas e me ajudar, helo hoje posso te dizer que nestes três anos você acrescentou muito na minha formação acadêmica, obrigado.

Agradeço a minha amiga Alini Dionizio por ser essa pessoa tão prestativa com todos ao seu redor, obrigado por todas as dicas e ajudas, você contribuiu muito para que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus amigos da USC e da USP por me apoiarem e dedicarem seu tempo em me ajudar.

Agradeço a FAPESP por financiar meus projetos de iniciação científica.

Agradeço a professora Marília Buzalaf por me aceitar como aluna de iniciação científica e ser sempre tão atenciosa e disposta com seus alunos.

Agradeço a minha orientadora Camila Buzalaf por ter me aceito sem mesmo me conhecer direito, obrigado pelas dicas, pela excelente orientação e por ser sempre tão atenciosa e dedicada ao que faz obrigado por contribuir com a minha formação.

Agradeço a todos meus professores da Universidade do Sagrado Coração pela dedicação, pela simplicidade, por passarem experiências maravilhosas e por me guiarem nas melhores direções. Vocês acrescentaram muito na minha vida, continuem sendo esses profissionais fantásticos com a capacidade em moldar vidas e transformar histórias.

Agradeço a sala mais unida e mais separada fisicamente, turma, obrigado por todas as conversas e por todas as amizades que fiz de uma coisa eu tenho certeza, teremos profissionais excelentes no mercado e com pessoas fantásticas, obrigado pela experiência maravilhosa nestes quatro anos.

Agradeço e peço perdão a todos os animais que tiveram suas vidas levadas para que essa pesquisa fosse realizada, suas vidas foram respeitadas e honradas por mim até o fim, sou grata a vocês e peço que me perdoem pelo mal causado. Vocês fizeram com que eu transformar minha percepção de vida. Obrigado.

E meu agradecimento a todos que participaram diretamente ou indiretamente desta etapa da minha vida.

EPÍGRAFE

“Os grandes espíritos sempre tiveram que lutar contra a oposição feroz de mentes medíocres.” (EINSTEIN).

RESUMO

O íon fluoreto (F^-) pode desempenhar efeitos distintos sobre várias funções celulares. Dentre elas, a perturbação no sistema antioxidante que já foi relatada na literatura. O aumento da expressão da proteína reguladora da glicose 78 (GRP78) é um indicativo de estresse oxidativo do retículo endoplasmático. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a expressão da proteína GRP78 após exposição do F^- por diferentes doses e períodos experimentais, utilizando a técnica de *western blot*. Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos com 21 dias de vida, os quais foram divididos em 6 grupos ($n= 6$ animais por grupo), de acordo com a dose de F^- a ser administrada na água de beber [0 mg/L (controle), 15 mg/L, ou 50 mg/L] e o tempo de tratamento (20 ou 60 dias). Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados, o sangue e o fígado foram coletados para a análise de F^- no plasma e para a quantificação da GRP78, respectivamente. A análise de F^- foi feita como descrito pelos autores TAVES e WHITFORD. As amostras de fígado foram pulverizadas, seguida da extração de proteínas com a solução RIPA acrescida de um coquetel de inibidor de proteases. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de BRADFORD e parte foi submetida à eletroforese para a sua separação. A seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos anti-GRP78 ou anti-tubulina. A análise quantitativa foi realizada por densitometria utilizando o software Image Studio Lite. Os resultados demonstram um aumento significativo da expressão da GRP78 nos grupos tratados com 15mg F/L e 50mg F/L em relação ao grupo experimental, mas não mostrou diferença entre os períodos experimentais nos períodos de 20 e 60 dias. Não havendo diferença entre os dois tempos experimentais. Esses dados sugerem que a GRP78 pode ser um indicador do estresse oxidativo no retículo endoplasmático induzido pelo F^- , de maneira independente da dose.

Palavras chave: Eletroforese, Fígado, Reticulo Endoplasmático, Anticorpo, Ratos.

ABSTRACT

The fluoride ion (F^-) plays different effects on cellular functions. Among them, the disturbance in the antioxidant system has been reported in the literature. The increased expression of Glucose-Regulation Protein 78 protein (GRP78) is an indicative of endoplasmic reticulum oxidative stress. The objective of this work was to verify the expression of GRP78 protein after exposure of F^- by different doses and experimental periods, using western blot assay. Thirty-six 36 male Wistar rats of 21 days of live, were divided into 6 groups ($n = 6$ animals per group) according to the amount of F^- to be administered in the drinking water [0 mg / L (control), 15 mg F^- / L or 50mg F^- / L] and the treatment time (20 or 60 days). After the experimental period, the animals were anesthetized and blood and liver samples were collected for F^- analisis and for quantification of GRP78, respectively. The F^- analysis was done as described by the authors TAVES and WHITFORD. The liver samples were fractionated, followed by protein extraction with RIPA solution plus a protease inhibitor cocktail. Total proteins were quantified for BRADFORD method and part was subjected to electrophoresis for their separation. Next, proteins were transferred to a membrane and incubated with anti-GRP78 antibodies or anti-tubulin. The quantitative analysis was performed by densitometry using Image Studio software Lite. The results demonstrate a significant increase in expression of GRP78 in the groups treated with 15mg F^- / L and 50mg / L compared to the experimental group but did not differ between the experimental periods for periods of 20 and 60 days. No difference between the two experimental times. These data suggest that GRP78 can be an indicator of oxidative stress in the endoplasmic reticulum induced by F^- , independently dose way .

Key words: Electrophoresis, Liver, Endoplasmatic-Reticulum, Antibody, Mouse.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

F ⁻	Fluoreto
GRP78	Proteína regulada por glicose 78
µg	Micrograma
RE	Retículo endoplasmático
mg	Miligrama
L	Litro
CO ₂	Dióxido de carbono
HMDS	Hexametildissiloxano
Kg	Kilograma
M	Molar
NaOH	Hidroxido de sódio
ml	Mililitro
Rpm	Rotação por minuto
mV	Milivoltagem
Ppm	Parte por milhão
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
nm	Nanomêtro
mm	Milímetro
Kd	Kilodalton
BSA	Albumina de soro bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
APS	Persulfato de amônio
V	Voltagem
Ma	Miliampere
°C	Grau celsius
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TBARS	Ácido tiobarbitúric

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	GERAL	14
2.2	ESPECÍFICO.....	14
3	REVISÃO BOBLIOGRÁFICA	15
3.1.	QUÍMICA DO FLÚOR.....	15
3.2.	METABOLISMO DO FLÚOR.....	15
3.3	TOXICIDADE DO FLUORETO NO METABOLISMO.....	17
3.3.1	Toxicidade aguda e crônica	17
3.4	CARACTERÍSTICAS DO FÍGADO.....	18
3.4.1	Ação do fluoreto no fígado	19
3.4.2	Fluoreto e o estresse oxidativo	20
3.4.3	Proteína regulada por glicose 78 (grp78): estresse oxidativo e metabolismo de lipídio	20
3.5	TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING.....	21
3.5.1	Processo de transferência e incubação	21
3.5.2	Fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida	22
3.5.3	Processo de transferência	23
3.5.4	Incubação e revelação para análise dos dados	24
4	METODOLOGIA	26
4.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	26
4.2	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
4.3.	DOSAGENS DE FLUORETO.....	27
4.3.1	Plasma	27
4.3.2	Validação da análise	28
4.4.	EXTRAÇÕES DE PROTEÍNAS DO FÍGADO.....	29
4.5.1	Homogeneização do tecido	29
4.5.2	Extrações e dosagem das proteínas	29
4.6	WESTERN BLOT	30
4.6.1	Preparo do gel	31
4.6.2	Incubação com anticorpos	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33

5	RESULTADO E DISCUSSÃO	34
5.1	CONCENTRAÇÕES DE F ⁻ NO PLASMA	34
5.2.	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	35
5.3	WESTERN BLOTTING.....	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Fluoreto (F^-) é um elemento encontrado naturalmente na constituição química do solo e também adicionado na água. Devido à sua ação favorável na odontologia, a suplementação de F na água de beber de muitos municípios se tornou constante. Entretanto, por ser tratar de um elemento químico encontrado em nosso meio, o mesmo pode estar presente de forma natural na água de beber e, neste caso, às vezes bem acima do limite recomendável (<1 mgF/L). Apesar do seu efeito benéfico, quando o F^- encontra em concentrações elevadas, o mesmo pode provocar efeitos indesejáveis como a fluorose dentária ou esquelética e isso acontece devido à dose e o tempo de exposição ao mesmo. Diante destes fatos, iniciaram-se pesquisas para entender a ação do F, seus efeitos no organismo, além de se encontrar uma dose segura para obter o efeito benéfico sem causar efeitos colaterais.

