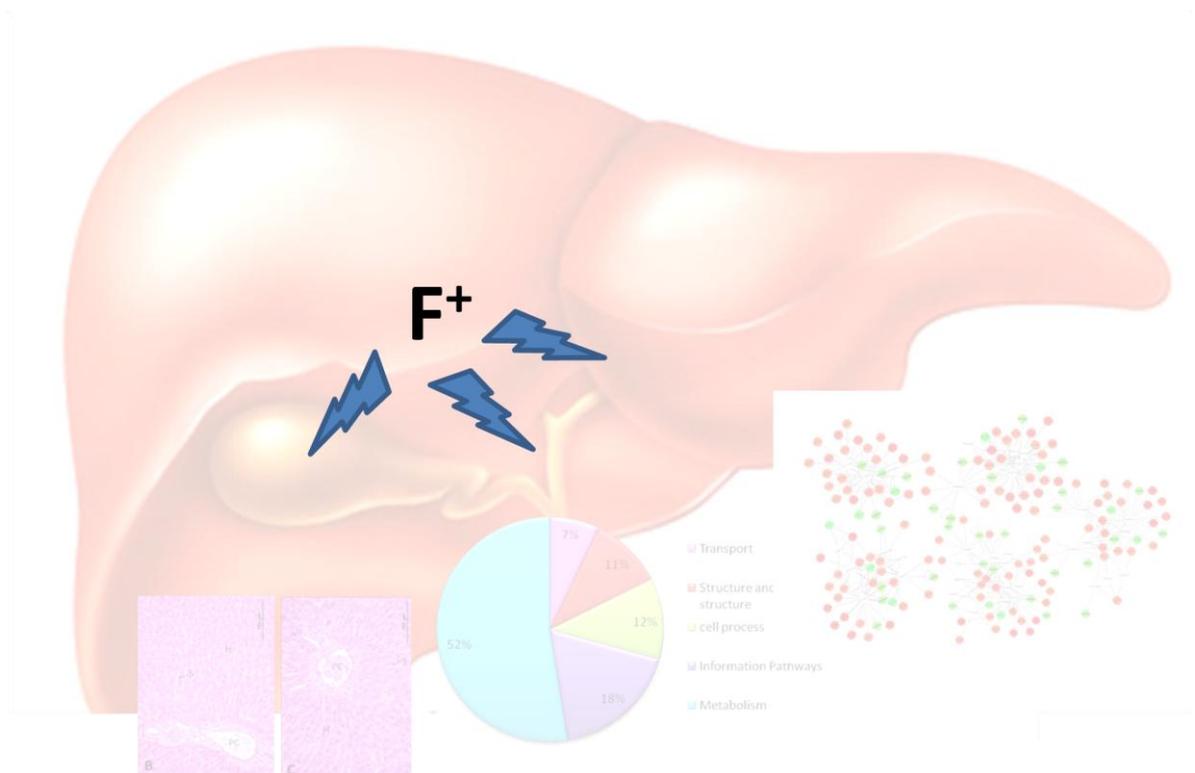




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**“EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E DA DOSE DE FLUORETO
ADMINISTRADA CRONICAMENTE NA EXPRESSÃO PROTEICA EM
FÍGADO DE RATOS.”**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E DA DOSE DE FLUORETO
ADMINISTRADA CRONICAMENTE NA EXPRESSÃO PROTEICA EM
FÍGADO DE RATOS**

São Carlos

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTROS DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E DA DOSE DE FLUORETO
ADMINISTRADA CRONICAMENTE NA EXPRESSÃO PROTEICA EM
FÍGADO DE RATOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, junto ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Bioquímica e Biologia Molecular.

Autora: Heloisa Ap. Barbosa da Silva Pereira

Orientação: Prof^a. Dr^a. Marília A. R. Buzalaf

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P436e Pereira, Heloisa Aparecida Barbosa da Silva
 Efeito do tempo de tratamento e da dose de
fluoreto administrada cronicamente na expressão
proteica em fígado de ratos / Heloisa Aparecida
Barbosa da Silva Pereira. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
 273 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

 1. Fluoreto. 2. Perfil lipídico. 3. Análise
proteômica. 4. Fígado. 5. Western blot. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira, realizada em 18/12/2015:

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
USP

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Sandra Lja do Amaral Cardoso
UNESP

Prof. Dr. Rui de Albuquerque Carvalho
UC

Dedicatória

Ao meu Pai e minha Mãe que me ensinaram valores como a honestidade, a humildade e justiça demonstradas pelas suas ações. Ao seu apoio e incentivo, os quais me fazem sempre prosseguir em frente, por mais difícil que o caminho pareça ser.

Ao meu marido que me mostrou que é possível ser estudante e esposa ao mesmo tempo. Obrigado pelo seu apoio, paciência, dedicação e o seu amor que me fez crescer muito.

Aos meus irmãos, sempre companheiros e amigos, sei que torcem muito por mim, assim como eu torço por eles.

A meu sogro e sogra que me receberam como filha e me apoiaram muito durante mais esta caminhada.

E com muito carinho a minha filha que mudou a minha vida. Deixei de ser Heloisa para ser a mãe da Amanda. Espero que um dia este trabalho e esforço possa ser pra ela motivo de orgulho

DEDICO ESTE TRABALHO

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
recomeço, qualquer um pode começar agora e fazer um novo
fim.”*

Chico Xavier

*“O Saber a gente aprende com os mestres e os livros. A
sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”*

Cora Coralina

Agradecimentos Especiais

À Prof. Dr. Marília Afonso Rabelo Buzalaf muito obrigado pela sua paciência e confiança. A caminhada até aqui foi longa e cheia de desafios. Mas em cada um dos obstáculos foi possível contar com seu apoio. Gostaria de salientar que a minha trajetória profissional foi crescente e quando olho para trás e vejo o que fui e como sou percebo o quanto foi grande o meu crescimento profissional durante todo o tempo que convivemos. Hoje finalizo mais uma etapa em minha vida, o futuro ainda é incerto, mas você será uma inspiração de pessoa e profissional para toda a vida. Hoje realizo um sonho que se tornou um objetivo possível depois de começar a trabalhar com você. Obrigado por tudo.

Agradeço as minhas Alunas Aline Dionízio e Tamara vocês foram minhas parceiras de pesquisa, dividiram comigo esse trabalho e sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido finalizar com tanta competência. Eu tive em vocês o braço direito e o esquerdo. Aprendi muito mais que ensinei. Muito obrigado pela oportunidade de participar da vida acadêmica e ajudar no desenvolvimento profissional de cada uma. Estarei sempre disponível para ajudar em tudo que precisar, vocês são grandes amigas.

A Flávia Iano amiga e companheira de pesquisa e da vida e para todos os momentos. Espero contar sempre com a sua amizade preciosa.

A Flávia Levy amiga para todas as horas e principalmente quando preciso de conselho. Obrigado pela convivência tão divertida que passamos

À Aluna Milene Fernandes e Aline de Lima Leite pela convivência e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado por tudo, vocês fazem parte da minha trajetória acadêmica e fizeram dela a mais agradável possível.

Agradecimentos

À técnica do Laboratório de Bioquímica Larissa pelo seu auxílio no desenvolvimento deste trabalho o qual foi de extrema relevância. E pela convivência e disponibilidade em auxiliar principalmente nas horas que mais precisei. Agradeço também a técnicos da bioquímica Thelma pela presteza e prontidão,

. Aos amigos que convivi todos esses anos no laboratório de Bioquímica Cintia, Luiza, Senda, Thelma, Larissa, Flávia Amadeu, Talita, Juliana, Isabela, Tatiana, Aline Dionizio, Aline, Amanda, Adriana, Cristiane, Beatriz, Cintia, Priscila, Carina, Lívia, Poliana, Thiemi, Camila, Cida, agradeço pela amizade por todos esses anos de convivência no trabalho e nos momentos de prazer.

À todos os colegas que frequentam o laboratório de bioquímica e fazem do dia-dia mais harmonioso e leve.

A secretária Ivanilde das Pos Graduação pela sua presteza e prontidão.

Aos funcionários do Biotério pela disponibilidade e a prontidão em atender as minhas necessidades durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Tânia técnicas da do laboratório de Histologia e pela auxílio e presteza no desenvolvimento do histológico.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e a Prof Dr^a Ana Carolina pelo respeito, generosidade e amizade.

A todos meus sinceros agradecimentos

Agradecimentos Institucionais

Agradeço à **Universidade Federal de São Carlos** na pessoa de seu Reitor Prof. Dr. Targino de Araújo Filho e Vice-Reitor Prof. Dr. Adilson Jesus Aparecido de Oliveira, pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta instituição de referência e excelência em nosso país.

Ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) na pessoa de sua Diretora Prof.^a Dr^a Ana Beatriz de Oliveira.

Ao **Departamento de Genética e Evolução** (DGE) e a todos os docentes, que contribuíram de forma direta ou indireta para concretização desta etapa.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** (FOB-USP), pela estrutura fornecida.

À **FAPESP**, pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo científico, através do processo nº 2011/17263-9.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo foi observado que o fluoreto (F) pode provocar alterações na expressão de várias proteínas hepáticas. Relatos na literatura sugerem que as alterações causadas pelo F no organismo são dose e tempo-dependentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da administração de diferentes concentrações de F, do tempo de exposição a este íon e da exposição concomitante a uma dieta hipercalórica no metabolismo de lipídios e expressão de proteínas hepáticas em ratos. O trabalho foi realizado em 2 etapas. Na primeira, foram utilizados 72 ratos *Wistar* machos com 21 dias, que foram divididos em 2 grupos (n=36) de acordo com o tipo de dieta (AIN-93M ou Presence), então subdividido em 2 grupos (n=18) de acordo com o tempo de tratamento (20 ou 60 dias). Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos (n=6), de acordo com a dose de fluoreto a ser administrada através da água de beber, a saber: 0 mg/L, 15 mg/L ou 50 mg/L. Decorridos os períodos experimentais o fígado e o sangue foram coletados. Foi realizada a análise de F no plasma e tecido hepático. Parte do fígado foi fixado para a confecção das lâminas para análise histológica. No plasma foi realizada a análise de perfil lipídico e no fígado, de triglicerídeos. Foi avaliada a expressão das proteínas hepáticas por *Western Blotting*. Na segunda etapa foi realizada apenas com a ração presence com os mesmos grupos experimentais da primeira etapa. Ao final do período experimental, o fígado e o plasma foram coletados. A concentração de F no plasma e no fígado foram analisada. Foi realizada a extração de proteínas e preparação das proteínas do fígado para espectrometria de massa, sendo então sequenciadas e identificadas. A análise das concentrações de F indicaram um aumento dose-resposta no plasma, independente do período administrado ou tipo de dieta. Já as concentrações de F no fígado foram maiores nos grupos que receberam 50 mg/L de F em relação ao controle. A administração de F alterou o perfil lipídico, com uma redução no TGA no plasma e aumento do HDL. As inclusões lipídicas no fígado foram reduzidas no grupo que recebeu 50 ppm F por 20 dias em conjunto com a dieta hipercalórica. A expressão da GRP78, ERP29, SOD2 e Apo-E foram alteradas pelo F, sob influência do tempo e dieta administrada. Para os grupos que receberam a concentração de 50 ppm F foi observado um aumento na concentração de proteínas relacionadas à a defesa contra o estresse oxidativo e do RE. Para o grupo que recebeu a concentração de

15 ppm F houve alterações estruturais, mitocondriais e relacionadas à proliferação, verificando-se um efeito depende do tempo. Desta forma, podemos concluir que o fígado possui um mecanismo de adaptação à ação do F e que o mesmo parece estar relacionado ao acionamento de proteínas referentes à homeostasia e contra o estresse oxidativo e do RE provocado por este íon.

Palavras-chave: Fluoreto. perfil lipídico . análise proteômica. fígado. *western blot*.

ABSTRACT

In a previous study conducted by our group, it was noticed that fluoride (F) can induce changes in the expression of several liver proteins. Reports in the literature suggest that the changes caused by F in the body are dose- and time-dependent. The objective of this study was to analyze the effect of different F concentrations, exposure time to this ion and concomitant exposure to a high calorie diet in the metabolism of lipids and protein expression in the liver of rats. The study was divided into 2 steps. The first step included 72 21-day-old male Wistar rats that were divided into 2 groups (n=36) according to the diet administered (AIN-93M and Presence). Each group was further divided according to the duration of the treatment (20 or 60 days). In addition, each these was divided into 3 subgroups (n=6), according to the concentration of F administered in the drinking water, as follows: 0 mg/L (control), 15 mg/L or 50 mg/L. After the experimental period, the animals were anesthetized and the liver and blood were collected. F analysis in plasma and liver tissue was done. Part of the liver was fixed for histological analysis. Lipids were analyzed in plasma and triglycerides were analyzed in the liver. Expressions of proteins were evaluated in the liver by Western blotting. In the second step the only Presence diet were use and the groups experimental the same as previously described. At the end of experimental period, liver and plasma were collected. F concentration in plasma and liver were analyzed. Liver proteins were extracted and prepared for mass spectrometry analysis. Proteins were sequenced and identified. The analysis of F concentrations indicated a dose-response increase in plasma, regardless the time of exposure to F and type of diet. F concentrations in the liver were higher in the groups receiving 50 ppm F in respect to control. Administration of F altered the lipid profile, with a reduction in TGA in plasma and increase in HDL when the hypercaloric diet was used. The expression of GRP78, ERP29 and SOD2 and Apo-E was altered by F, under the influence of time and type of diet administered. For the groups receiving 50 mgF/L, it was observed an increase in the concentration of proteins related to the defense against oxidative stress and ER stress. For the group that received the concentration of 15 mgF/L, changes in structural proteins, mitochondrial proteins and proteins related to cell proliferation were observed, depending on the time of administration. The results suggest an adaptive mechanism of liver upon exposure to F, which seems to be related to the activation of

proteins related to maintenance of homeostasis and that fight against oxidative stress and ER stress caused by this ion.