Quando em excesso, o F pode interferir em vários processos moleculares nos tecidos mineralizados e moles. No fígado, induz ao aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e também à redução de atividade enzimática antioxidante. Ainda, foi reportado que o F^- altera o metabolismo do perfil lipídico, além de ocasionar estresse oxidativo do reticulo endoplasmático (RE).

A administração do F^- tem sido um dos principais fatores a produzirem estresse oxidativo, o qual tem relação com doenças degenerativas no rim, fígado e coração. Um dos indicativos de estresse oxidativo é o aumento da proteína regulada pela glicose subunidade 78 (GRP78) (do inglês *glucose regulated protein 78*). Trata-se de uma chaperona que possui uma grande eficiência em reduzir o estresse oxidativo do RE. Em alguns estudos tem sido relatado que a administração de F associado a uma dieta hipercalórica aumenta a expressão da GRP78, podendo indicar o aumento de estresse oxidativo do RE.

Com a finalidade de averiguar a ação do F isoladamente, sem interferentes como uma ração hipercalórica, o estudo foi realizado com uma ração empregada rotineiramente no biotério da Universidade São Paulo/Faculdade de Odontologia de Bauru. Esta ração (Presence Nutrição Animal, Paulínia, São Paulo) oferece um valor calórico e nutritivo equilibrado e um baixo teor de F^- (< 1 mgF/L), o que valida seu uso nesse modelo experimental.

Neste trabalho foi realizada a identificação da GRP78 objetivando avaliar se o seu perfil de expressão no tecido hepático é modificado após exposição crônica ao

F⁻, o que pode contribuir para o aumento do conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nos processos de intoxicações crônicas por este elemento. Além disso, procurou-se entender se a adaptação do organismo aos seus efeitos tóxicos pode ter relação com essa proteína-alvo.

2 OBJETIVOS

Abaixo, apresentam-se os objetivos gerais e específicos da pesquisa.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da proteína GRP78 no tecido hepático após administração crônica de F por diferentes doses e períodos experimentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) dosar o F no plasma dos animais;
- b) quantificar proteínas totais pelo método de Bradford;
- c) avaliar a expressão semi-quantitativa da proteína GRP78 pela técnica de *western blotting*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUÍMICA DO FÚOR

O F^- vem do latim fluere, 'fluir', resulta de ele ser encontrado no mineral fluorespato, que é o fluoreto de cálcio (CaF_2). O nome foi dado por Ampère. No século XVII já se conhecia o ácido fluorídrico (HF), e sabia que o fluorespato emitia luz (origem da fluorescência) quando aquecido. Por algum tempo, a elevada reatividade do flúor e a estabilidade de seus compostos impediam sua obtenção. O flúor é muito reativo, principalmente quando em contato com um material orgânico. (FLÚOR,1998)

Em temperatura ambiente o F^- está no estado gasoso, e seus pontos de fusão e ebulição variam de $-219,62$ e $-188,12^\circ C$, respectivamente. É classificado como um halogênio, extremamente reativo, e de cor amarelo pálido. O F^- , dentre os halogênios, é o elemento mais eletronegativo, reagindo, portanto muito facilmente no, ambiente e assim ser encontrado comumente como o íon flúor ou fluoreto. Por ser muito eletronegativo, reage facilmente com o hidrogênio, formado o HF. Além disso, participa de reações de oxidação e redução (BUZALAF, 2008).

O F^- é onipresente no meio ambiente e considerado o 13º elemento mais abundante na crosta terrestre (WHITFORD, 1983). Pode ocorrer naturalmente em muitas águas devido ao intemperismo de rochas vulcânicas. Além de não ser possível encontrá-lo em sua forma livre na natureza, sua concentração depende de diversos fatores físicos, químicos e geológicos, tais como a composição do solo, a estabilidade e a porosidade das rochas, o pH do ambiente, entre outros (TOXICOLOGICAL, 2003).

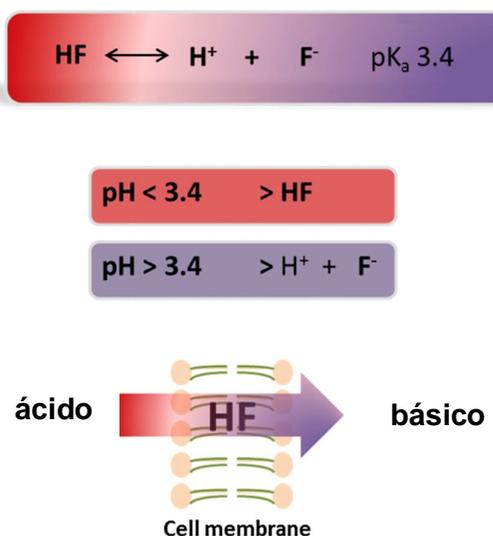
O HF é um ácido fraco com um pK_a de 3,4. Por definição, no pH igual a 3,4, 50% de F está na forma não dissociada (HF), enquanto que os restantes 50% está na forma iônica (F^-). À medida que o pH diminui, a concentração de HF aumenta, e quando aumenta o pH, a concentração de F^- aumenta (WHITFORD, 1996).

3.2 METABOLISMO DO FLÚOR

O metabolismo de F^- inclui absorção, distribuição e excreção, e em todas as etapas há dependência do pH Isto significa que o F^- atravessa as membranas

celulares como HF, em resposta a um gradiente de pH entre os compartimentos líquido- celulares adjacentes, indo do meio mais ácido para o mais alcalino (Figura 1).

Figura 1 - Metabolismo do íon F^- e sua dependência do pH



Fonte: BUZALAF, C; LIMA; BUZALAF, M.CHAPTER 4. Fluoride metabolism food and nutritional Components in Focus. 2015.

Uma vez ingerido, o F^- é facilmente absorvido pela mucosa gástrica, onde a absorção é tanto maior quanto menor for o pH do meio, logo que as células têm alta permeabilidade ao HF (WHITFORD, 1997). O F^- não absorvido no estômago irá ser absorvido no intestino, onde a absorção não depende do pH, atingindo, desta maneira a corrente sanguínea. Assim, logo após a ingestão, a concentração plasmática de F^- irá elevar-se, atingindo um pico em 30 a 45 minutos. Do F^- ativo, uma grande parte será incorporada aos tecidos mineralizados, e uma parte menor será distribuída aos tecidos moles. Neste caso, o gradiente de pH entre os meios intra e extracelular irá conduzir a entrada ou a saída de F^- das células, sendo que este elemento sempre irá, na forma de HF, do compartimento mais ácido para o mais alcalino. O F^- absorvido que não for acumulado no organismo é excretado pela via urinária, por mecanismo igualmente dependente do pH da urina (BARBIER;

MENDOZA et al., 2010; BUZALAF, 2008; TOXICOLOGICAL, 2003; WHITFORD, 1996). Sabendo que o F^- atinge todas as células, e que sua adição na água de beber se dá sob a forma iônica, sabe-se que o F^- passa rapidamente através da mucosa intestinal e intervém com as principais vias metabólicas do sistema (CHATTOPADHYAY et al., 2011).

O seu uso na água de beber tem auxiliado na prevenção contra a cárie dentária. Dentre os mecanismos de prevenção da cárie, é proposto que o F^- fortalece as estruturas dentárias em todas as suas formas (MURRAY, 1992). No entanto, esse efeito positivo do F^- é dependente de doses baixas, já que doses mais elevadas podem provocar a fluorose dentária ou até mesmo a esquelética (SIDDIQUI, 1955).

3.3 TOXICIDADE DO FLUORETO NO METABOLISMO

Uma vez que o F^- está disponível na natureza, nos produtos odontológicos e em diversos alimentos, isso o torna disponível para possíveis ingestões excessivas, podendo levar a respostas tóxicas no organismo (PEREIRA, et al., 2009).

Os estudos de toxicidade do F^- são na sua maioria realizados em modelos animais. Nesse caso, o metabolismo do F^- em ratos é cerca de 5 vezes mais acelerado em relação ao de humanos. Assim, a dose de 15 mg/L de F^- para ratos equivale a ~ 3 mg/L para humanos, a qual é suficiente para provocar alterações hepáticas. As respostas tóxicas ao F^- podem ser agudas ou crônicas, dependendo do tempo de exposição. (DUNIPACE et al., 1995).

3.3.1 Toxicidade aguda e crônica

A toxicidade aguda acontece quando há uma grande e única ingestão de F^- (BUZALAF, 2008). Os sinais e sintomas referentes a este tipo de intoxicação são: vômito com presença de sangue, diarreia, broncoespasmo, fibrilação ventricular, pupilas dilatadas, câibras, colapso cardíaco e comprometimento da função renal (BUZALAF, 2008; CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009).

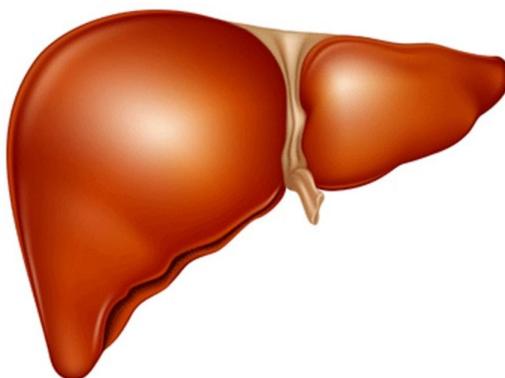
A toxidade crônica do F^- foi observada antes mesmo do conhecimento da utilidade deste íon para a prevenção da cárie dentária. Ela se produziu porque se observou uma alteração do esmalte decorrente ao consumo de pequenas quantidades deste íon durante o desenvolvimento dos dentes, patologia denominada de fluorose dentária (WHITFORD, 1996; BUZALAF, 2008). A ingestão crônica de

doses maiores pode também levar à fluorose esquelética, comum em regiões endêmicas cuja concentração natural de F na água de beber é superior a 5 mg/L (BUZALAF, 2008). Além dos tecidos mineralizados, outros tecidos ainda podem apresentar efeitos tóxicos como, por exemplo, os rins, por este ser a principal rota de eliminação do excesso de F⁻ ingerido, e alvo comum de intoxicações por este íon (CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009). O fígado, por ser um órgão de alta atividade metabólica, tem se tornado um alvo importante para investigação dos efeitos colaterais do F⁻ como a inibição da atividade de enzimas antioxidantes dentre elas a glutathione peroxidase, alterando os níveis de glutathione. (PEREIRA et al., 2013).

3.4 CARACTERÍSTICAS DO FÍGADO

O fígado tem como unidade funcional o lóbulo hepático, que tem elevada taxa metabólica, onde compartilha substratos e energia e recebe os nutrientes absorvidos no sistema digestivo, processando-os, armazenando-os e sintetizando substâncias que são transportadas para outras partes do corpo. Trata-se de um órgão que neutraliza e elimina substâncias tóxicas, além de ser responsável pela produção de proteínas plasmáticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MERRICK, 2006).

Figura 2- Fígado humano.



Fonte: JUNIOR, D.R.A. 2012

3.4.1 Ação do F⁻ no fígado

Embora a toxicidade do F ocorra na sua maioria nos tecidos mineralizados, observa-se que os tecidos moles também constituem alvo desse íon uma vez que após a sua absorção, o F é distribuído por todos os tecidos do organismo (CHIOCA; LOSSO; ANDRATINI, 2009; BARBIER-MENDOZA et al, 2010). Dentre os tecidos-alvo para intoxicação pelo F⁻, o fígado destaca-se por ser o principal órgão do corpo envolvido na desintoxicação do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O lóbulo hepático é a unidade funcional do fígado, o qual compartilha substratos e energia que recebe dos nutrientes absorvidos no trato digestivo e processa várias substâncias, de onde são transportadas para outras regiões. O fígado também é responsável pela produção de proteínas plasmáticas com função carreadora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Algumas alterações podem ser resultantes do próprio metabolismo do tecido hepático, para conseguir eliminar estes compostos. Isto pode acarretar a uma disfunção celular gerando estresse oxidativo, e, dependendo de fatores genéticos, poderá originar um estresse celular de maior ou menor extensão (STIRNIMANN et al., 2010).

Algumas alterações podem ser resultantes do próprio metabolismo do tecido hepático, para conseguir eliminar estes compostos. Isto pode acarretar a uma disfunção celular gerando o estresse oxidativo, o qual dependendo de fatores genéticos poderá originar um estresse celular de maior ou menor extensão (STIRNIMANN; KESSEBOHM, 2010).

Alguns trabalhos mostram aumento no estresse oxidativo no fígado em humanos e animais após exposição com doses crônicas de F (CHLUBEK D, 2003; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; STRUNECKA et al., 2007; XIONG et al., 2007; BLASZCZYK et al., 2008; PEREIRA et al., 2013). O tratamento de ratos submetidos à 25 mgF/L por meio da água de beber por 8 e 16 semanas induziu, no fígado, aumento na concentração de Ácido tiobarbitúrico (TBARS) e peroxidação lipídica, e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. (SHANTHAKUMARI et al., 2004).

Entre as revelações tóxicas sistêmicas em humanos, o principal efeito tóxico do F sobre o metabolismo celular é a sua interação com as enzimas. Na maioria dos casos, o F⁻ inibe a atividade enzimática, porém em outros casos, este estimula a atividade enzimática. O mecanismo de ação ocorre pela ligação do F⁻ a grupos de aminoácidos funcionais em torno do sítio ativo de uma enzima (SCHULZ et al., 2009), e isso depende da enzima que é comprometida.

3.4.2 Fluoreto e o estresse oxidativo

A administração do F⁻ tem se relacionado com os principais fatores a produzirem estresse oxidativo que podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças renais, hepáticas e cardíacas (HALLIWELL et al. 2006). Na literatura, há relatos de que o F⁻, de maneira dose-dependente pode causar efeitos variados sobre diversas quantidades de enzimas (GUO; SUN; SHENYANG., 2003), e no sistema antioxidante em ratos (HE; CHEN, 2006.)

O estresse oxidativo ocorre pela formação em excesso de radicais livres, promovendo um desequilíbrio em relação aos antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). O excesso de formação de radicais livres está ligado ao desenvolvimento das doenças. A doença hepática gordurosa, por exemplo, é uma das doenças crônicas mais conhecidas, e está associada com a síndrome metabólica, conjunto de doenças como a obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão (KAMMOUN et al, 2009). Condições como a hiperglicemia, comum na obesidade e no diabetes tipo 2, induz o estresse oxidativo, devido ao aumento da produção mitocondrial de ânions superóxido (BROWNLEE, 2001).

3.4.3 Proteína reguladora da glicose 78 (GRP78): estresse oxidativo e metabolismo de lipídio

Um dos indicativos de estresse oxidativo é dado pelo aumento da GRP78 (JI et al., 2011). A GRP78 é uma chaperona que mantém a homeostase do retículo endoplasmático (RE) (QUINONES; RIDDER; PIZZO, 2008.). Está envolvida em muitos processos de translocação de polipeptídios sintetizados através das membranas do RE, facilitando o dobramento de proteínas sintetizadas (HENDERSHOT, 2004; LI; LE, 2006). Em alguns estudos têm sido relatado que a

administração de F⁻ aumenta a expressão da GRP78, sendo, portanto um indicador molecular da presença de estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2013).

A relação entre o estresse oxidativo induzido pelo F e o metabolismo lipídico também foi demonstradas. Nesse contexto, a administração de F⁻ altera o metabolismo de lipídios, que por sua vez, estão relacionadas com o aumento da GRP78 e como consequência, do aumento do estresse no retículo endoplasmático (PEREIRA et al., 2013; KAMMOUN et al., 2009).

3.5 TÉCNICA DE WESTERN BLOT

A técnica de western blotting também conhecida como *protein immunoblot* e baseia-se na detecção de proteínas específicas em amostras de tecidos (TOWBIN et al., 1979). Esta técnica permite separar as proteínas por tamanho molecular por meio de um gel de poliacrilamida composto por sulfato de dodecilo de sódio (SDS) e uma membrana adsorvente para a ligação com os anticorpos específicos (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979)

Western blotting permite detectar, caracterizar e quantificar muitas proteínas, até mesmo as que estão em baixas concentrações nas amostras (KURIEN; SCOLFIELD, 2003). Consiste em cinco etapas para a sua realização: (1) extração e quantificação das proteínas, (2) fracionamento das proteínas em um gel de poliacrilamida, (3) transferências para uma membrana; (4) incubação com um anticorpo que detecta a proteína específica, (5) revelação para análise dos dados.

3.5.1 Processo de extração e quantificação de proteínas

Para realizar a técnica de *western blotting* é preciso, fazer a extração e a quantificação das proteínas. O método de Bradford é o mais utilizado e apresenta benefícios em relação aos outros, como agilidade, não exige aquecimento e elevada sensibilidade para baixas concentrações de proteínas. O método de Bradford se baseia na mudança de cor do corante *Coomassie Blue G-250* para cor azulada no comparecimento de proteínas como mostrado na Figura 3. As interações hidrofóbicas e iônicas consolidam a proteína-corante. Para a quantificação de proteínas na amostra, deve-se fazer uma curva de padronização com concentrações

exatas de uma proteína (utiliza-se soroalbumina bovina, BSA) e com uma leitura de absorbância em 595 nm (comprimento de onda que a proteína-corante absorve).