Keywords: Fluoride. Lipid profile. Proteomic analysis. Liver. *Western blot*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1 Características gerais do flúor	39
2.2 Toxidade do fluoreto.....	39
2.2.1 <i>Toxicidade aguda</i>	40
2.2.2 <i>Toxicidade crônica</i>	41
2.3 Fígado e Metabolismo de Lipídio	42
2.3.1 Características gerais do Fígado.....	42
2.3.2 Toxidade no fígado.....	42
2.3.3 <i>Ação do F no fígado</i>	43
2.3.4 <i>Esteatose hepática</i>	44
2.3.5 <i>Fluoreto no metabolismo de lipídio</i>	45
2.3.6. Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e ao metabolismo de lipídio.....	46
2.3.7 Dieta AIN-93M.....	46
3. PROPOSIÇÃO	51
4.MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. ANÁLISE DO PERFIL LIPIDICO, WESTERN BLOTTING E ANALISE HISTOLÓGICA EM ANIMAIS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE F POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS, COM EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERCALORICA OU NORMOCALÓRICA	55
4.1.1 Obtenção e tratamento dos animais, eutanásia e obtenção das amostras	55
4.1.2. Dosagens de fluoreto no plasma e fígado	56
4.1.3. Processamento histotécnico	58
4.1.4. Dosagem de Colesterol no plasma	59
4.1.4.1. Dosagem de Colesterol total	59
4.1.4.2 <i>Dosagem de HDL</i>	59
4.1.4.3 <i>Dosagem de Triglicerídeos</i>	60
4.1.4.4 <i>Identificação indireta de VLDL</i>	60
4.1.4.5 <i>Identificação indireta de LDL</i>	60
4.1.5. Análise de triglicerídeos no fígado	60
4.1.6. Western Blotting: GTP78, Erp29, Apo-E, SOD2 e SREBP	61
4.1.6.1. <i>Homogeneização das amostras de fígado</i>	61
4.1.6.2. <i>Extração de proteínas do fígado e quantificação de proteínas totais</i>	61
4.1.6.3. <i>Western Blotting</i>	64
4.1.7. Análise estatística	65
4.2. ANÁLISE PROTEÔMICA NO FÍGADO DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLUORETO A PARTIR DA ÁGUA DE BEBER, POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS	66
4.2.1 Obtenção e tratamento dos animais, eutanásia e obtenção das amostras	66
4.2.2 Dosagens de fluoreto no plasma e no fígado	67
4.2.3. Análise estatística	67
4.2.4. Análise teômica	67

4.2.4.1	<i>Extração de proteínas do fígado e quantificação</i>	67
4.2.4.2	<i>Preparo das amostras para espectrometria de massa</i>	68
4.2.4.3	<i>Sequenciamento das proteínas nos espectrômetro de massa</i>	69
4.2.4.4	<i>Identificação das proteínas</i>	69
4.2.4.5	<i>Análise dos dados por meio da Bioinformática</i>	70
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO, WESTERN BLOTTING E ANÁLISE HISTOLÓGICA EM ANIMAIS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE F POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS, COM EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERCALÓRICA OU NORMOCALÓRICA	73
5.1.1.	Dosagens de fluoreto plasma e fígado	73
5.1.2	Análise Histológica	76
5.1.3	Dosagem de Colesterol no plasma	84
5.1.3.1	<i>Dosagem de HDL</i>	84
5.1.3.2	<i>Dosagem de Colesterol total</i>	85
5.1.3.3	<i>Dosagem de Triglicerídeos</i>	86
5.1.3.4	<i>Identificação indireta de LDL</i>	87
5.1.3.5	<i>Identificação indireta de VLDL</i>	89
5.1.4.	Análise de triglicerídeos no fígado	90
5.1.5.	Peso dos animais e do fígado	93
5.1.5.1	<i>Peso dos animais</i>	93
5.1.5.2	<i>Peso dos fígados</i>	94
5.1.5.3	<i>Relação peso do animal/peso do fígado</i>	95
5.1.6.	Western Blotting: GTP78, Erp29, Apo-E, SOD2 e SREBP	98
5.2	ANÁLISE PROTEÔMICA NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS E DOSES CRÔNICAS DE FLUORETO	106
5.2.1	Dosagens de fluoreto plasma e fígado	106
5.2.2	Análise proteômica	109
6.	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIA	151
	Anexo 1	157
	Anexo 2	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A – Moinho criogênico; B – Tubo de policarbonato; C – Colocação da amostra no moinho criogênico; D – Colocação do N₂.contrada.....62

Figura 2 - Concentração média de F nas amostras de plasma (mg/L) em ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de ração (normocalórica – Presence ou hipercalórica – AIN-93-M). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$74

Figura 3 - Concentração média de F nas amostras de fígado ($\mu\text{g/g}$ de tecido hepático) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de ração. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p < 0,05$). $n=6$75

Figura 4 - Fotomicrografia de fígado em H&E (40x) com valores de *score* demonstrando o nível de vesículas de inclusões lipídicas (IL). Os *scores* variam entre: 0-indicando ausência de lipídios; 1-presença esparsa de lipídios; 2- presença de poucas inclusões lipídicas; 3- presença mais evidente, com macro e microvesículas lipídicas; 4- presença de macro vesículas lipídicas; 5- grande presença de macro vesículas lipídicas.....77

Figura 5 - Fotomicrografia de fígado de rato tratado com 50 ppm F que recebeu a ração AIN-93M com tetróxido de Osmium, demonstrando a presença de inclusão lipídicas (IL) dentro dos vacúolos. N – núcleo E C - citoplasma.....82

Figura 6- Média dos *scores* relacionando tempo, dose e ração. Letras distintas indicam diferenças significativas (ANOVA a 3 critérios, $p < 0,05$). As barras indicam desvio-padrão. $n=6$83

Figura 7 - Concentração média de HDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de dieta. Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA a 2 critérios, $p > 0,05$). Barras verticais representam desvio padrão, $n=6$...85

Figura 8- Concentração média de colesterol total nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$ 86

Figura 9- Concentração média de triglicérides nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre

os tempos de tratamento e concentrações de F, respectivamente (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$87

Figura 10 - Concentração média de LDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$88

Figura 11- Concentração média de VLDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$90

Figura 12- Concentração média de triglicerídeos nas amostras de fígado (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento e concentrações de F, respectivamente (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$91

Figura 13 – Peso corporal médio (g) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$94

Figura 14 – Peso médio (g) do fígado dos de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$95

Figura 15 – Razão média entre peso corporal e peso do fígado de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$. Barras indicam DP.....96

Figura 16 – Expressão das proteínas GRP78, APO-E, SOD2 e ERP29 e da constitutiva β -tubulina em amostras individuais dos animais de cada grupo ($n=6$) e análise de densitometria. A) Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo AIN-93M tratados por 20 dias; B) Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo Presence tratados por 20 dias; C) Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo AIN-93M tratados por 60 dias. D) Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo Presence tratados por 60 dias. A Densitometria foi analisada utilizando o software Image Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixel individuais ($n=6$). Barras verticais representam desvio padrão. $n=6$ 100

Figura 17- Expressão da SREBP em amostra individuais e da constitutiva α -tubulina ou β -tubulina dos animais de cada grupo ($n=6$) e a análise de densitometria. A) Expressão da SREBP em fígado de ratos no grupo AIN 93M tratados por 20 dias e por 60 dias B) Expressão da SREBP em fígado de ratos no grupo AIN 93M tratados por 20 dias e 60 dias. A Densitometria foi analisada utilizando o software Image

Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixel individuais (n=6). Barras verticais representam desvio padrão. n=6.....101

Figura 18: Esquema indicando um mecanismo para alteração no metabolismo de lipídio provocado pelo fluoreto e influenciado pelo tipo de dieta. A- O Fluoreto (F^{-1}) provoca o aumento do estresse oxidativo gerando o aumento da GRP78 que por sua vez inibe a SREBP que deixa de ativar a via de formação do triglicérides (TG). B- O F^{-1} em conjunto com uma dieta hipercalórica aumenta o estresse oxidativo e leva ao aumento da GRP78 porém não altera a SREBP, no entanto o F^{-1} reduz a Apo-E e conseqüentemente o transporte de precursores para formação do colesterol e TG.....105

Figura 19 - Concentração média de fluoreto nas amostras de plasma ($\mu\text{g/mL}$) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). n=6.....107

Figura 20 - Concentração média de Fluoreto nas amostras de fígado ($\mu\text{g/g}$ de tecido hepático) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). n=6.....108

Figura 21 - Gráfico de Venn mostrando os números de proteínas expressas em cada grupo.....111

Figura 22. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle de 20 dias e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....112

Figura 23 - Análise funcional da comparação entre os animais do grupo controle e tratado com 15 ppm F por 20 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....113

Figura 24 - Análise funcional da comparação entre os animais do grupo controle e tratado com 50 ppm F por 20 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....114

Figura 25 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 15 ppm F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida

pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....115

Figura 26 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 50 ppm F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....116

Figura 27 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 15 ppm F por 20 e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....117

Figura 28- Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 50 ppm F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....118

Figura 29 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 15 e 50 ppm F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....119

Figura 30 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 50 ppm F por 20 e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.....120

Figura 31 - Subnetwork criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo controle 20 dias em relação ao grupo controle 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína, nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo de 60 dias em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P61980 - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; P19357- Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4; Q5U1Z7- Centromere protein R; P62916- Transcription initiation factor IIB; Q9JIX3- Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase; Q6P9T8- Tubulin beta-4B chain; Q4QQS4-RuvB-like 2 (E.

coli). Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: P04636 - Malate dehydrogenase, mitochondrial; P07756 - Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial; P0C0S7- Histone H2A.Z; P10719- ATP synthase subunit beta, mitochondrial; P10860- Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial; P11884- Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial; P12928- Pyruvate kinase PKLR; P13437-3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial; P15999- ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;; P60711- Actin, cytoplasmic 1; P62630- Elongation factor 1-alpha 1; P62632- Elongation factor 1-alpha 2; P62738- Actin, aortic smooth muscle;; P62982- Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; P63018- Heat shock cognate 71 kDa protein; P63039-60 kDa heat shock protein, mitochondrial; P63259- Actin, cytoplasmic 2; P68136- Actin, alpha skeletal muscle; Q02253- Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial; Q02253- Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial; Q10758- Keratin, type II cytoskeletal 8; Q4FZT6- RuvB-like 2 (E. coli); Q63429- Polyubiquitin-C; Q64598- Histone H2A type 1-F; Q68FU3- Electron transfer flavoprotein subunit beta;.....123

Figura 32. Subnetworks criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de controle em relação ao tratado com 15 ppm F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína, nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado 15 ppm F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P19357- Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4; P06761- 78 kDa glucose-regulated protein; P21708- Mitogen-activated protein kinase 3; P62332- ADP-ribosylation factor 6; P63102-14-3-3 protein zeta/delta; Q5M7T6- ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1; Q80ZG1- Synembryn-A. Os números de acesso nos nodos verdes correspondem a: Q8VHF5- Citrate synthase, mitochondrial. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: O54747- DNA polymerase delta catalytic subunit; P08461: Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial; P18886- Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial; P27605- Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; P50878-60S ribosomal protein L4; P52555- Endoplasmic reticulum resident protein 29; P55094- Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2; P56571- ES1 protein homolog, mitochondrial; P62907 -60S ribosomal protein L10a; Q66X93- Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1; Q68FR9- Elongation factor 1-delta; Q6Q7Y5- Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13; Q7M0E3- Destrin; Q91ZT1- Vascular endothelial growth factor receptor 3; Q9JJH5-6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2.....126

Figura 33. Subnetwork criada pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial nos grupos controle e tratado com 50 ppm F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo tratado com 50 ppm F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram

identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem à: *O55173- 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*; *P16599- Tumor necrosis factor*; *P17077- 60S ribosomal protein L9*; *P45592- Cofilin-1*; *P63102-14-3-3 protein zeta/delta*; *P62994-Growth factor receptor-bound protein 2*; *P97577- Fasciculation and elongation protein zeta-1*; *Q3B7U0- Ripk2 protein*; *Q3MQ06- Autophagy protein 5*; *Q63369- Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit* ; *Q8K3Z8- Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain-like protein*. Os números de acesso nos nodos verde correspondem à: *P62909-40S ribosomal protein S3*; *P63259-Actin, cytoplasmic 2*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: *P04785-Protein disulfide-isomerase*; *P05065-Fructose-bisphosphate aldolase A*; *P15146-Microtubule-associated protein 2*; *P31977- Ezrin*; *P52944- PDZ and LIM domain protein 1*; *Q3KR86- MICOS complex subunit Mic60*; *Q4FZT0- Stomatin-like protein 2, mitochondrial*; *Q5XI78-2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial*; *Q63610- Tropomyosin alpha-3 chain*; *Q6AXW2- Protein Tmod3*; *Q6AZ25- Tropomyosin 1, alpha*; *Q6IFU9- Protein Krt16*; *Q6IG12- Keratin, type II cytoskeletal 7*; *Q9ER34- Aconitate hydratase, mitochondrial*..... 129

Figura 34 - Subnetwork criada pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos controle e tratado com 15 ppm F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: *P29066-Beta-arrestin-1*; *P35213-14-3-3 protein beta/alpha*; *P35435-ATP synthase subunit gamma, mitochondrial*; *Q00960-Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B*; *Q6VEU8-DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24*; *Q5XIH7-Prohibitin-2*. Os números de acesso nos nodos verde correspondem à: *P15999-ATP synthase subunit alpha, mitochondrial*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: *O08769-Cyclin dependent kinase inhibitor*; *O35263-Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma*; *P05712-Ras-related protein Rab-2A*; *P11275-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha*; *P62161-Calmodulin*; *Q64119-Myosin light polypeptide 6*; *Q6NYB7-Ras-related protein Rab-1A*; *Q9ERE6-Myosin phosphatase Rho-interacting protein*; *Q5RJK4-NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2*; *Q9ER24-Ataxin-10*..... 132

Figura 35 - Subnetwork criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos controle e tratado com 50 ppm F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: *P22934-Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*; *Q3KRD8-Eukaryotic translation initiation factor 6*; *Q3MHS8-Sin3-associated polypeptide 18*; *Q6P7R8-Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase*; *Q6P9T9-Protein Tmbim4*. Os números de acesso nos nodo verdes correspondem a: *P07756-*

Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial; números de acesso nos nodo vermelho correspondem a: P24368-Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B; P47727- Carbonyl reductase [NADPH];P70580-Membrane-associated progesterone receptor component 1;Q4G074-KIF1-binding protein; Q4V7C7-Actin-related protein 3;Q5RJR8-Leucine-rich repeat-containing protein 59; Q641Y0-Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit; Q71TY3-40S ribosomal protein S27.....134

Figura 36 - Subnetworks criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 ou 15 ppm F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no rupo tratado com 50 ppm F em relação ao tratado com 15 ppm F. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P29066-Beta-arrestin-1; P29067-Beta-arrestin-2; P62994-Growth factor receptor-bound protein 2; Q6AYH1-Poly (A) polymerase beta (Testis specific). Os números de acesso nos nodos verdes correspondem: P60711-Actin, cytoplasmic 1; P63259-Actin, cytoplasmic 2; P63269-Actin, gamma-enteric smooth muscle; P68035-Actin, alpha cardiac muscle 1; P68136-Actin, alpha skeletal muscle; Q6AXW2-Protein Tmod3; Q6IG12-Keratin, type II cytoskeletal 7. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a P50878-60S ribosomal protein L4; P62907-60S ribosomal protein L10a; Q4KLK9-RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72.....136

Figura 37 - Subnetworks criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 e 15 ppm F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com 50 ppm F em comparação ao tratado com 15 ppm F. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a. P29066-Beta-arrestin-1; P68255-14-3-3 protein theta; Q63429-Polyubiquitin-C; Q9Z2P5-Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; P37377-Alpha-synuclein os números de acesso nos nodos verdes correspondem a: O88767-Protein deglycase DJ-1; P37285-Metabotropic glutamate receptor 7; P62271-40S ribosomal protein S18; P62282-40S ribosomal protein S11. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: O08769-Cyclin dependent kinase inhibitor; P10499-Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1; P11275-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha; P62161-Calmodulin; P83868-Prostaglandin E synthase 3; Q5RJQ4-NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2; Q64119-Myosin light polypeptide 6; Q68FQ0-T-complex protein 1 subunit epsilon; Q6NYB7-Ras-related protein Rab-1A; Q9ER24-Ataxin-10.....139

Figura 38- Subnetworks criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 ppm F por 60 e 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da

respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho indica subregulação no grupo de 60 dias em relação ao de 20. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P00507-Aspartate aminotransferase, mitochondrial; P05065-Fructose-bisphosphate aldolase A; P19357-Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4; P21708-Mitogen-activated protein kinase 3; P63102-14-3-3 protein zeta/delta; Q80Z30-Protein phosphatase 1E; Q9BQB4-Sclerostin; Q5S255-Tyrosine-protein kinase. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: B1WBQ8-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; O35244-Peroxiredoxin-6; P04762-Catalase; P07756- Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial; P0C0S7-Histone H2A.Z; P0C169-Histone H2A type 1-C; P10719-ATP synthase subunit beta, mitochondrial; P10860-Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial; P12346-Serotransferrin; P13437-3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial; P14659-Heat shock-related 70 kDa protein 2; P15999-ATP synthase subunit alpha, mitochondrial; P48721-Stress-70 protein, mitochondrial; P52873-Pyruvate carboxylase, mitochondrial; P62738-Actin, aortic smooth muscle; P62982-Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; P63018-Heat shock cognate 71 kDa protein; P63259-Actin, cytoplasmic 2; P68035-Actin, alpha cardiac muscle 1.....142

Figura 39 - Subnetworks criadas pelos JActiveModules para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo 50 ppm 60 dias em relação ao grupo 50 ppm 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem à: O55173-3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; P63170-Dynein light chain 1, cytoplasmic; Q5S255-Tyrosine-protein kinase; Q9BQB4-Sclerostin; Q9Z2P5-Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3;. Os números de acesso nos nodos verde: P04636-Malate dehydrogenase, mitochondrial; P05065-Fructose-bisphosphate aldolase A; P0C169-Histone H2A type 1-C; P10719-ATP synthase subunit beta, mitochondrial; P10860-Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial; P31977-Ezrin; Q63429-Polyubiquitin-C correspondem à Os números de acesso nos nodos vermelho correspondem à: P62161-Calmodulin; Q64119-Myosin light polypeptide 6; Q68FQ0-T-complex protein 1 subunit epsilon; Q9ERE6-Myosin phosphatase Rho-interacting protein.....145.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Volumes (em μL) de cada amostra de fígado de ratos equivalentes a 40 μg de proteínas totais.....	63
Tabela 2. Valores do índice kappa segundo as análises intra e inter observadores	78
Tabela 3. Score do nível de esteatose (1 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento (controle, 15 ppm e 50 ppm F) por 20 dias, realizado por 3 observadores.	78
Tabela 4. Score do nível de esteatose (1 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento (controle, 15 ppm e 50 ppm F) por 60 dias, realizado por 3 observadores.	79
Tabela 5. Score (3 observadores) do nível de esteatose (0 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento com água contendo 0 (controle), 15 ou 50 ppm F por 20 dias e ração Presence.	80
Tabela 6. Score (3 observadores) do nível de esteatose (0 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento com água contendo 0 (controle), 15 ou 50 ppm F por 60 dias e ração Presence.	81
Tabela 7. Número de proteínas com alteração de expressão em cada comparação	109
Tabela 8. Número de proteínas exclusivas encontradas em cada grupo.	110

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μg - Micrograma
 μL - Microlitro
 μm - Micrômetro
 μM - Micromolar
AAS – Espectrometria de absorção atômica
ACN - Acetonitrila
AmBic - Bicarbonato de amônio
ALT- Alanina aminotransferase
AMBIC- Bicarbonato de amônio
APO-E- Apolipoproteína E
AST- Aspartato aminotransferase
ATP - Adenosina trifosfato
BSA – Albumina do Soro Bovino
Cox- Citocromo oxidase
CT- Colesterol Total
CHAPS - 3-3[(3 colamidopropil) dimetilamônio]-propanosulfonato
DNA - Ácido desoxiribonucleico
DTT - Ditioneitol
ERP29 – proteína do retículo endoplasmático 29
F - Fluoreto
GLUT4 – proteína transportador a de glicose tipo 4
GO - Ontologia do Gene
GOT- aminotransferase de aspartato
GPT - aminotransferase de alanine
GRP78- Proteína regulada pela glicose-78
HDL- Lipoproteínas de alta densidade
HF – Ácido fluorídrico
HMDS – Ácido Sulfúrico Saturado
Hb - Hemoglobina
HE - Hematoxilina e Eosina
IAA - Iodoacetamida
ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
ID - Identificador
LDH- Lactato desidrogenase
LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LDL - lipoproteínas de baixa densidade

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

MgCl₂- Cloreto de Magnésio
MS - Espectrometria de massas
mV – Milivoltagem
N₂- Nitrogênio Líquido
NaF- Fluoreto de Sódio
NAFLD- Doença gordurosa hepática não-alcoólica
NaOH- Hidróxido de Sódio
NASH- Esteato Hepatite não alcoólica
ng - Nanogramas
nm – Nanômetro
PLGS- ProteinLynx Global Server
ppm – Parte por milhão
RE – Retículo Endoplasmático
RNA - Ácido ribonucléico
RP - fase reversa
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SOD2 - superoxide dismutase 2, mitochondrial
SREBP - proteína 1C ligadora do elemento regulatório de estero
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEMED - Tetrametiletilenodiamina
TG - Triglicérides
TMAH – Hidróxido de tetrametilamônio
TOF - Tempo de voo
UniProt - *Universal Protein Resource*
VDL - Lipoproteínas de baixa densidade

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O fluoreto (F) é um elemento encontrado na constituição do solo e encontrado adicionado também na água, possuindo uma ação terapêutica bem disseminada contra a cárie dentária (McDonagh, Whiting *et al.*, 2000; Wong, Clarkson *et al.*, 2011). Devido a esta ação benéfica, a suplementação com F na água de beber de muitos municípios se tornou rotineira. Contudo, por ser tratar de um elemento encontrado normalmente em nosso meio, o mesmo também pode estar presente de forma natural na água de beber e, neste caso, às vezes acima do limite recomendável (>1 mgF/L em humanos). Desta forma, apesar da ação favorável quando este elemento se encontra em concentrações mais altas, o mesmo pode provocar efeitos indesejáveis. Dentre os efeitos, o mais conhecido é a fluorose, que pode ser dentária ou esquelética, e ocorre devido à ingestão excessiva de F de forma crônica (Whitford, 1996). Diante destes fatos, iniciaram-se pesquisas para entender a ação do F, com o intuito de determinar melhor seus efeitos sobre o organismo, bem como a uma dose segura para gerar um efeito benéfico sem levar a efeitos colaterais importantes.

Assim, experimentos com animais utilizando água de beber suplementada com várias doses de F foram realizados, bem como administrações por tempo curto ou mais prolongado, para mimetizar uma intoxicação crônica (Dunipace, Brizendine *et al.*, 1995; Buzalaf, Caroselli *et al.*, 2004; Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004; Xu, Hu *et al.*, 2005; Dabrowska, Letko *et al.*, 2006; Xiong, Liu *et al.*, 2007; Kobayashi, Leite *et al.*, 2009; Kobayashi, Leite Ade *et al.*, 2011). De acordo com Barbier, Arreola-Mendoza e Razo (2010) o F pode interferir em vários processos moleculares, como estresse oxidativo, modulação intracelular da homeostasia, peroxidação lipídica, apoptose, metabolismo enzimático, ciclo celular, comunicação entre células e transdução de sinal. Afetando tecidos moles como fígado e rim em ratos tratados por com 25 mgF/L F durante 8 e 16 semanas, bem como um aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004). Xiong, et al. (2007) encontraram uma relação dose-efeito em relação aos níveis de F presentes na água e danos na função hepática e renal de crianças. Os autores observaram um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH), dosada a partir do soro de crianças que ingeriam água

contendo mais que 2 mgF/L. Com base nesses achados, os autores sugeriram que a ingestão de F a partir de água de abastecimento contendo concentrações maiores que 2 mg/L poderia resultar em danos hepáticos. O metabolismo de ratos em relação ao fluoreto é cerca de 5 vezes mais acelerado que o de humanos (DUNIPACE et al., 1995). A dose de 15 mg/L de F para ratos equivaleria a cerca de 3 mg/L para humanos, desta forma essa dosagem já seria capaz de provocar alterações hepáticas. Também foram avaliados, por meio da análise proteômica, os órgãos/células/fluidos/tecidos como os rins (Xu, Hu et al., 2005; Kobayashi, Leite et al., 2009; Carvalho, Leite Ade et al., 2013), urina (Kobayashi, Leite Ade et al., 2011), osteoblastos (Xu, Jing et al., 2008), osso (Kobayashi, Leite et al., 2014) cérebro (Ge, Niu et al., 2011), fígado (Lobo, Leite et al., 2015), músculo (Lima Leite, Gualiume Vaz Madureira Lobo et al., 2014) e matriz do esmalte (Charone et al., in press). Recentemente, nosso grupo de pesquisa finalizou um trabalho no qual foi analisado o fígado tendo sido observado que o F provocou alterações na expressão de várias proteínas (Pereira, Leite Ade et al., 2013). Neste trabalho, foram utilizados 3 grupos de ratos *Wistar* machos tratados com água de beber contendo 0 (controle), 5 e 50 mg/L de F, por 60 dias (n=6/grupo). A análise morfométrica histológica não revelou alterações nas estruturas celulares e o exame morfológico indicou inclusões lipídicas nos grupos tratados com 5 e 50 mgF/L, mais intensas no último. A exposição ao F alterou a expressão hepática de proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais, com predominância daquelas relacionadas ao metabolismo, sendo que as alterações mais pronunciadas foram observadas no grupo tratado com 50 mgF/L.