A partir dessa curva tem-se a equação de ajuste linear na qual é possível substituir os valores médios de absorbâncias das amostras, por valores da concentração das proteínas, o coeficiente linear deve ser maior que 0,98 (BRADFORD, 1976).

Figura 3- Método de BRADFORD: quantificação de proteínas.



Fonte: Elaborado pela autora

3.5.2 Fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida

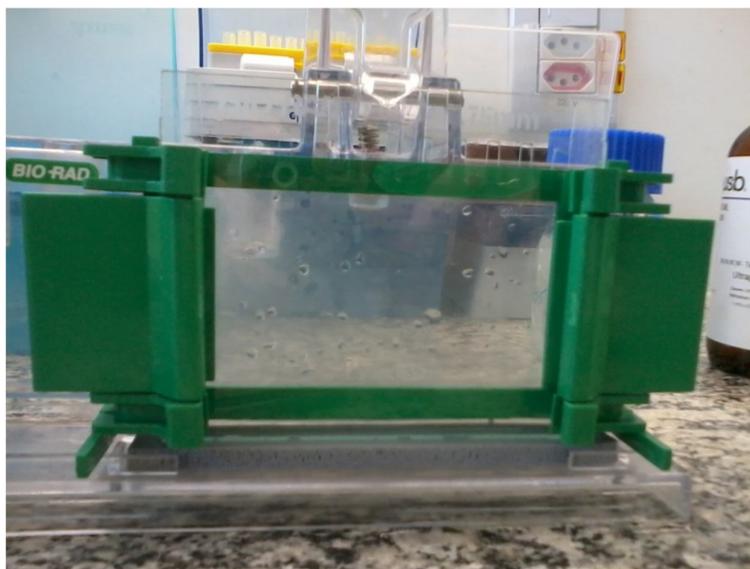
Eletroforese em gel de acrilamida é repetidamente denominada de PAGE. O gel de poliacrilamida é formado pela polimerização de monômeros de acrilamida na presença de quantidades pequenas de N,N'-methylene-bisacrylamide (bis-acrilamida). A bis-acrilamida consiste de duas moléculas de acrilamida ligadas por um grupo metileno e é utilizada como agente formador de ligações atravessadas.

A polimerização da acrilamida é uma polimerização catalizada por radicais livres, iniciada pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) que acelera a decomposição de íons persulfato em ânion sulfato e radical sulfato (uma molécula contendo elétron desemparelhado).



SDS-PAGE é utilizado para análises qualitativas de proteínas. É um método útil para seguir a purificação de proteínas. Consiste em um método em que proteínas são separadas segundo o tamanho (WILSON ; WALKER , 2010).

Figura 4 – Gel de SDS/PAGE



Fonte: Elaborado pela autora.

3.5.3 Processo de transferência

A parte de transferência mais utilizada baseia-se no contato direto entre o gel da eletroforese e uma membrana, usualmente de nitrocelulose ou polivinil difluoreto (PVDF), com aplicação de um campo elétrico, submerso em tampão básico, como mostrado na Figura 5. A transferência ocorre quando o tampão entra nos poros e remove as proteínas para a membrana, mantendo-as separadamente (MORAES et al., 2013) As proteínas se ligam na membrana através de interações hidrofóbicas (KURIEN; SCOFIELD, 2003).

Embora a membrana de nitrocelulose seja a mais vantajosa pelo seu menor custo, a de PVDF tem uma maior sensibilidade e retém as proteínas por mais tempo.

Amostras aplicadas no SDS-PAGE são fervidas por 5 min em tampão de amostra contendo SDS e β -mercaptoetanol. O β -mercaptoetanol diminui as pontes de dissulfeto que mantém a estrutura terciária de proteínas, o SDS liga-se à proteína fazendo seu desnaturamento. Os tampões contêm um corante de azul de bromofenol, que aceita a visualização da corrida eletroforética. As amostras são aplicadas e ligam-se a corrente, todas as espécies migram com a mesma velocidade.

O complexo proteína-SDS carregado negativamente move-se para o ânodo, e como todas as proteínas possuem a mesma carga. Quanto menor a proteína, mais facilidade ela passa através dos poros do gel. Quando o corante chega na extremidade do gel, a corrente é desligada e o gel é removido (WILSON ; WALKER, 2010).

Figura 5- Migração e transferência das proteínas.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.5.4 Incubação e revelação para análise dos dados.

Após o processo de transferência, a membrana é incubada em uma “solução bloqueadora”, cuja função é cobrir as regiões que não possuem as proteínas de interesse. Posteriormente a membrana é tratada com anticorpo específico para a proteína que se deseja analisar, chamado anticorpo primário. A seguir, após o tempo

necessário a membrana é reincubada com o anticorpo secundário que comumente está complexado a uma enzima reveladora e na medida em que for incubada com seu substrato específico, emitirá um sinal, por exemplo, fotossensível (MORAES et al., 2013).

Figura 6- Processo de incubação das membranas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em virtude do exposto, a técnica de *Western Blotting* é muito utilizada em trabalhos que objetivam identificar proteínas-alvo de diferentes efeitos biológicos, portanto esta foi a técnica escolhida para a análise da expressão da GRP78.

4 METODOLOGIA

Nesse trabalho, avaliamos a expressão da GRP78 para correlacionar com o estresse oxidativo induzido pelo F^- , e dessa forma compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida por esse elemento químico.

4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Todos os animais (*Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos recém-desmamados) foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Instituição.

Os animais permaneceram em caixas plásticas em grupos de 3 durante todo o período experimental. Utilizou-se 36 animais recém-desmamados, com 21 dias de vida, que foram divididos em 6 grupos (n=6 animais por grupo), de acordo com a dose de F adicionado à água de beber [(0 mg F/L (controle – somente água ultrapura), 15 mg F/L ou 50 mg F/L F] e o tempo de tratamento (20 e 60 dias).

Essas doses foram escolhidas devido ao fato de as mesmas induzirem concentrações plasmática de F equivalentes àquelas observadas em humanos que consomem água de beber nas concentrações de 0 mg F/L, 3 mg F/L ou 10 mg F/L, respectivamente (DUNIPACE et al., 1995). Os períodos de 20 e 60 dias foram escolhidos, pois, de acordo com trabalhos anteriores, no período de 60 dias (quando os animais têm por volta de 80 dias de vida), o organismo parece se adaptar aos efeitos tóxicos do F^- não sendo possível observar alterações significativas relacionadas à toxicidade (DĄBROWSKA; LETKO; BALUNOWSKA, 2006).

4.2. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Ao término do período experimental de 20 ou 60 dias, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de 0,5 mL/Kg de peso corporal de xilazina (Anasedan, Agribands, USA) acrescido de 1,5 mL/Kg de peso corporal de cloridrato de quetamina (Vetaset, Fort Dodge, Iowa, USA). Em seguida, a cavidade peritoneal e a torácica foram expostas, e o coração foi puncionado com agulha para coleta do

sangue colhido com uma seringa plástica heparinizada (uma gota de heparina contendo 5.000 UI/mL), e transferido para tubos plásticos (*Eppendorf*). Os tubos contendo o sangue foram homogeneizados e posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos (Jouan A14) para obtenção do plasma para a posterior quantificação de F^- . O fígado (lóbulo esquerdo) foi coletado e armazenado a $-80^{\circ}C$ para a avaliação da GRP78.

4.3 DOSAGENS DE FLUORETO

4.3.1 Plasma

Para a análise de fluoreto no fígado, inicialmente será feita uma homogeneização com 0,2 g de fígado para 0,5 mL de água (PEREIRA, 2011).

Para a análise do F^- no plasma foi feita uma pré-difusão, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico saturado num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer fluoreto residual que possa contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO_2 , o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada. A difusão seguirá como descrito (TAVES, 1968; WHITFORD, 1996).

Na tampa das placas de Petri foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametildisiloxano (HMDS, Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite.

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, contendo todo o F^- foi analisada com o eletrodo Orion

9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

4.3.2 Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F^- da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do fluoreto pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 $\mu\text{g/mL}$. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podem-se detectar quantidades de fluoreto acima de 0,0015 μg . Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente estão em torno de 0,5-1,0 $\mu\text{mol/L}$ (0,0095-0,019 $\mu\text{g/mL}$), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teve-se uma quantidade de F^- de 0,0095-0,019 μg , portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo. As soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 $\mu\text{g F}$) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F^- (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV) foram convertidas para μg de F^- , através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F^- medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M). Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de F^- que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostra que o F^- nos padrões difundidos tem sido completamente captado e analisado.

Foi feito também uma sequência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV deverão ser as mesmas tanto para os padrões que não sofrerem adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofrerem, assim como também para os que não sofrerem difusão.