Apesar de terem sido encontradas várias alterações, o modelo experimental não permitiu análise de alterações temporais no perfil de expressão proteica, e na dose de 5 mgF/L, poucas alterações foram encontradas. A literatura tem revelado achado interessantes em relação à concentração-tempo-dependência das alterações provocadas pela ingestão de doses crônicas de F, utilizando variáveis de resposta menos robustas. Em um destes achados, foram observadas alterações como a presença de infiltração e inflamação e uma necrose local nos fígados de ratos tratados com 25 mgF/L por 8 semanas (Shanthakumari, Srinivasalu et al., 2004), sendo que tais alterações não foram encontradas nem na concentração mais baixa (5 mgF/L), nem na concentração mais alta (50 mgF/L), ambas administradas por período de tempo semelhante. Estes achados poderiam ser explicados pela

diferença na idade dos animais e doses fornecidas. Dabrowska et al. (2006), ao estudarem as mudanças histológicas nos fígados dos ratos tratados com 10,6 mgF/L desde a vida intrauterina, relataram que ratos com idade entre 60 e 90 dias quando os fígados foram coletados para análise apresentavam uma estrutura deste órgão normal. Já quando os fígados foram coletados quando os animais tinham 30 dias de vida, foram encontrados vacúolos degenerados e necrose, assim como nos animais de 120 dias, nos quais se verificou uma degeneração vacuolar persistente, principalmente nos hepatócitos da periferia. De acordo com os autores, para o período de 60 e 90 dias houve uma diminuição das mudanças morfológicas no fígado dos ratos que receberam continuamente NaF, possivelmente resultado de um mecanismo de adaptação do organismo ao F. Também tem sido relatado que concentrações mais altas de F são necessárias para reduzir o número de células senescentes viáveis quando comparadas a células mais jovens, indicando que, com o envelhecimento, as células se tornam resistentes à citotoxicidade induzida pelo F (Sato, Kishino *et al.*, 2005). Assim, um estudo avaliando alterações hepáticas em animais expostos ao F desde o desmame por 20 ou 60 dias, apresentando, na eutanásia, 40 ou 80 dias de vida, respectivamente, seria de grande valia para um melhor entendimento da evolução das alterações proteicas hepáticas ao longo do tempo. Em adição, a variável concentração de F também merece ser melhor investigada, uma vez que em nosso estudo prévio (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013) avaliamos apenas as doses de 5 e 50 mgF/L. Em outro trabalho de pesquisa recentemente finalizado em nosso laboratório, no qual avaliamos o efeito da ingestão crônica de F sobre o sistema antioxidante de ratos, a administração deste elemento também foi feita através da água de beber por 60 dias, sendo os animais eutanasiados com 80 dias de vida. Foram avaliadas 3 concentrações de F (5, 15 e 50 mg/L na água), em adição ao grupo controle. Foi observado que as alterações no sistema antioxidante são mais pronunciadas no grupo de 15 mg/L, quando comparado aos de 5 e 50 mg/L (Iano, Ferreira *et al.*, 2014). Temos atribuído este efeito ao tempo de administração do F, ou seja, na dose maior (50 mg/L), como os efeitos de intoxicação seriam mais pronunciados logo no início da administração da dose elevada, os sistemas biológicos do animal reagiriam com mais vigorosidade, tornando as alterações menos pronunciadas a longo prazo. Por outro lado, na dose intermediária (15 mgF/L), uma vez que os danos inicialmente causados seriam menores, o organismo se protegeria menos, o que permite que os efeitos da

toxicidade sejam observados aos 80 dias de vida. Assim, um mapeamento da concentração-tempo-dependência na intoxicação crônica pelo F poderia permitir avaliar alterações em várias proteínas diferencialmente expressas de uma única vez.

Após o início das atividades do presente trabalho e coletas das amostras para as análises, a análise histológica revelou a presença de inclusões lipídicas no fígado em todos os grupos. Este fato foi relacionado à administração da ração AIN-93M. Um trabalho recente revelou que esta ração possui um alto valor calórico, devido ao alto teor de carboidratos presente em sua formulação (Moura, Figueredo *et al.*, 2012). De acordo com estes autores, a utilização da ração AIN-93M deve ser vista com cautela quando utilizada como uma alimentação controle, uma vez que ela provoca inclusões lipídicas nos fígados e, com isso, alterações metabólicas. Diante deste fato, um novo delineamento experimental foi incluído, uma vez que foi observada uma redução importante destas inclusões nos grupos tratados. Os dados do presente estudo sugerem que, quando esta ração é empregada, o F pode ter uma ação protetora em relação à ocorrência de inclusões lipídicas no fígado, quando este íon é administrado por um período curto de tempo e em concentração mais alta. Com o intuito de verificar a ação do F isoladamente, sem outro interferente como uma ração hipercalórica, o experimento foi repetido utilizando uma ração empregada rotineiramente no nosso Biotério. Esta ração (Presence Nutrição Animal, Paulínia, São Paulo) apresenta um equilibrado valor calórico e nutritivo. Análises feitas no nosso laboratório revelaram um baixo teor de F ($< 1 \text{ mgF/L}$) sendo, portanto, apropriada para o nosso modelo experimental. Com o novo experimento utilizando esta ração foi possível verificar a ação do F sem a interferência da dieta. Contudo, como se observou que poderia haver uma ação do F no metabolismo de lipídios, bem como no perfil das inclusões lipídicas, também foi inclusa neste trabalho a análise da ação do F quando os animais recebem dois tipos de dieta (normocalórica e hipercalórica), com o intuito de verificar a ação do F no metabolismo de lipídios bem como no processo de inclusões lipídicas no fígado em dois tempos experimentais.

Em síntese, neste trabalho buscou-se a identificação de proteínas-alvo que teriam seu perfil de expressão alterado no tecido hepático após exposição crônica ao F por dois períodos de tratamento, o que pode contribuir para o avanço do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de

intoxicações crônicas por este elemento, bem como entender melhor como se dá o processo de adaptação do organismo diante desta exposição ao F. Em adição, também foram avaliadas as alterações que o F provoca no metabolismo de lipídios quando são empregadas dietas normocalórica ou hipercalórica por dois períodos experimentais.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais do flúor

O flúor faz parte da constituição do solo, presente na água potável e está associado a erupções vulcânicas. É um dos elementos mais abundantes disponíveis na crosta terrestre. Em temperatura ambiente, encontra-se em estado gasoso, possui uma cor amarelo-pálido, é do grupo dos halogênios, tem número atômico 9 e peso atômico 19. Trata-se de um elemento que não é encontrado naturalmente na sua forma livre, ou seja, sempre está associado a outro elemento, constituindo os Fs. Isso ocorre devido às suas características químicas, que lhe conferem uma grande eletronegatividade, gerando uma considerável força de repulsão entre os dois átomos, fazendo com que cada um deles se ligue mais facilmente a outro elemento químico qualquer. (Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010); Buzalaf, 2008). Por esta razão, referir-se-á neste trabalho não ao elemento flúor, mas sim ao seu íon (F).

Por estar presente naturalmente no ambiente, o mesmo existe em concentrações variadas em águas subterrâneas, em níveis que variam de 1 a mais de 25 mg/L (OMS, 1999). Esta fluoretação não afeta a aparência, sabor e odor da água. Além de algumas regiões do Brasil, em outras áreas do mundo também se podem encontrar altas concentrações de F, como no caso da Índia (Hussain, Hussain *et al.*, 2010). É importante salientar que a água potável é um dos maiores contribuintes para a ingestão diária de F.

2.2. Toxicidade do fluoreto

O F, apesar de seus importantes efeitos benéficos tanto em nível industrial quanto em Saúde Pública, quando ingerido em doses elevadas, à semelhança do que acontece com qualquer outro elemento, pode levar a efeitos colaterais (Buzalaf, 2008; Peixoto, 1998).

A partir de uma administração sistêmica do F, o mesmo é facilmente absorvido pela mucosa gástrica, onde a absorção é tanto maior quanto menor for o pH, já que as células possuem alta permeabilidade ao HF. O F que não for absorvido no estômago, será 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 subir, atingindo um pico em 30 a 45 minutos. Do F

circulante, uma grande parte será incorporada aos tecidos mineralizados, mas uma pequena parte será distribuída aos tecidos moles. Neste caso, o gradiente de pH entre os meios intra e extracelular irá governar 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 incorporado ao organismo será excretado pela via urinária, fenômeno este também dependente do pH da urina (Whitford, 1996; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010); Buzalaf, 2008). Com base nesta breve descrição do metabolismo do F, pode-se inferir que este elemento pode atingir todos os tipos de células, e, dependendo da sua concentração, da duração da ingestão, da solubilidade dos compostos que o contêm e também de fatores individuais, pode perturbar a homeostasia do organismo.

Uma vez que o F é ubiquamente disponível na natureza e em alimentos, além de ser adicionado a produtos odontológicos, esta grande disponibilidade pode permitir que ocorra uma ingestão excessiva deste elemento, podendo levar à ingestão de doses tóxicas (Pereira, Dombrowski *et al.*, 2009).

Muitas pesquisas com modelos animais *in vivo*, estudos laboratoriais *in vitro* e até mesmo trabalhos feitos em humanos vêm demonstrando que o F tem um efeito tóxico, o qual está relacionado à quantidade e ao tempo de exposição, que pode ser classificada como aguda ou crônica (Whitford, 1992; Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004; He e Chen, 2006).

2.2.1 Toxicidade aguda

A toxidade aguda ocorre pela ingestão de grande quantidade de F numa única vez. Os sinais e sintomas referentes a este tipo de intoxicação são: vômito com presença de sangue, diarreia, broncoespasmo, fibrilação ventricular, pupilas dilatadas, hemoptise, câibras, colapso cardíaco, hipercalemia, hipocalcemia e comprometimento da função renal (Whitford, 1992); Buzalaf, 2008; (Pereira, Dombrowski *et al.*, 2009).

Leite (2010) administrou doses únicas de 50 e 100 mgF/Kg de peso corporal para ratos de 75 dias. Após duas horas, foi feita eutanásia e os rins foram coletados para análise proteômica. Foram encontradas 192, 182 e 245 *spot* proteicos diferencialmente expressas quando foram comparados os grupos controle vs. 50 mgF/Kg, controle vs, 100 mgF/kg e 50 vs 100 mgF/Kg, respectivamente. A maioria

das proteínas identificadas estavam relacionadas às categorias metabolismo e energia, transporte, processos celulares, estrutura e organização celular e vias de informação. (Adachi, Dote *et al.*, 2007) também perceberam injúrias no rim de ratos provocadas por uma intoxicação aguda de F de cádmio em ratos, além de uma severa injúria no fígado, a qual foi atribuída a uma acidose metabólica.

2.2.2 Toxicidade crônica

A toxidade crônica do F foi observada antes mesmo do conhecimento da utilidade deste íon para a prevenção da cárie dentária, quando se observou uma alteração do esmalte provocada por consumo de pequenas quantidades deste íon durante o desenvolvimento dos dentes, a fluorose dentária (Whitford, 1996; Revisto por, Buzalaf, 2008). Acredita-se que a fluorose dentária aconteça quando há ingestão média diária de Fs acima de 0,07 mg/Kg de peso corporal durante o período de formação dos dentes (Ophaug *et al.*, 1980). Uma ingestão crônica de doses maiores pode levar à fluorose esquelética, comum em regiões endêmicas nas quais a concentração natural de F na água de beber é superior a 5 mg/L (Buzalaf, 2008). Além dos tecidos mineralizados, outros tecidos também podem ser atingidos.

Uma vez que o rim é a principal rota de eliminação do excesso de F ingerido, é alvo comum de intoxicações por este íon. As análises histológicas em rins têm revelado degeneração celular, alterações na morfologia e alinhamento dos túbulos renais, presença de vacúolos no tecido conjuntivo, infiltração de células inflamatórias e congestão vascular (Karaoz, Oncu *et al.*, 2004); Shanthakumari; Seshachalam; 2004; Kobayashi, Leite *et al.*, 2009). Análises proteômicas têm revelado alteração no perfil de várias proteínas e enzimas nos rins de ratos submetidos a doses crônicas de 5, 50 e 100 mgF/L F a partir da água de beber (Xu, Hu *et al.*, 2005; Kobayashi, Leite *et al.*, 2009). Pesquisas indicam que concentrações de F na água de beber por volta de 2 mg/L podem causar danos nas funções renais e hepáticas de crianças (Xiong *et al.* 2007).