4.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FÍGADO

4.5.1 Homogeneização do tecido

As amostras foram homogeneizadas em moinho criogênico, modelo 6770 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, EUA). Para isso, as amostras foram fracionadas em fragmentos de um centímetro de acordo com a orientação dos fabricantes, colocadas em tubos de policarbonato, nos quais os fragmentos foram triturados com 15 batimentos por segundo, 3 ciclos de 2 min com 1 min de intervalo e um pré-congelamento inicial de 1 min proporcionado pelo N₂ que previne a degradação de componentes da amostra e a mantém em baixa temperatura. Ao final do processo, obtivemos amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo. Com esse procedimento, as amostras estavam prontas para a extração e quantificação de proteínas totais para a realização do *western blotting*. (BRADFORD, 1976)

4.5.2 Extrações e dosagem das proteínas

Para a extração das proteínas foi pesado 100 µg de amostra e adicionados 200 µl da solução (Tampão RIPA, contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, e 0,2% Nonidet P-40) acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (Roche Diagnostics). A amostra foi então sonicada duas vezes por 20 segundos cada ciclo em gelo e centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm (4°C). Em seguida, o sobrenadante contendo as proteínas totais extraídas foi coletado e armazenado a -80°C, até a dosagem das proteínas.

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o kit Bradford (Biorad Protein Assay Biorad) baseado no método de Bradford, em duplicata (BRADFORD, 1976). Essa técnica é utilizada para medir concentrações de proteínas de uma amostra a partir da comparação com concentrações conhecidas de albumina ligadas ao corante *Coomassie blue*. Para a quantificação, as amostras foram diluídas 10 vezes

em água, sendo que 5 μL de cada amostra diluída foram pipetados em placas de 96 poços, em duplicata. O mesmo volume de diferentes concentrações de BSA (albumina do soro bovino) foi adicionado à placa. A seguir, foram adicionados 250 μL do reagente de Bradford para detecção das proteínas. Após homogeneização, foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica a 595 nm. O valor obtido foi então interpolado em uma curva, previamente estabelecida, utilizando-se da mesma metodologia para concentrações conhecidas da proteína- padrão. Após a quantificação, foi calculada a concentração de proteína total em $\mu\text{g/mL}$ em cada amostra experimental.

4.6 WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western blotting* é uma técnica que se baseia na separação das proteínas pelo peso molecular de cada uma e utiliza dois tipos diferentes de géis: *stacking* e de separação. O gel *stacking* é ligeiramente ácido (pH 6,8) e tem uma concentração de acrilamida menor (acrilamida 30%; bisacrilamida 0,8%; Tris 0,5 M, pH 6,8; SDS 10%; TEMED; Persulfato de amônio 10%). O gel de separação ou gel de resolução é básico (pH 8,8) (solução acrilamida; Tris 1,5 M, pH=8,8; SDS 10%; TEMED; Persulfato de amônio 10%) (MAHMOOD; YANG, 2012).

Para o preparo dos géis de poli(acrilamida) foram utilizados materiais específicos para a técnica, obtidos no departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo-Bauru. A primeira etapa do ensaio consiste no condicionamento das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poli(acrilamida). Com este método, é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular em (kD), e seu ponto isoelétrico sem que as proteínas sejam dispersas no gel, permitindo estudos nessas frações protéicas. A porcentagem do gel de dá de acordo com o tamanho da proteína de interesse, sendo que quanto maior for o peso da proteína, menor será a porcentagem de acrilamida no gel de resolução. (CHIBA, 2010). Esse método foi desenvolvido por (LAEMMLI, 1970) e posteriormente modificado por (GARFIN, 1990).

4.6.1 Preparo do gel

As proteínas, quando carregadas sobre o gel, têm uma carga negativa, e estas se deslocam em direção ao eletrodo positivo, quando é aplicada uma tensão sobre as mesmas.

As placas de vidro utilizadas têm espessura de 0,75mm e 1,0mm e foram minuciosamente lavadas e testadas com água deionizada para verificar se não haveria nenhum indício de vazamento de líquido. Na sequência, a água deionizada foi retirada e as placas foram secas com papel filtro. A sequência de preparo da solução dos géis foi seguida rigorosamente conforme a tabela 1.

Tabela 1: Volumes das soluções para o preparo dos géis *stacking* e de resolução a 10%..

Gel de resolução					
Gel à 10%	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL
Água	2,0 mL	4,0 mL	5,9 mL	7,9 mL	9,9 mL
Acrilamida	1,7 mL	3,3 mL	5,0 mL	6,7 mL	8,3 mL
Tris 1,5M pH 8	1,3 mL	2,5 mL	3,8 mL	5,0 mL	6,3 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL	250 µL
APS 10%	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL	250 µL
TEMED	2,0 µL	4,0 µL	6,0 µL	8,0 µL	10 µL

Gel stacking					
	1 mL	2 mL	3 mL	4mL	5 mL
Água	680 µL	1,4 mL	2,1mL	2,7 mL	3,4 mL
Acrilamida	170 µL	330 µL	500 µL	670 µL	830 µL
Tris 0,5M pH 6,8	130 µL	250 µL	380 µL	500 µL	630 µL
SDS 10%	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL
APS 10%	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL

TEMED	1,0 µL	2,0 µL	3,0 µL	4,0 µL	5,0 µL
--------------	--------	--------	--------	--------	--------

Fonte: MAHMOOD; YANG, 2012.

Inicialmente, o gel de resolução foi aplicado na placa aguardando o tempo para a sua polimerização. A seguir, foi adicionada a solução do gel *stacking* e imediatamente colocados os pentes entre as placas para formar os poços onde as amostras foram aplicadas.

Na montagem do sistema, o gel ficou em contato com o tampão de corrida Laemmli pH 8,3 10x (Tris 0,247 M; glicina 1,92 M; SDS 10%). As amostras foram previamente fervidas por 5 min e então aplicadas no gel. O padrão de proteínas de pesos moleculares distintos também foi aplicado (Due Range Rainbow -Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel (Biorad, Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA). As amostras foram transferidas do gel de *stacking* sob voltagem constante em 100 V a 10mA por gel durante 15 minutos até que todas as amostras tivessem sido transferidas para o gel de separação, que pôde ser observado pela presença do corante Coomassie blue. Posteriormente, foi aplicada a voltagem constante de 100 V a 20 mA por gel para a corrida no gel de separação, durante 40 minutos (CHIBA, 2010).

Ao final da corrida, o gel foi retirado do sistema e colocado em um recipiente com tampão de transferência (Tris-20 mM; Glicina-192 mM; metanol- 20%, pH 8,3).

Foram utilizadas membranas de nitrocelulose para a transferência das proteínas contidas no gel. Para tanto, foi montado o sistema contendo cassete, esponja; papel (duas folhas); gel; membranas de nitrocelulose; papel (duas folhas); esponja e cassete. Então o sistema foi fechado e adicionado ao suporte do sistema de transferência, sob agitação e resfriamento. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 1 h, a 4°C.

4.6.2 Incubação com anticorpos

Posteriormente à transferência, foi iniciada o processo de incubação com os anticorpos. Inicialmente, a membrana foi incubada na presença de solução bloqueadora (Tween 0,1%; TBS 1x - com 5% de leite desnatado (Molico), durante 2h

à temperatura ambiente (RT). A lavagem foi feita por quatro sessões de 10 minutos cada em solução TBS-TWEEN (TBS 10x; Tween 1x). Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C em solução bloqueio contendo o anticorpo primário anti-GRP78 (Abcam, Cambridge, MA, USA) na diluição de 1:500 ou anti- β -tubulina (Cell Signaling) na diluição de 1:200.. No dia seguinte, o anticorpo foi recuperado e a membrana foi lavada quatro vezes com solução TBS-Tween e então foi reincubada durante 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG de contendo peroxidase de "horseradish" (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Ao final desse período, foram realizadas quatro lavagens sucessivas da membrana com solução TBS-Tween, com duração de 10 min cada. A seguir, foi adicionado à membrana 1 mL da solução de quimiluminescência (formada pela mistura 1:1 dos reagentes A e B do kit de *ECL™ Plus detection reagentes*, GE Healthcare, Amersham™ prime), e incubado por 5 minutos sobre uma placa de petri. Por fim, foi retirado o excesso de reagente e a membrana foi colocada no aparelho *LI-COR® C-DiGit™ Chemiluminescence Western Blot Scanner* durante 12 minutos para a leitura e identificação das bandas de interesse.

A densitometria foi analisada utilizando o *software* Image Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixels individuais para cada banda, sendo feita normalização a partir das bandas da proteína constitutiva (β -tubulina).

4.6.3 Análise estatística

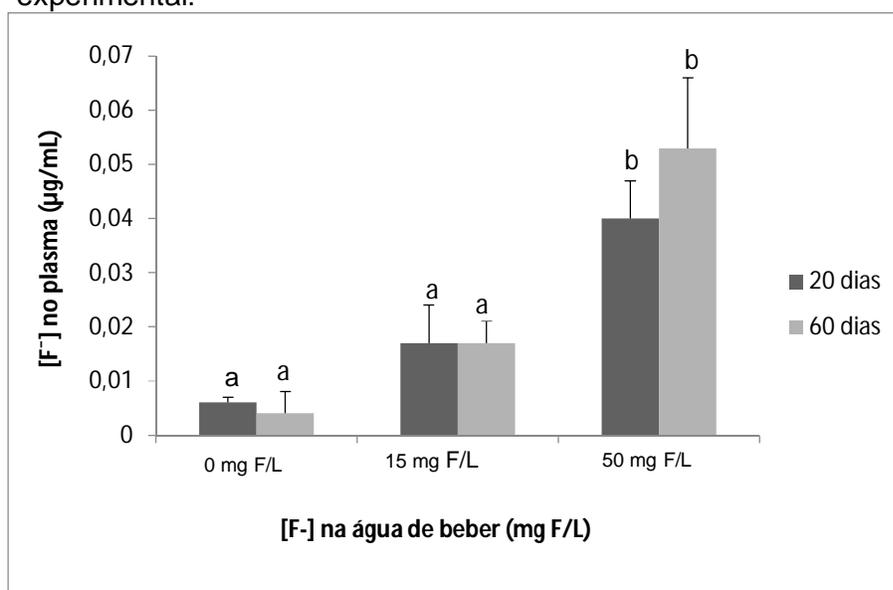
Foi realizado o teste da normalidade dos dados utilizado o *software* InStat versão 3.0 para *Windows*. A análise estatística foi feita pela análise de variância ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Dunn. As comparações entre as amostras foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÕES DE F NO PLASMA

A figura 2 mostra os valores da concentração plasmática média de F^- , em função da concentração de fluoreto administrada em animais tratados durante períodos de 20 e 60 dias.

Figura 2 - Concentração plasmática de F^- nos diferentes grupos experimentais nos períodos de 20 e 60 dias. O F foi quantificado por difusão facilitada por HMDS e detecção em eletrodo de Orion. Os dados representam a média de 6 amostras individuais (em $\mu gF/mL$ +/desvio-padrão). Letras diferentes representam diferença estatística entre as comparações dentro de cada período experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores médios de F^- ($\pm DP$) encontradas foram $0,006 \pm 0,001$, $0,017 \pm 0,007$ e $0,040 \pm 0,007$ $\mu g/mL$ para os grupos controle, 15 e 50 mg F/L respectivamente no 20º dia. Os respectivos valores para os grupos no 60º dia foram $0,002 \pm 0,004$, $0,017 \pm 0,004$ e $0,053 \pm 0,013$ $\mu g/mL$. A análise por ANOVA a 2 critérios (sendo a dose e o tempo de exposição as variáveis) demonstrou diferença significativa entre as concentrações de F^- ($F=33,067$, $p<0,0001$), mas não entre os tempos experimentais ($F=0,347$, $p=0,567$), sem interação entre ambos ($F=0,636$, $p=0,545$). Em relação às concentrações de F^- administradas, embora tenha havido uma relação dose-resposta, apenas os animais tratados com 50 mgF/L tiveram concentrações plasmáticas significativamente maiores que os grupos controle e tratado com 15 mgF/L ($p<0,05$).

De maneira semelhante, em trabalho utilizando o mesmo modelo experimental foi demonstrado que a administração crônica de F^- (60 dias) nas concentrações de 5 mg/L e 50 mg/L induz concentração plasmática de F^- em ratos diretamente proporcional à dose (PEREIRA et al., 2011). Embora não significativa na menor concentração, esse modelo demonstra a eficiência no tratamento dos mesmos com F^- por meio da água de beber.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Os valores representados nas Tabelas 2 e 3 são referentes às quantidades equivalentes das proteínas totais no fígado em $\mu g/mL$, para os grupos de 20 e 60 dias, respectivamente.

Tabela 2: Valores individuais da concentração de proteínas ($\mu g/mL$) totais do período de 20 dias.

20 dias 0mg F/L	20 dias 15 mg F /L	20 dias 50 mg F/L
54088	50016	51083
29844	57971	59179
62870	66370	85587
28062	61979	51161

56888	74833	54216
59115	55170	57970

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3: Valores individuais da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) totais do período de 60 dias.

60 dias 0mg F/L	60 dias 15 mg F /L	60 dias 50 mg F/L
40471	34108	57525
39007	38626	52434
31626	56379	53580
56252	57843	59943
16545	62870	105632
55552	65606	36780

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da concentração total de proteínas do fígado, foi calculado o volume necessário para conter 40 μg de proteínas totais para a avaliação da expressão da proteína de interesse. A tabela 4 demonstra os valores individuais em μL , das amostras de 20 e 60 dias.

Tabela 4. Volumes (em μL) de cada amostra de fígado de ratos contendo 40 μg de proteínas totais.

20 dias 0mg F/L	20 dias 15 mg F /L	20 dias 50 mg F/L
0,74	0,80	0,46
1,34	0,69	0,68
0,64	0,60	0,47
1,43	0,65	0,78
0,70	0,53	0,74
0,68	0,73	0,69

60 dias 0mg F/L	60 dias 15 mg F /L	60 dias 50 mg F/L
0,99	1,17	0,70
1,03	1,04	0,76
1,26	0,71	0,75
0,71	0,69	0,67
2,42	0,64	0,38
0,72	0,61	1,09

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a obtenção desses valores, foi calculado os valores necessários da solução de amostra (tampão RIPA, tampão 4x e amostra), em um volume final de 40 μL a serem resolvidos no gel. Na tabela 5 estão evidenciados esses volumes.

Tabela 5. Volumes (em μL) de tampão RIPA, amostra e tampão 4x para o preparo das amostras finais a serem resolvidas em gel.

20 dias	RIPPA	AMOSTRA	TAMPÃO 4X
1	28,52	1,48	10 μL
2	27,32	2,68	10 μL
3	28,73	1,27	10 μL
4	27,15	2,85	10 μL
5	28,59	1,41	10 μL
6	28,65	1,35	10 μL
7	28,40	1,60	10 μL
8	28,62	1,38	10 μL
9	28,79	1,21	10 μL
10	28,71	1,29	10 μL
11	28,93	1,07	10 μL
12	28,55	1,45	10 μL

13	29,08	0,92	10 µL
14	28,65	1,35	10 µL
15	29,07	0,93	10 µL
16	28,44	1,56	10 µL
17	28,52	1,48	10 µL
18	28,62	1,38	10 µL

60 dias

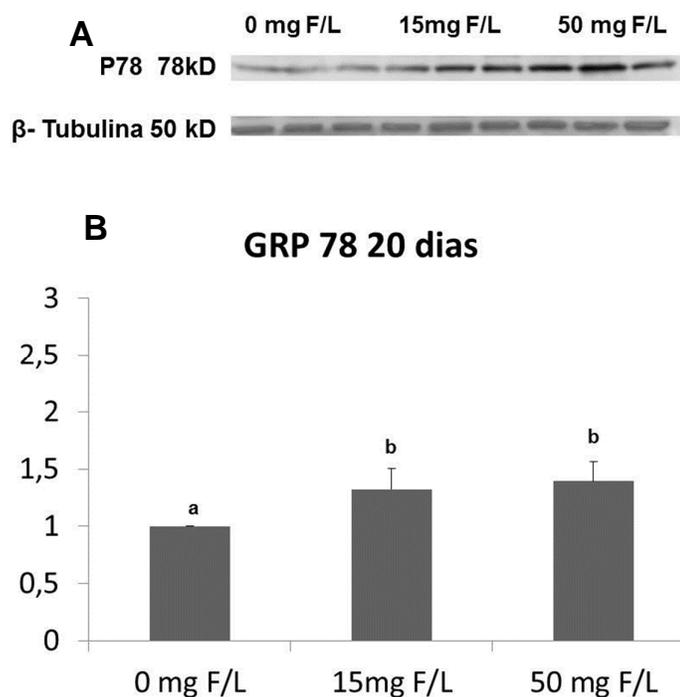
1	28,02	1,98	10 ul
2	27,95	2,05	10 ul
3	27,47	2,53	10 ul
4	28,58	1,42	10
5	25,16	4,84	10 ul
6	28,56	1,44	10 ul
7	27,65	2,35	10 ul
8	27,93	2,07	10 ul
9	28,58	1,42	10 ul
10	28,62	1,38	10 ul
11	28,73	1,27	10 ul
12	28,78	1,22	10 ul
13	28,61	1,39	10 ul
14	28,47	1,53	10 ul
15	28,51	1,49	10 ul
16	28,67	1,33	10 ul
17	29,24	0,76	10 ul
18	27,82	2,18	10 ul

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 WESTERN BLOTTING

As Figuras 7 e 8 mostram as imagens dos *blots* representativos obtidos para a GRP78 e β -tubulina das amostras de 20 e 60 dias. A análise semi-quantitativa (n=6) foi obtida pela densitometria sendo os valores transformados em valores arbitrários e calculada a razão entre o da GRP78 pelo da β -tubulina.