Estudos vêm também demonstrando que, em concentrações milimolares, o F pode interferir em muitas funções celulares, provocando efeitos citotóxicos em células dos ductos coletores renais e também inibindo severamente enzimas como as fosfatases, tanto *in vitro quanto in vivo* (Cittanova, Lelongt *et al.*, 1996; Zager e

Iwata, 1997; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010). Isso porque muitas fosfatases são extremamente sensíveis ao F, como a pirofosfatase inorgânica, a fosfatase ácida de células ósseas e a fosfatase ácida tartarato-resistente osteoclástica (Baykov e Shestakov, 1992; Janckila, Woodford *et al.*, 1992; Pinkse, Merckx *et al.*, 1999). Já em concentrações micromolares o F tem um efeito anabólico, promovendo a proliferação celular, bem como a inibição de algumas enzimas em menor escala (Mendoza-Schulz, Solano-Agama *et al.*, 2009; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010). Em adição, o F pode interferir em uma grande gama de processos celulares, na expressão gênica, ciclo celular, tanto na proliferação quanto na migração celular, no metabolismo, no transporte iônico, nos processos de secreção, endocitose, apoptose, estresse oxidativo e vias de sinalização (Strunecka, Patocka *et al.*, 2007; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010).

Diante de todos esses relatos, fica evidenciado que o F tem uma ação bem variada e também através de sua distribuição sistêmica pode atingir todos os tecidos. Sendo o fígado um órgão metabólico de extrema importância, muitos trabalhos vêm analisando a atuação do F neste órgão (Dabrowska, Letko *et al.*, 2006; Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013; Iano, Ferreira *et al.*, 2014).

2.3 Fígado e metabolismo de lipídios

2.3.1 Características gerais do Fígado

O fígado possui como unidade funcional o lóbulo hepático, tem alta taxa metabólica, compartilha substratos e energia e recebe todos os nutrientes absorvidos no trato digestivo, processando-os, armazenando-os e sintetizando várias substâncias que são transportadas para outras regiões do corpo, além de neutralizar e eliminar substâncias tóxicas. Também é responsável pela produção de proteínas plasmáticas e carreadoras (Junqueira; Carneiro, 2004; (Merrick, 2006).

2.3.2 Toxicidade no fígado

O fígado é o primeiro sítio de metabolização de xenobióticos e também é o maior órgão de biotransformação e eliminação de substâncias estranhas do nosso corpo. Essa função lhe confere uma suscetibilidade maior a problemas com contaminantes, produtos naturais, agentes virais ou bactérias. Uma exposição

crônica a xenobióticos, portanto, pode levar a vários prejuízos ou distúrbios no fígado (Merrick, 2006).

Pelo fato de receber todas as substâncias absorvidas no trato gastrointestinal, o fígado acaba sendo um órgão de fácil acesso para qualquer composto, inclusive o F, o qual pode provocar alterações em suas funções. Essas alterações podem ser o resultado do próprio metabolismo do tecido hepático, na tentativa de eliminar este ou outros compostos. Isto pode levar a uma disfunção celular gerando estresse oxidativo, e, dependendo de fatores genéticos, poderá originar um estresse celular de maior ou menor extensão (Stirnemann, Kessebohmer *et al.*, 2010).

2.3.3 Ação do F no fígado

Trabalhos indicam um aumento no estresse oxidativo no fígado em humanos e animais quando administradas doses crônicas de F (Chlubek D, 2003; Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004; Strunecka, Patocka *et al.*, 2007; Xiong, Liu *et al.*, 2007; Blaszczyk, Grucka-Mamczar *et al.*, 2008; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010; Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013; Iano, Ferreira *et al.*, 2014; Sun, Gao *et al.*, 2014; Zhou, Zhao *et al.*, 2015). É observado um aumento na concentração de TBARS e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado dos grupos de ratos tratados com 25 mgF/L por meio da água de beber por 8 e 16 semanas. Na análise histopatológica, os fígados dos grupos tratados apresentaram inflamação, infiltração nos hepatócitos e focos de necrose (Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004). Além disso, o F pode alterar o metabolismo de carboidratos no fígado, inibindo a conversão de sorbitol a frutose, além de inibir a glicólise devido à sua ação sobre a enolase (Blaszczyk, Grucka-Mamczar *et al.*, 2008)), bem como perturbar a síntese protéica, elevando as atividades de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que estão relacionadas ao metabolismo hepático (Michael *et al.* 1996)

A proteômica é de grande relevância para avaliar de maneira global estes eventos causados pelo F no tecido hepático. Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram alterações em proteínas hepáticas relacionadas ao metabolismo energético, lipídico e função mitocondrial, principalmente quando os animais são tratados com doses mais altas (50 mgF/L F) de forma crônica (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013). Também foram observadas alterações em fígados de ratos diabéticos

tratados com F, indicando aumento na sensibilidade à insulina quando é administrada uma baixa concentração de F (10 mgF/L), sendo observadas alterações em proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido carboxílico e grupos cetonas.

Já a análise morfométrica histológica em fígado de ratos tratados com doses crônicas de F não revelou alterações nas estruturas celulares, enquanto que o exame morfológico indicou inclusões lipídicas em todos os grupos (Pereira, Leite *et al.*, 2013), fato relacionado provavelmente à administração de uma dieta hipercalórica (Moura, Figueiredo *et al.*, 2012). A presença destas inclusões foi menor nos grupos tratados, indicando que o F poderia provocar alguma alteração neste processo. Essa alteração foi relacionada a um aumento na expressão da Proteína regulada pela glicose-78 (GRP78), que é uma proteína de homeostase e um de seus efeitos é reduzir a produção *de novo* de triglicérides no fígado (Kammoun, Chabanon *et al.*, 2009; Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013). Esta alteração metabólica, gerando a presença de inclusões de lipídios no fígado, pode ser indicativa de uma esteatose.

2.3.4 Esteatose hepática

A presença de inclusões lipídicas no fígado é um espectro histológico da doença de gordura no fígado não alcoólica (NAFLD), que inclui formas diversas de esteatose macrovesicular na forma de gotas pequenas e grandes, com ou sem inflamação, seguida por esteato-hepatite, caracterizada por esteatose, inflamação e injúria celular, ou seja, esteato-hepatite não alcoólica (NASH)(Bugianesi, Leone *et al.*, 2002; Palekar, Naus *et al.*, 2006; Brunt e Tiniakos, 2010). O acúmulo de lipídios pode ser resultado do distúrbio no balanço entre o fornecimento, formação, consumo e oxidação hepática ou eliminação de triglicérides (Paschos e Paletas, 2009). Esta alteração está intimamente relacionada a distúrbios no metabolismo, principalmente aqueles envolvendo estresse oxidativo e, conseqüentemente, peroxidação lipídica (Paschos e Paletas, 2009). Tem sido relatado aumento de peroxidação lipídica em fígado e rins de ratos expostos cronicamente ao F (Karaoz, Oncu *et al.*, 2004; Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004). Tais distúrbios têm grande associação com alterações no metabolismo de lipídios, bem como com alterações no perfil lipídico. A SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (2007) define o perfil lipídico pelas determinações bioquímicas de colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL), triglicérides (TG) e LDL-colesterol (LDL), o qual tem grande relevância na avaliação do risco de evento

coronariano agudo na população. No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular do colesterol; b) armazenamento após esterificação; c) excreção pela bile. O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio de VLDL e LDL. O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do colesterol, HDL, triglicérides do fígado e plasma e LDL. Os conteúdos alimentares de gorduras saturadas e de colesterol influenciam diferentemente os níveis lipídicos plasmáticos.

Muitos trabalhos atuais vêm relatando a ação do F de forma bem incisiva no metabolismo de lipídio bem como no perfil lipídico (Sun, Gao *et al.*, 2014; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015; Umarani, Muvvala *et al.*, 2015).

2.3.5 Ação do Fluoreto no metabolismo de lipídios

A atuação do F no metabolismo de lipídios vem sendo citada por vários autores((Shanthakumari, Srinivasalu *et al.*, 2004; Sun, Gao *et al.*, 2014; Chiba Fy, Garbin Cas *et al.*, 2015; Umarani, Muvvala *et al.*, 2015). Quando ocorre o aumento das concentrações de F no sangue, observa-se um aumento nos níveis de lipídios no sangue em coelhos tratados com uma ração hipercalórica, porém também se observou um aumento do HDL para esses grupos. De acordo com os autores, esse aumento do HDL poderia ser uma resposta compensatória, que por sua vez não seria suficiente para mitigar a elevação do LDL. Os autores afirmaram que o F, juntamente com o excesso de gordura, pode causar estresse oxidativo e aumentar os níveis de lipídios, de forma separada ou em sinergismo (Sun, Gao *et al.*, 2014). Outro trabalho que avaliou ratos, tratados com 25 mgF/Kg por 4 semanas, observou um aumento significativo de colesterol total, triglicérides, LDL e VLDL, além de uma redução no HDL (Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015). Foi ainda relatado que o tratamento de ratos castrados por 42 dias com água contendo 55 mgF/L NaF provoca um aumento de TG, Colesterol total e VLDL, sem alteração no HDL e LDL(Chiba Fy, Garbin Cas *et al.*, 2015).

Este fatos estão de acordo com o que foi observado em trabalhos recentes realizados por nosso grupo, que observaram aumento na expressão da GRP78 nos grupos tratados com F, em sinergismo com uma diminuição discreta na presença de inclusões lipídicas observadas nos fígados dos ratos tratados com 50 mgF/L F por 60 dias (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013). Assim, parece que o estresse oxidativo provocado pelo F no fígado pode alterar o metabolismo de lipídios, levando a um

distúrbio nos níveis deles no sangue, bem como a alterações em lipoproteínas, o que deveria ser investigado.

2.3.6 *Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e ao metabolismo de lipídio*

As alterações no metabolismo de lipídio podem estar relacionadas ao aumento do estresse no retículo endoplasmático, que provocaria um aumento na proteína do retículo endoplasmático 29 (Erp29), superóxido desmutase 2 (SOD 2) e GRP78. A Erp29 é uma proteína exclusiva do RE e seu aumento é um indicio de estresse oxidativo (MKRTCHIAN et al., 1998). A SOD-2 tem papel importante em combater o estresse oxidativo e trabalhos vem relatando alterações em sua atividade em relação ao fluoreto (Iano et al.2014) Em trabalhos recente do nosso grupo foi observado aumento da expressão da GRP78 (Pereira et al. 2013). A GRP78 é uma proteína de homeostase, cujo aumento inibe a proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP), a qual, por sua vez é responsável pela ativação da síntese de TGA através da conversão de Acetil CoA e outros precursores no fígado (Kommoun et al, 2009; Tacer & Rozman, 2011). Logo a sua inibição reduz a produção de TGA no fígado, o que reduz as inclusões lipídicas. No entanto, como há uma redução na conversão de Acetil CoA, esta acaba por se acumular no fígado, gerando uma resposta que provoca a redução da Apoproteína E (APo-E), que é uma proteína responsável pelo transporte de lipídios até o fígado para serem processados (Kockx et al., 2012). Diante deste relatos a análise destas proteínas seria de extrema relevância para o melhor entendimento do mecanismo pelo qual o F poderá provocar alterações no metabolismo de lipídio.

2.3.7 Dieta AIN-93M

A utilização da dieta AIN-93M em trabalhos ligados ao F se tornou rotina uma vez que possui uma baixa concentração de F (Buzalaf, Caroselli et al., 2004; Buzalaf, Caroselli et al., 2005). Porém trabalhos recentemente publicado indicam que a mesma, apesar de ser utilizada como uma dieta controle, tem uma concentração maior de carboidrato e pode gerar alterações no metabolismo de lipídio bem como levar a acúmulo de lipídio no fígado (Moura et al., 2012). A indução

de alterações no metabolismo bem como a esteatose hepática é dado por um modelo experimental que busca a indução da obesidade através de dieta hipercalórica sendo o mais adequado aquele que está mais próximo da realidade da obesidade em humanos (Diemen; Trindade; Trindade, 2006, Cesaretti; Junior Osvaldo, 2006) . Algumas dietas atingem valores hipercalóricos pela adição de carboidratos e outros por adição de gorduras, sendo que a maioria delas varia entre 3,7 Kcal / g e 5,4 Kcal / g. Assim, o emprego de modelos experimentais retratando esta doença ou semelhantes à mesma patologia que atinge o ser humano, é necessário para estudos de procedimentos terapêuticos para seu efetivo tratamento (SILVA, 2012). Desta forma a utilização da dieta AIN-93M neste trabalho se faz pertinente para analisar a ação do F no metabolismo de lipídio, bem como na inclusão de gorduras no fígado.

De esta forma este trabalho irá contribuir para o entendimento do efeito da administração do F em doses altas e baixas no metabolismo do fígado bem como na expressão de proteínas hepáticas, além de elucidar o mecanismo pelo qual o F pode alterar o metabolismo de lipídio bem como se existe diferença quando administradas dietas hipercalóricas e normocalóricas. Também poderemos identificar se existe um processo de adaptação ao F em relação ao tempo de administração.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi elucidar o efeito da concentração de F administrada (0, 15 e 50 mg/L por meio da água de beber), do tempo de exposição (20 ou 60 dias) ao F e exposição concomitante a uma dieta hipercalórica no metabolismo lipídico e expressão de proteínas hepáticas em ratos.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar a concentração de F no fígado e plasma dos animais;
- Analisar o perfil lipídico plasmático dos animais;
- Avaliar a presença de inclusões lipídicas nos fígados de animais;
- Analisar, através de *Western blotting*, a expressão de proteínas referentes ao estresse oxidativo (GRP78, ERP29, e SOD2) bem como ao metabolismo de lipídios (APO-E e SREBP);
- Avaliar a expressão proteica diferencial em fígado de ratos, utilizando-se como ferramenta a análise proteômica.