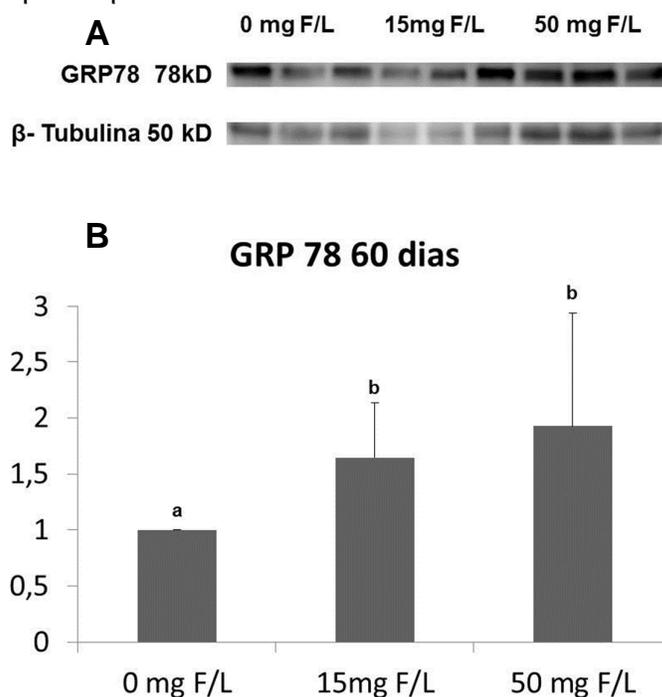
Figura 7: Expressão semi-quantitativa da proteína GRP78 em fígado no 20º dia. (A) Blot representativo da GRP78 e tubulina nos grupos identificados (n=3, sendo o gel repetido com as demais amostras totalizando n=6). (B) Análise densitométrica utilizando o *software* Image Studio Lite. Letras diferentes representam alteração significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 7 é possível observar a expressão das proteínas no fígado de ratos tratados por 20 dias em amostras individuais de cada grupo (n=6). O teste ANOVA encontrou diferença estatística significativa para a expressão da GRP78 (Kw:12.053 $p=0,0024$) e o teste de Dunn indicou um aumento significativo da expressão da GRP78 nos grupos 15 e 50 mgF/L em relação ao do grupo controle (0 mgF/L).

Figura 8: Expressão semi-quantitativa da proteína GRP78 em fígado no 60º dia. (A) Blot representativo da GRP78 e tubulina nos grupos identificados (n=3, sendo o gel repetido com as demais amostras totalizando n=6). (B) Análise densitométrica utilizando o *software* Image Studio Lite. Letras diferentes representam alteração significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado no 20º dia, o teste ANOVA encontrou diferença estatística para a expressão da GRP78 ($Kw = 10.895$; $p = 0,0043$) e o teste de Dunn revelou um aumento significativo da expressão da GRP78 nos grupos de 15 e 50 mgF/L no 60º dia, quando comparado com o grupo controle (0 mgF/L).

Como o fígado é um órgão responsável por realizar a homeostase corporal, os níveis de triglicerídeos no fígado são regulados por mecanismos como síntese da lipogênese de *novo*, lipólise, absorção de lipídios na dieta, e entrega / secreção de lipoproteína (JO et al., 2013; TANAKA et al., 2011) .

Foi estabelecida uma relação entre o estresse oxidativo induzido pelo F⁻ e o metabolismo lipídico, que em nossa recente pesquisa, foi possível observar que o F⁻ pode causar dislipidemia quando administrado por 20 e 60 dias (PEREIRA et al., 2013). Isso foi demonstrado pela administração de F⁻, que altera o metabolismo de

lipídios que por sua vez, estão relacionadas com o aumento da GRP78 e com o aumento do estresse no retículo endoplasmático (PEREIRA et al., 2013; KAMMOUN et al., 2009).

O RE é responsável pelo metabolismo lipídico, e também pelo armazenamento e liberação de Ca^{2+} . O estresse no RE ocorre quando há um excesso de fluxo de polipéptidos nascentes e desdobrados no sistema onde há um acúmulo de proteínas desdobradas. (FU et al. , 2012). Deve-se ter um controle na qualidade do RE, pois sob condições normais, tem-se um equilíbrio homeostático entre o afluxo de péptidos não dobrados e a capacidade de dobragem do RE e isso evita acúmulo de proteínas desdobrada ou deformadas. As conformações de proteínas anormais são uma das principais causas que perturbam a homeostase celular. Portanto, perturbações no ER podem ser a origem de muitas doenças e anormalidades do desenvolvimento (SCHRODER; KAUFMAN, 2005). E a GRP78 por ser uma reguladora no RE, seu principal papel na organela é amenizar o estresse de dobramento de proteínas no RE e evitar a morte das células causada pelo estresse. E seu aumento pode nos dizer que está havendo um estresse fisiológico que afeta diretamente a glicosilação das proteínas (WOODEN et al., 1991).

Esses resultados nos permite sugerir que o F^- , independente da concentração, provoca estresse no retículo endoplasmático visualizado pelo aumento da GRP78, que está relacionada com o controle de homeostasia, controlando a produção de íons livres no organismo. Este aumento também foi observado em outro estudo onde se utilizou as doses de 25, 50 e 100 mgF/L de F^- em ratos. Os autores sugerem que o aumento desta proteína pode indicar a ativação da sinalização referente ao estresse no retículo endoplasmático provocado pela ação do F^- (ZHANG et al., 2013).

Uma das consequências do seu aumento é a inibição a SREBPs que é uma proteína responsável pela ativação da síntese de triglicerídeo através da conversão de Acetil CoA e outros precursores no fígado (KAMMOUN et al, 2009; FON TACER & ROZMAN, 2011). Logo a sua inibição reduz a produção de triglicerídeo no fígado e reduz as inclusões lipídicas. Em adição, a GRP78 está envolvida diretamente com o metabolismo da lipogênese *de novo*, que é capaz de inibir esta via por atuar na redução da produção de triglicerídeos (KAMMOUN, et al., 2009).

A literatura é vasta em demonstrar que a superexpressão da GRP78 está relacionada com o estresse no RE.

Contudo, Pereira et al., 2013 relata que quando administrado uma dieta hipercalórica, a GRP78 pode não estar aumentada devido ao fato de que o fígado possa ter a capacidade de se adaptar a essa ação do F⁻ no período de 60 dias, onde não observou um aumento significativo desta .

Porem esse trabalho mostra que a indução da expressão da GRP78 ocorre independente de uma dieta hipercalórica. Deste modo, parece ser dependente apenas da presença do F⁻. Além disso, é bastante conhecido que os efeitos tóxicos do F⁻ crônico são mais evidentes nos períodos iniciais do tratamento, sendo seguido de uma adaptação do organismo aos seus efeitos tóxicos. O fato da expressão da GRP78 estar aumentada também no 60^o dia sugere que essa proteína não pode ser considerada um marcador de estresse oxidativo em qualquer período da exposição.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, a análise de F^- do plasma possuiu uma tendência de dose-resposta, isso confirma a efetividade no tratamento de fluoreto nos animais.

Pode-se concluir que a exposição do F^- induz o estresse oxidativo no reticulo endoplasmático, visto pelo aumento da expressão da proteína GRP78. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, isso nos sugere que, esse aumento pode indicar que as alterações observadas no metabolismo de lipídio podem estar relacionadas ao acionamento de um dispositivo de defesa ligado a alterações na produção de triglicerídeos no fígado. Uma das consequências do aumento da GRP78 é com a lipogênese *de novo*, que pode ser capaz de inibir esta via por atuar na redução da produção de triglicerídeos, esse aumento também se relaciona com a inibição da SREBPs que quando inibida reduz a produção de triglicerídeo no fígado.

E pelo fato da GRP78 estar aumentada também no período de 60 dias, isso nos sugere que essa proteína pode não ser considerada um indicador da resposta de adaptação aos efeitos tóxicos do F^- *in vivo*.