MATERIAL

E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO, EXPRESSÃO DE PROTEÍNA E ANÁLISE HISTOLÓGICA EM ANIMAIS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE F POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS, COM EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERCALÓRICA OU NORMOCALÓRICA

4.1.1 Obtenção e tratamento dos animais, eutanásia e obtenção das amostras

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Utilizaram-se 72 ratos (*Rattus norvegicus Wistar*) machos com 21 dias. Os animais foram divididos em 2 grupos (n=36 animais por grupo), de acordo com tipo de dieta hipercalórica ou normocalórica (AIN93-M ou Presence respectivamente), os quais foram subdivididos em 2 subgrupos (n=18) de acordo com tempo de tratamento (20 dias ou 60 dias). Cada subgrupo foi dividido em mais 3 subgrupos (n=6 animais por subgrupo), de acordo com a dose de F a ser administrada por meio da água de beber, a saber: 0 mg/L (controle), 15 mg/L ou 50 mg/L.

Os grupos receberam, durante o tratamento, ração Presence (Presence nutrição animal, Ratos e Camundongos, 20kg, Purina), com baixo teor de F (< 1 mgF/L) e valor equilibrado de calorias e nutrientes ou ração AIN-93M, que, apesar de ser utilizada por muito tempo como uma ração padrão, principalmente para os experimentos envolvendo administração de F por meio da água, devido ao baixo teor deste íon (Buzalaf, Caroselli *et al.*, 2004; Buzalaf, Caroselli *et al.*, 2005) possui um alto valor calórico, conforme relatado recentemente (Moura, Figueredo *et al.*, 2012).

Na eutanásia, foram realizadas as pesagens dos ratos. Os animais foram anestesiados por injeção intra-peritoneal de 0,5 mL/Kg de peso corporal de Anasedan (*Agribands, USA*) + 1,5 mL/Kg de peso corporal de Cloridrato de quetamina vetaset (*Fort Dodge, Iowa, USA*). Em seguida, a cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, e o coração foi

puncionado com agulha para coleta do sangue, colhido com uma seringa plástica heparinizada e transferido para tubos heparinizados. Em seguida, o mesmo foi colocado em tubos plásticos (Eppendorf) e centrifugado a 5600 rpm por 4 minutos (*Jouan A14*) para obtenção do plasma. Foram coletados em média 4 mL de sangue, para obtenção de 2 mL de plasma.

Os fígados foram coletados, pesados e cada lóbulo foi cuidadosamente separado. O lóbulo direito foi fixado em solução de formalina 10% para análise histológica. O restante do fígado foi armazenado a -20°C até a análise de F e proteínas.

4.1.2 Dosagens de fluoreto no plasma e fígado

Para a análise do F no plasma foi realizada uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluído biológico, o plasma contém CO₂, que precisa ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela colocou-se o ácido sulfúrico saturado (HMDS) 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 F residual que possa contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada.

Para a análise de F no fígado, inicialmente foi realizada uma homogeneização com 0,15 g de fígado para 0,5 mL de água (Pereira, Leite et al., 2013) (Figura 3). Nesta análise não foi realizada pré-difusão. Neste caso, 1 mL do homogenato foi adicionado à placa de Petri, juntamente com 1 mL de água deionizada. Em ambos os casos, a difusão seguiu como descrito por Taves (1968), modificado por 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 colocou-se hexametil-disiloxano (*Aldrich*, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício imediatamente foi 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, removeram-se as tampas, as mesmas foram 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 microeletrodo de referência calomelano (*Accumet*, número de catálogo #13-620-79), 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.

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 F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 $\mu\text{g/mL}$, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 μg . Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram 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) temos 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 μg 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 a serem 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 foi 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) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. 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 mostrou que o F nos padrões difundidos tinha sido completamente captado e analisado.

Foi feita também uma sequência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV eram 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 sofreram difusão.

4.1.3 Processamento histotécnico

Após a determinação da massa do órgão, os fígados ($n = 6$ por subgrupo) foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 1 semana, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em água corrente e processados histologicamente com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec (parafina + resina plástica).

Cortes longitudinais alternados de 5 μm de espessura foram obtidos dos fígados em micrótomo Leitz-Jung, com um intervalo de 300 μm entre os cortes, montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (Luna, 1968).

Todos os cortes histológicos foram analisados morfológicamente em um microscópio óptico Axioscop 2 (*Carl Zeiss*, Alemanha) e as fotomicrografias obtidas no sistema MC200 chip (*Carl Zeiss*, Alemanha).

Uma fatia do fígado foi separada e após fixação com formol foi fixada em uma solução de 2% de tetróxido de ósmio e 5 % de dicromato de sódio por 8 horas para a fixação dos lipídios. Em seguida esses fragmentos foram lavados por duas horas ou até que a água não saísse transparente, e em seguida foram realizados os procedimentos para inclusão das peças, como descrito acima.

4.1.4 Dosagem de Colesterol no plasma

4.1.4.1 Dosagem de colesterol total

Para a dosagem de colesterol total foi utilizado o *kit* Colesterol –PP (Gold Analisa Diagnóstica, MG, Brasil). Para tanto, foram utilizados 2,5 µL de plasma, acrescidos de 250 µL do reagente de cor, sendo agitado por 30 segundos. Em seguida, foi incubado a 37°C por 10 minutos. Para o *blank*, foi utilizando somente reagente de cor. Na sequência, foi realizada a leitura a 500 nm em leitor de microplaca (BMG LABTECH, Fluostar Optima). Foi realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações de padrão: 50, 100, 150 e 200 mg/dL de colesterol. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,9$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.1.4.2 Dosagem de HDL

Para a dosagem de HDL foi utilizado o kit Colesterol HDL-PP (Gold Analisa Diagnóstica, Mg Brasil). Para tanto, foram utilizados 40 µL de plasma mais 40 µL de solução precipitante contida no *kit*, os quais foram agitados por 30 segundos e em seguida centrifugados em 3500 rpm por 15 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi coletado e reservado para posterior análise. 10 µL do sobrenadante foram acrescentados em 100 µL do reagente de cor e incubado a 37°C por 10 minutos. Para o *blank*, foi utilizado somente reagente de cor. Em seguida, foi realizada a leitura a 500 nm em leitor de microplaca (BMG LABTECH, Fluostar Optima). Foi realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações de padrão: 10, 20, 30 e 40 mmol/L de HDL -colesterol. Somente curvas de calibração com

porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,9$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.1.4.3 Dosagem de triglicérides

Para a dosagem de triglicérides foi utilizado o kit Triglicérides 120 (Doles, Go Brasil). Para tanto, foram utilizados 2,5 μ L de plasma, acrescidos de 250 μ L do reagente de cor, sendo agitado e em seguida incubado a 37°C por 10 minutos. Para o *blanck*, foi utilizando somente reagente de cor. Em seguida, foi realizada a leitura a 500 nm em leitor de microplaca (BMG LABTECH, Fluostar Optima). Foi realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações de padrão (50, 100, 150 e 200 mg/dL). Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,9$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.1.4.4 Identificação indireta de VLDL

Para a identificação da concentração de LDL no plasma foi utilizada a Equação de *Friedewald* (1972):

$$\text{VLDL} = \text{triglicérides}/5$$

4.1.4.5 Identificação indireta do LDL

Para a identificação da concentração de VLDL no plasma foi utilizada a Equação de *Friedewald* (Friedewald, Levy *et al.*, 1972):

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + (\text{VLDL}))$$

4.1.5 Análise de triglicérides no fígado

Para determinar os triglicérides teciduais, foram pesados 200 mg em média de tecido hepático de cada animal. As amostras foram colocadas em tubos do tipo *ependorf* de 2 mL, contendo 0,5 mL de Triton X-100 a 0,1%. Em seguida, os tubos foram sonicados por 45 segundos de forma pulsátil e levados à centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos (Figueira *et al.*,

2007). O sobrenadante foi coletado para a determinação dos triglicerídeos, através da mesma metodologia utilizada para o plasma.

4.1.6. *Western Blotting: GTP78, Erp29, Apo-E, SOD2 e SREBP*

4.1.6.1 *Homogeneização das amostras de fígados*

As amostras foram homogeneizadas em moinho criogênico, modelo 6770 *Freezer Mill* (Spex, Metuchen, NJ, EUA) (figura 1 - A). Para isso, as amostras foram fracionadas em fragmentos de um centímetro, de acordo com a orientação dos fabricantes, colocadas em tubos de policarbonato (figura 5- B), nos quais os fragmentos foram triturados com 15 batimentos por segundo, 1 ciclo de 2 min com um pré-congelamento inicial de 1 min proporcionado pelo N₂, que previne a degradação de componentes da amostra e a mantém em baixa temperatura (figura 1- C e D). Ao final do processo, obtiveram-se amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo. Com esse procedimento, as amostras ficam prontas para extração e quantificação de proteínas totais, sendo primeiro passo para realização do *western blotting* e análise proteômica.

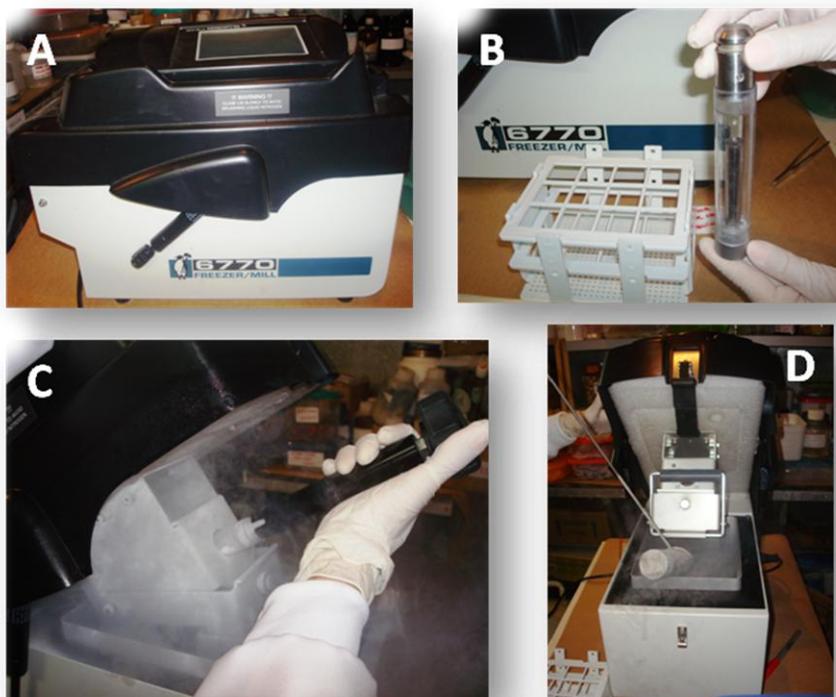


Figura 1 - Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A – Moinho

criogênico; B – Tubo de policarbonato; C – Colocação da amostra no moinho criogênico; D – Colocação do N₂.

4.1.6.2 *Extração proteica do fígado e quantificação de proteínas totais*

Após a homogeneização, as amostras foram submetidas individualmente ao procedimento de extração das proteínas totais. Para tanto, foram acrescentados ao homogeneizado, contendo por volta de 200 µg, 200 µL de tampão de lise gelado (Tampão RIPA, contendo 50 nM tris-HCL (pH 7,4), 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, e 0,2% Nonidet P-40), suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Roche Diagnostics). A seguir, as amostras foram sonicadas duas vezes por 20 segundos cada ciclo em gelo e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g (4°C). O sobrenadante contendo as proteínas totais extraídas foi coletado e armazenado a -80°C, até o momento da utilização. As proteínas foram quantificadas utilizando-se o kit *Biorad Protein Assay* (Biorad) baseado no método de *Bradford* (Bradford, 1976). Para a quantificação, as amostras foram diluídas 10 vezes em H₂O e 5 µL da cada diluição foram pipetados em poços em placas de 96 poços, em duplicata. Foram adicionados 250 µL do reagente de *Bradford* para detecção das proteínas. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 950 nm. O valor obtido foi então interpolado em uma curva de calibração, previamente estabelecida, utilizando-se da mesma metodologia para concentrações conhecidas da proteína padrão BSA (albumina de soro bovino), para a determinação da concentração de proteína total em µg/mL. Os volumes que representam o equivalente à quantidade de 40 µg de proteína total por amostra, de acordo com as concentrações individuais, estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Volumes (em μL) de cada amostra de fígado de ratos equivalentes a 40 μg de proteínas totais.

Grupo		Ração AIN-93M	Ração Presence
20 dias	controle	2,75	3,81
		4,28	2,94
		3,18	3,76
		3,50	2,17
		4,54	4,25
		5,19	3,91
60 dias	controle	2,18	3,36
		2,48	1,55
		1,54	2,40
		1,40	1,21
		2,20	1,98
		1,31	1,91
20 dias	15 mgF/L	5,74	7,28
		2,12	3,15
		2,24	1,36
		2,49	4,09
		7,90	3,97
		2,62	
60 dias	15 mgF/L	1,96	1,64
		3,81	1,79
		2,28	2,11
		1,10	2,03
		2,58	2,04
		2,69	
20 dias	50 mgF/L	2,04	5,60
		2,45	2,42
		2,24	2,66
		6,61	5,54

		2,14	4,70
		2,27	5,58
60 dias	50 mgF/L F	1,56	1,66
		1,52	1,70
		2,89	1,49
		4,22	1,63
		2,01	1,32
		3,89	1,88

4.1.6.3 Western Blotting

Amostras de proteínas totais (40 μ g) de cada grupo foram submetidas individualmente em gel SDS-PAGE 12 %, seguidas da transferência para membranas de PVDF ou nitrocelulose . As membranas foram bloqueadas em leite mólico 5%/TBS-T 0,1% por 1 h em temperatura ambiente (TA), seguidas da incubação com os anticorpos policlonais de coelho anti-GRP78 (na diluição 1:250) , anti-Apo-E (1:1000), ou anti- Erp29 (1:2000), anti-SOD2 (1:500); policlonal de camundongo anti-SREBP (1:500), *overnight* a 4°C(Abcam, Cambridge, MA), anti- β -tubulina (1:200) (Cell Signaling) ou anti- α -tubulina (1:5000) (Abcam, Cambridge, MA) em leite mólico 5%/TBS-Tween 0.1%.. Após sucessivas lavagens para a remoção dos anticorpos não ligados, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (GE, Piscataway, NJ) (diluição 1:10000) por 1 h a TA, sob leve agitação. . Após esse período, as membranas foram novamente lavadas com TBS/T 0,1% e submetidas a detecção das bandas utilizando o *kit* de reagentes de quimiluminescência (GE, Piscataway, NJ). Após exposição da membrana ao escaner LI-COR Corporate Offices-US (Lincoln, Nebraska USA) as bandas foram detectadas . As densidades relativas das bandas foram determinadas através de análise de densitometria, utilizando o programa Image Studio Lite software da LI-COR Corporate Offices-US (Lincoln, Nebraska USA). Os resultados foram expressos como a razão

entre a quantidade de proteína de interesse pela quantidade de proteína constitutiva β -tubulina ou α -tubulina. Os valores das densidades foram corrigidos pela subtração dos valores do “background”. A média dos valores arbitrários obtidos para o grupo controle foi considerado igual a 1, sendo que a valores individuais dos demais grupos foram calculados em relação ao controle.

4.1.7 – Análise estatística

Para os dados referentes às análises de F, tanto no plasma quanto no fígado e do *Western Blotting*, foi utilizado o *software* GraphPad InStat (versão 3,0 para *Windows*, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Inicialmente foram checadas a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados para seleção do teste estatístico apropriado (ANOVA seguida pelo teste de *Tukey* para comparações individuais ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de *Dunn* para comparações individuais).

Já para as análises a 3 critérios (dose de F, tempo de tratamento e tipo de ração), foi utilizado o *software* Statistica (versão 10.0 para *Windows*, StatSoft. Inc. Tulsa. USA 2011). Foi empregado o teste ANOVA a 3 critérios, seguida pelo teste de *Tukey* para a comparações individuais.

O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%. Os valores foram apresentados como media \pm desvio padrão.

4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA NO FÍGADO DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLUORETO A PARTIR DA ÁGUA DE BEBER, POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Obtenção e tratamento dos animais, eutanásia e obtenção das amostras

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Utilizaram-se 36 ratos (*Rattus norvegicus Wistar*) machos com 21 dias. Os animais foram divididos em 2 grupos (n=18 animais por grupo), de acordo com o tempo de tratamento (20 dias ou 60 dias). Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos (n=6 animais por subgrupo), de acordo com a dose de F a ser administrada através da água de beber, a saber: 0 mg/L (controle), 15 mg/L ou 50 mg/L.

Todos os grupos receberam, durante o tratamento, ração Presence (Presence nutrição animal, Ratos e Camundongos, 20kg, Purina), com baixo teor de F (< 1 mgF/L) e valor equilibrado de calorias e nutrientes. Anteriormente foi observado que a ração AIN-93M, apesar de ser utilizada por muito tempo como uma ração padrão, principalmente para os experimentos envolvendo administração de F através da água, devido ao baixo teor deste íon (Buzalaf, Linardi *et al.*, 2004; Buzalaf, Caroselli *et al.*, 2005) possui um alto valor calórico, conforme relatado recentemente (Moura, Figueredo *et al.*, 2012), o que a torna inapropriada para o objetivo inicial do projeto.

Na eutanásia, foram realizadas as pesagens dos ratos. Os animais foram anestesiados por injeção intra-peritoneal de 0,5 mL/Kg de peso corporal de Anasedan (Agribrands, USA) + 1,5 mL/Kg de peso corporal de Cloridrato de quetamina vetaset (Fort Dodge, Iowa, USA). Em seguida, a cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, e o coração foi puncionado com agulha para coleta do sangue colhido com uma seringa plástica heparinizada e transferido para tubos heparinizados. Em seguida, o mesmo foi colocado em tubos plásticos (Eppendorf) e centrifugado a

5600 rpm por 4 minutos (Jouan A14) para obtenção do plasma. Foram coletados em média 4 mL de sangue, para obtenção de 2 mL de plasma.

Os fígados foram coletados, pesados e cada lóbulo foi cuidadosamente separado. O lóbulo direito foi fixado em solução de formalina 10% para análise histológica. O restante do fígado foi armazenado a -20°C até a análise de F e proteínas.

4.2.2 Dosagens de F plasma e fígado

Foi realizada como descrito anteriormente.

4.2.3. Análise estatística

Foram utilizados os *softwares* GraphPad InStat versão 3 para *Windows* e GraphPad Prism versão 4 para *Windows*. (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente os dados serão checados em relação à normalidade e homogeneidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente, para seleção do teste de análise apropriado. O nível de significância foi estabelecido em 5% em todos os casos.

4.2.4 Análise proteômica

4.2.4.1 Extração de proteínas do fígado e quantificação

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, 1 ciclo de 2 min com 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, obtiveram-se amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo. Com esse procedimento, as amostras ficam

prontas para extração e quantificação de proteínas totais, sendo o primeiro passo para realização da análise proteômica.

4.2.4.2 Preparo das amostras para espectrometria de massa

Para extração das proteínas do fígado 100 mg do tecido foram transferidos para um microtubo, onde foram adicionados 500 μ L de tampão de extração contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, e ditioneína (DTT) 40 mM. Após 1 h de incubação em gelo, com agitação em vórtex a cada 10 min, o homogenato foi submetido à centrifugação a 14 000 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi em seguida coletado. Após a extração, as proteínas foram filtradas em Amicon® *Ultra Centrifugal Filters* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) juntamente com tampão de uréia 3M. Em seguida as amostras foram quantificadas com auxílio do Kit *Quick Start Bradford* (Bio-Rad) que está baseado no método de Bradford (1976), e então 200 μ g de proteínas foram utilizados para formar um *pool* de 2 amostras, sendo 6 amostras por grupo, formando assim uma triplicata biológica para cada grupo. O *pool* de 2 amostras foi novamente submetido à análise de quantificação proteica, como descrito acima. Para as amostras correspondentes a cada *pool* foram calculados os volumes que correspondiam a 50 μ g de proteínas, que foram transferidos para um microtubo e a estas adicionado AMBIC até um volume final de 60 μ L. Em seguida, foram pipetados 25 μ L de RapiGest® 0,2% (Waters) e então agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Foram então reduzidas através da incubação a 37°C com DTT 100 mM. Em seguida, adicionou-se Iodoacetamida (IAA) 300 mM por 30 min em temperatura ambiente, para devida alquilação das amostras. Após a alquilação, foi realizada a digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) e incubação a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, a ação da enzima foi paralisada pela adição de 5 μ L de ácido fórmico 3% e depois incubada por 90 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 min. O

sobrenadante contendo os peptídeos foi então destinado à análise por UPLC-MS.

4.2.4.3 Sequenciamento das proteínas no espectrômetro de massa

A identificação dos peptídeos foi feita num sistema *nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS system* (Waters, Manchester, UK). O *nanoACQUITY UPLC®* foi equipado com uma coluna analítica de fase reversa *nanoACQUITY HSS T3* (75 µm X 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 µm, Waters Manchester, UK). A coluna foi equilibrada com 93% da fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água) e 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1% ácido fórmico). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85 % (ácido fórmico 0,1 % em ACN 100%) por 70 min num fluxo de 0,35 µL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C.

O espectrômetro de massas *Xevo® G2 Q-TOF* foi operado em modo iônico positivo de *nanoeletrospray* e os dados foram coletados usando o método MSE em elevada energia (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos numa única injeção. As condições de fonte usadas incluíram voltagem do capilar de 2,5 kV, cone de amostra de 30 V, cone de extração de 5,0 V e temperatura da fonte de 80°C. Os dados foram adquiridos durante 70 min, com varredura na faixa de 50–2000 Da. O *lockspray*, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1]fibrinopeptídeo (1 pmol/µL), com fluxo de 1 µL/min, como um íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427.

4.2.4.4 Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi obtida utilizando o *software ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 3,0, através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Rattus* (revisado apenas,

UniProtKB/Swiss-Prot) baixado em Julho de 2014 a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

A diferença de expressão entre os grupos foi obtida usando o software PLGS e expressão como $p < 0,05$ para as proteínas subreguladas e $1-p > 0,95$ para as proteínas suprarreguladas.

4.2.4.5 Análise dos dados por meio da Bioinformática

Com o objetivo de compreender o significado biológico dos resultados quantitativos da análise proteômica, as listas de proteínas diferencialmente alteradas nas comparações entre os diferentes grupos experimentais foram submetidos à análise de classificação funcional *Gene Ontology* (GO) através da utilizado do programa Cluego v2.0.7 + Clupedia v1.0.8, Cytoscape plugin (Cytoscape version 3.0.2.).

***RESULTADOS
E DISCUSSÃO***

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO, EXPRESSÃO DE PROTEINA E ANÁLISE HISTOLÓGICA EM ANIMAIS TRATADOS CRONICAMENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE F POR DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS, COM EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE A UMA DIETA HIPERCALÓRICA OU NORMOCALÓRICA

5.1.1. Dosagens de fluoreto plasma e fígado

A figura 2 mostra os valores da concentração média de F encontrada no plasma, em função dos tratamentos com F por 20 ou 60 dias, para os animais que receberam dieta AIN-93M ou Presence. As concentrações médias de F (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram, respectivamente, $0,008\pm 0,003$, $0,023\pm 0,005$ e $0,059\pm 0,015$ mg/L para os grupos controle e tratados com 15 e 50 mg/L de F por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $0,006\pm 0,001$, $0,029\pm 0,006$ e $0,081\pm 0,021$ mg/L. Já para os animais que receberam a dieta Presence e foram tratados por 20 dias, as concentrações médias de F (\pm DP) foram, respectivamente $0,010\pm 0,004$, $0,027\pm 0,005$ e $0,069\pm 0,010$ mg/L para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias com a dieta Presence foram $0,005\pm 0,002$, $0,015\pm 0,005$ e $0,046\pm 0,007$ mg/L, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas ($F=6,9557$, $p=0,012$), entre as concentrações de F ($F=164,035$, $p<0,001$), mas não entre os tempos experimentais ($F=0,185$, $p=0,669$), com interação significativa entre ração e tempo ($F=14,156$, $p<0,001$). Para as diferentes concentrações de F foi, em geral observado um aumento na concentração de acordo com a dose administrada, embora nem em todos os casos as diferenças tenham sido significativas como no caso do grupo tratados com 15mg/L de F tratados com a dieta Presence e para o grupo tratado com a dieta AIN-93M por 20 dias. Já em relação aos tipos de dietas, para o tratamento de 60 dias, a ração AIN-93M (hipercalórica) levou a concentrações maiores de F no plasma dos animais tratados com F (não

significativo para os animais tratados com 15 mgF/L), o que não foi observado para os animais tratados por menor tempo (20 dias).

Pereira (2011), em trabalho semelhante onde administrou cronicamente F nas concentrações de 0 mgF/L, 5 mgF/L e 50 mgF/L de F observou uma dose-resposta nas amostras de plasma de animais tratados por 60 dias, assim como foi observado no presente trabalho. De acordo com a autora, esta dose-resposta confirma que o tratamento dos mesmos com água fluoretada foi efetivo. Porém neste caso não foi possível encontrar uma dose resposta com diferença significativa, embora tenha havido uma tendência para esse efeito. Para o período de 60 dias houve um aumento significativo da concentração de F na maior dose quando administrada a dieta hipercalórica, um indício de que o F pode se acumular mais quando esta dieta é administrada por longo período.