REFERÊNCIAS

BARBIER, O; ARREOLA-MENDOZA L; RAZO LMD. Molecular mechanism of fluoride toxicity. **Chemico-Biological Interactions**. p. 320-321. 2010. Disponível em: < <http://ffo-olf.org/files/apoptosis.pdf>>. Acesso em. 05 abr 2016.

BLASZCZYK,I;MAMCZAR, G.E; KASPERCZYK,S; BIRKNER,E. i nfluence of fluoride on rat kidney antioxidante system: effects of methionine and vitamin E. **Biol Trace Elem Res**.2008. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12011-007-8030-6>>. Acesso em: 25 Fev 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72 p. 248-254. 1976.

BUZALAF, M.A.R. **Fluoretos e Saúde Bucal**. São Paulo: Livraria Santa Editora, 2008.

BUZALAF, C. P.; LIMA, L. A; BUZALAF, M. A. R. CHAPTER 4. Fluoride Metabolism. Food and Nutritional Components in Focus. **Royal Society of Chemistry**.v.1. p. 54-72. 2015

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**.1976. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em: 01 Mar 2016.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v.414. p. 813. 2001

CHATTOPADHYAY, A. Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice.**Springer**.p. 327. 2011.

CHIOCA L.R; LOSSO E.M; ANDRATINI R. Efeitos da intoxicação com flúor no sistema nervoso central. **Neurobiologia**. v.72. p.117. 2009.

CHIBA, F.Y. **Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico em tecido muscular e hepático de ratos tratados cronicamente com NaF**. 2010. 106 f. Tese (Mestre em

Odontologia Preventiva e social). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba. 2010.

CHLUBEK, D. Fluoride and oxidative stress. *Fluoride*.2003. Disponível em: <http://www.fluorideresearch.org/364/files/FJ2003_v36_n4_p217-228.pdf> Acesso em: 02 Fev 2016.

DABROWSKA, E; LETKO, R; BALUNOWSKA, M. Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. **Advances in Medical Sciences**. 2006. Disponível em: < http://www.advms.pl/ms_2006/21.pdf>. Acesso em: 20 fev 2016.

DUNIPACE, A.J., et al. Effect of Aging on Animal Response to Chronic Fluoride Exposure. **J DENT RES**. 1995. Disponível em: < <http://jdr.sagepub.com/content/74/1/358.long>>. Acesso em: 20 fev 2016.

FLÚOR. **Quimica Nova**, 1998. Disponível em: < <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc08/elemento.pdf>>. Acesso em: 15 Jun 2016.

FU, S; WATKINS, S.M; HOTAMISLIGIL, G.S. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. **Cell Metab**.v.15. 2012

GARFIN, D.E. One-dimensional gel eletrophoresis. **Methods Enzymol**.1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799082035Z>>. Acesso em: 01 fev 2016.

GUO, Y.X; SUN, F.G; SHENYANG, S.C.Y. Oxidative stress from fluoride induced hepatotoxicity in rats. **Fluoride**. v.36. p. 25-28. 2003

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. AND CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. **J Lab Clin Med**.v.119.p. 598-620.1992.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**.v. 141. p. 312. 2006.

HE, L. F; CHEN, J. G. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. **World J Gastroenterol**. 2006.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4087913/>>. Acesso em: 02 jan 2016

Jl, C., et al. Liver-Specific Loss of Glucose-Regulated Protein 78 Perturbs the Unfolded Protein Response and Exacerbates a Spectrum of Liver Diseases in Mice. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125405/>>. Acesso em: 03 jan2016.

JO, H; CHOE, S.S; SHIN, K.C; JANG, H; LEE, J.H; SEONG, J.K; BACK, S.H; KIM, J.B. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. **Hepatology**. v.57.p.1366–1377. 2013.

JUNIOR, D.R.A. Reduzir lesões aprendendo mais. **ABRAMET**. 2012. Disponível em: < http://www.abramet.com.br/conteudos/artigos/reduzir_lesoes_aprendendo_mais/>. Acesso em: 21 Jun 2016.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. In: Órgãos associados ao trato digestivo**. Ed. Guanabara KOOGAN S. A. Rio de Janeiro. 2004.

KAMMOUN, H. L., et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. **J Clin Invest**. 2009. Disponível em: < <https://www.jci.org/articles/view/37007>>. Acesso em: jan 2016.

KURIEN, B. T; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**. San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

LAEMMLI, U.K. Laboratory of Molecular Biology. **Nature**. V.227.P.680-685. 1970. Disponível em: < <http://sci-hub.cc/10.1038/227680a0>> Acesso em: 16 Jun 2016.

LI, J; LEE, A. S. Stress Induction of GRP78/BiP and Its Role in Cancer. **Current Molecular Medicine**. 2006. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/55195/article>>. Acesso em: 01 Jan 2016.

MAHMOOD, T; YANG, P.C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>>. Acesso em: 20 jan 2016.

MA Y; HENDERSHOT, L.M.E.R. Chaperone functions during normal and stress conditions. **J Chem Neuroanat**. v. 28. p.51-65.2004

MERRICK, B. A. Toxicoproteomics in liver injury and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.** v.1076. p.707. 2006

MORAES, C.S., et al. Métodos experimentais no estudo de proteínas.**IOC.** 2013. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf >. Acesso em: 20 Maio 2016.

MURRAY, J. J. O Uso Correto de Fluoretos na Saúde Pública. São Paulo. **Editora Santos.** 1992.

PEREIRA, H. A., et al. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One.** 2013. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075343>>. Acesso em: 31 Dez 2015.

PEREIRA, M., et al. Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. **Neurotox Res.** v.19.p.55-62. 2009.

QUINONES, Q. J; RIDDER, G. G; PIZZO, S. V.GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. **Histol Histopathol.** 2008. Disponível em: < http://www.hh.um.es/pdf/Vol_23/23_11/Quinones-23-1409-1416-2008.pdf>. Acesso em: 20 Abr 2016.

SAMBROOK, J; MANIATIS, T; FRITSCH, E.F.Molecular Cloning- A laboratory Manual.**Cold Spring Harbor Laboratory.**v.3.1989.

SCHRODER, M; KAUFMAN, R.J.The mammalian unfolded protein response. **Annu Ver Biochem.** v.74.p.739–789. 2005.

SCHULZ, M.A; AGAMA, S. C; MENDOZA, A. L; MÁRQUEZ, R. B; BARBIER, O; RAZO, D. L.M; GARRIDO, M. M.E. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. **Toxicology Letters.** p.179-180. 2009.

SIDDIQUI, A.H. Fluorosis in Nalagende district, HyderabadDeccan. **J. Br. Med.** 1955. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1981710/pdf/brmedj03237-0018.pdf>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

SHANTHAKUMARI, D; SRINIVASALU. S; SUBRAMANIAN. S., et al. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. **Toxicology**. v.204. p.219. 2004.

STIRNIMANN, G., K. KESSEBOHM, *et al.* Liver injury caused by drugs: an update. **Swiss Med Wkly**. v.140, p.1-3. 2010.

STRUNECKA, A., et al. Fluoride interactions: from molecules to disease. **Current Signal Transduction therapy**. v.2.p.190. 2007.

TANAKA, M; ITOH, T; TANIMIZU, N; MIYAJIMA, A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. **J Biochem**. v. 149.p.231–239. 2011

TAVES, D. R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane -50. **Talanta**.v. 15. p. 69-74. 1968.

TOXICOLOGICAL Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride and Fluorine. **atsdr.cdc**, 2003. Disponível em: <www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>. Acesso em: 29 Maio 2016.

TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Biochemistry**.v.76.p.4350-4354.1979.

WILSON, K ; WALKE, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.p.399.2010. Disponível em: <<https://muhammad1988adeel.files.wordpress.com/2013/12/principals-and-techniques-of-biochemistry-and-molecular-biology-7th-ed-wilson-walker.pdf>>. Acesso em: 16 Jun 2016.

WOODEN, S.K. et al. Transactivation of the grp78 promoter by malfolded proteins, glycosylation block, and calcium ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF- κ B. **Mol Cell Biol**. v.11.p. 5612-5623.1991

WHITFORD, G.M. **Fluorides: metabolism, mechanisms action and safety**. Dent. Hyg.1983.

WHITFORD, GM. **The metabolism and toxicity of fluoride**. Oral Sci.1996.

WHITFORD, G.M; PASHLEY, D.H; GARMAN ,R.H. **Effects of fluoride on structure and function of canine gastric mucosa.** V. 42. 1997.

XIONG, X.; Liu, J.L; He, W.H; Xia, T; He, P; Chen, X.M; Yang, K. Dose-Effect Relationship between Drinking Water Fluoride Levels and Damage to Liver and Kidney Functions in Children. **Environmental research.** v. 103.p. 112-116. 2007.

ZHANG, K; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. **Neurology.**2005.Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061804000304>>. Acesso em: 19 Mar 2016.