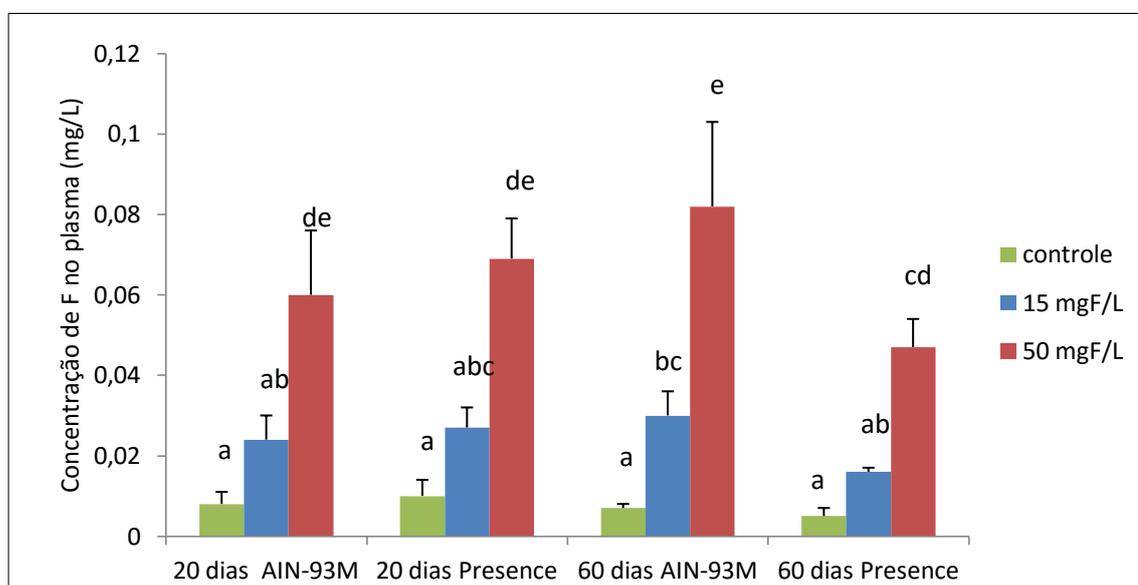


Figura 2 - Concentração média de F nas amostras de plasma (mg/L) em ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de ração (normocalórica – Presence ou hipercalórica – AIN-93-M). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$.

A figura 3 mostra os valores da concentração média de F encontrada no tecido hepático, em função dos grupos com animais tratados durante períodos de 20 ou 60 dias, que receberam a ração AIN-93M ou Presence e da concentração de F administrada. As concentrações médias de F (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $0,382\pm 0,009$, $0,559\pm 0,035$ e $0,947\pm 0,890$ $\mu\text{g/g}$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $0,204\pm 0,088$, $1,229\pm 0,898$ e $1,747\pm 0,401$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. As concentrações médias de F (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $0,278\pm 0,066$, $0,059\pm 0,050$ e $0,925\pm 0,443$ $\mu\text{g/g}$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $0,271\pm 0,062$, $0,599\pm 0,164$ e $0,772\pm 0,452$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas ($F=7,509$, $p=0,009$), as concentrações de F ($F=22,808$, $p<0,001$), mas não entre os tempos experimentais ($F=2,262$, $p=0,140$), com interação entre ração e tempo ($F=6,158$, $p=0,017$).

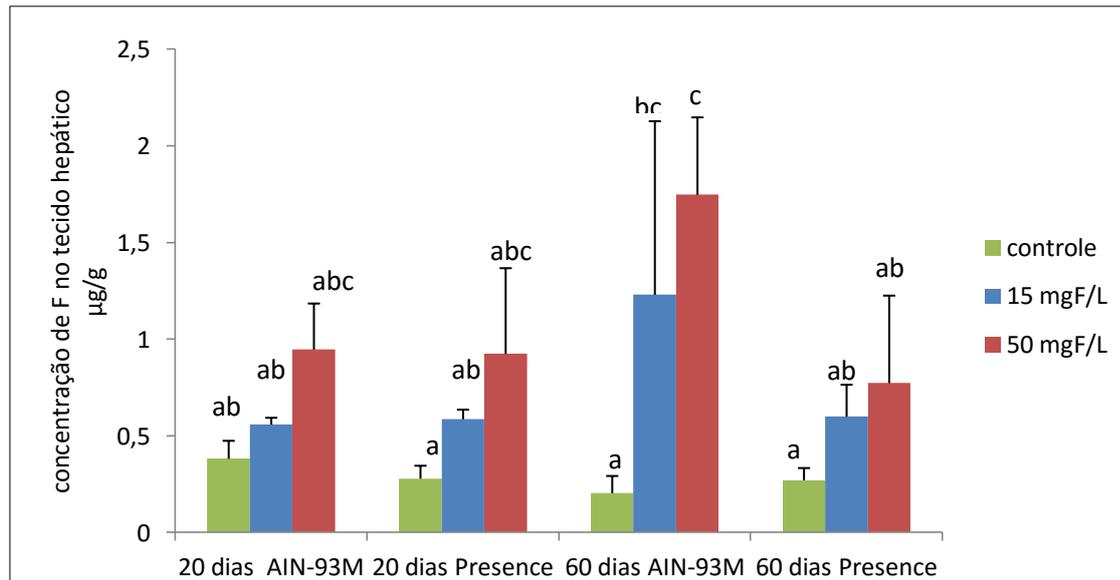


Figura 3 - Concentração média de F nas amostras de fígado ($\mu\text{g/g}$ de tecido hepático) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de ração. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p<0,05$). $n=6$.

Apesar de se observar uma tendência para a um aumento de acordo com a dose administrada nas concentrações de F no tecido hepático, a diferença não foi significativa entre todos os grupos, como ocorreu para o plasma. Muitos autores em seus trabalhos também não observaram essa dose-resposta. Tsunoda et al. (2005) não encontraram diferença significativa entre as concentrações de F no tecido hepático do grupo controle quando comparado aos animais tratados com 5 mgF/L e 25 mgF/L de F através da água de beber durante um mês, sendo que só foi observado aumento significativo quando foi administrada uma dose de 125 mgF/L de F. Pereira et al. (2013) também não observaram um aumento da concentração de F de acordo com dose de F no tecido hepático de ratos tratados com 0 mgF/L e 5 mgF/L de F, somente tendo sido observado aumento significativo nestas concentrações quando os animais foram tratados com 50 mgF/L de F, de modo similar ao observado no presente estudo. Acreditamos que por não ser o fígado um órgão de deposição de F o mesmo não acumula neste órgão. Assim sua concentração no fígado fica dependente da concentração do F no plasma, tendendo a ficar em equilíbrio com a concentração plasmática. Em adição assim como foi observado para o plasma também foi observado uma maior concentração de F no fígado que animais tratados por 60 dias com a dieta hipercalórica indicando novamente que pode ocorrer um maior acúmulo deste íon quando esta dieta é administrada por longo período.

5.1.2. Análise histológica

Foi realizada uma análise histológica baseada em *scores* (figura 4) para as inclusões lipídicas no fígado dos animais que receberam a ração Presence, seguindo a mesma metodologia empregada para as lâminas dos animais que receberam a ração AIN-93M. Foi realizada uma análise qualitativa com *scores* que variaram de 0 até 5, sendo que 1 indicava um fígado com poucas (ou quase nenhuma) inclusões e 5, maior presença de inclusões lipídicas. A análise foi realizada por 3 observadores e os valores de cada lâmina referente a cada animal/grupo foram relacionados nas tabelas 15 e 16.

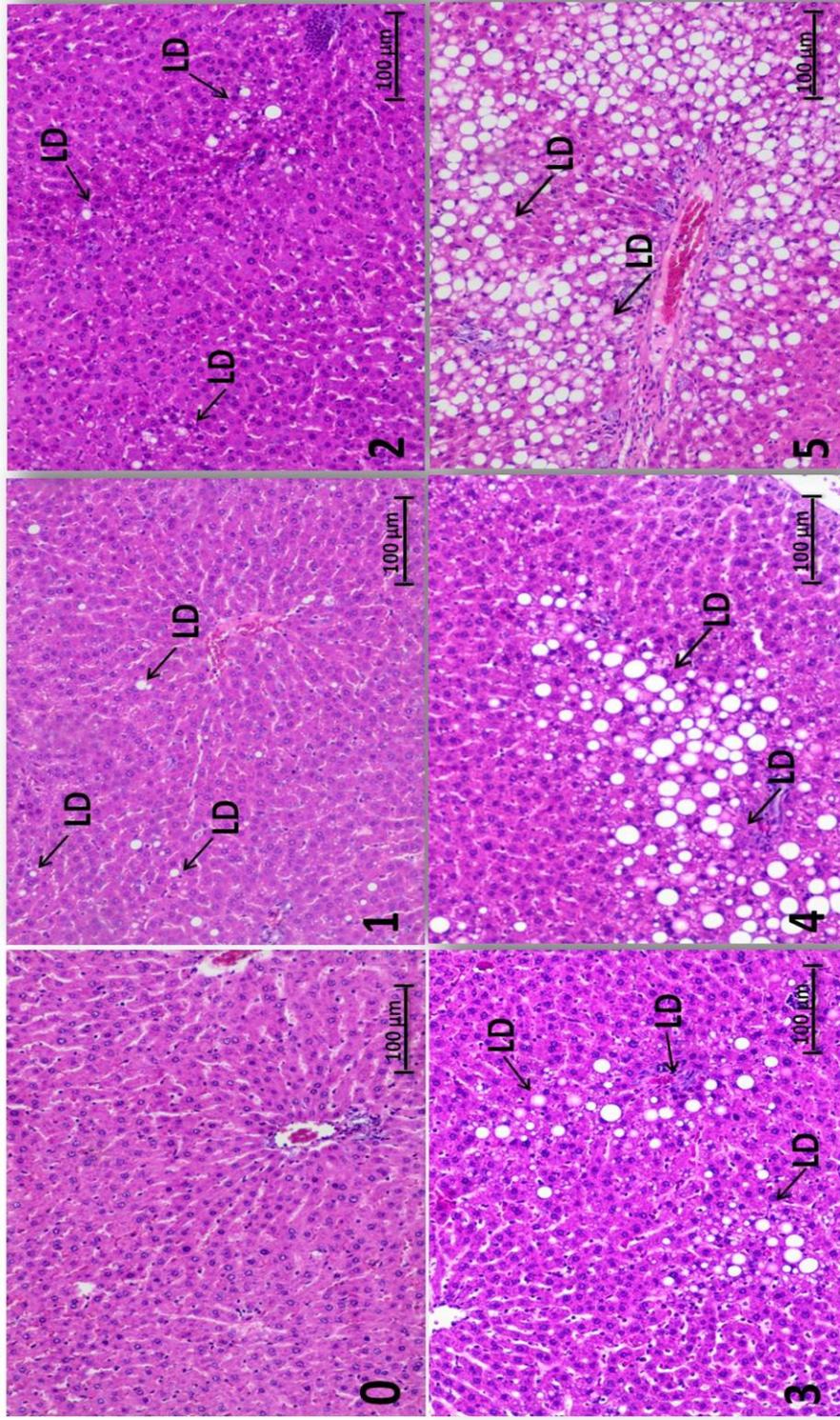


Figura 4- Fotomicrografia de fígado em H&E (40x) com valores de score demonstrando o nível de vesículas de inclusões lipídicas (IL). Os scores variam entre: 0-indicando ausência de lipídios; 1- presença esparsa de lipídios; 2- presença de poucas inclusões lipídicas; 3- presença mais evidente, com macro e microvesículas lipídicas; 4- presença de macro vesículas lipídicas; 5- grande presença de macro vesículas lipídicas.

Com o intuito de aumentar a fidelidade dos resultados, foi realizado o método *Kappa* (Landis e Koch, 1977) antes das análises finais intra e inter observadores. Para a realização deste método, foram utilizados dois animais de cada grupo, totalizando 24 lâminas, das quais 12 são dos animais que receberam a ração AIN – 93M e 12 da ração Presence. Os valores referentes a cada análise e a cada observador estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Valores do índice *kappa* segundo as análises intra e inter observadores.

	Observador 1	Observador 2	Observador 3
Observador 1	0,84	0,89	0,85
Observador 2	0,89	0,84	0,81
Observador 3	0,85	0,81	0,88

Após a calibração dos observadores, os mesmos fizeram análise das lâminas e definiram os valores finais de *score* para cada animal. Em seguida, as análises que não estavam em concordância foram refeitas e então realizou-se um consenso. Os valores referentes às análises realizadas após o consenso estão discriminadas nas tabelas 3,4,5 e 6.

Tabela 3. *Score* do nível de esteatose (1 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento (controle, 15 mgF/L e 50 mgF/L F) por 20 dias, realizado por 3 observadores.

Animal	[] de F	Score - observador 1	Score - observador 2	Score - observador 3	Média dos Scores
1	Controle	1	2	1	1,33
2	Controle	5	5	5	5,00
3	Controle	1	2	2	1,67
4	Controle	5	4	5	4,67
5	Controle	5	5	5	5,00
6	Controle	5	4	5	4,67
7	15 mgF/L	2	4	4	3,33
8	15 mgF/L	4	3	3	3,33
9	15 mgF/L	1	1	1	1,00

10	15 mgF/L	1	1	1	1,00
11	15 mgF/L	5	5	5	5,00
12	15mgF/L	5	5	5	5,00
13	50 mgF/L	1	1	1	1,00
14	50 mgF/L	1	1	1	1,00
15	50 mgF/L	2	2	2	2,00
16	50 mgF/L	1	2	2	1,67
17	50 mgF/L	1	1	1	1,00
18	50 mgF/L	1	1	1	1,00

Tabela 4. Score do nível de esteatose (1 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento (controle, 15 mgF/L e 50 mgF/L F) por 60 dias, realizado por 3 observadores.

Animal	[] de F	Score - observador 1	Score - observador 2	Score - observador 3	Média dos Scores
1	Controle	2	2	3	2,33
2	Controle	2	2	4	2,67
3	Controle	2	2	3	2,33
4	Controle	4	4	4	4,00
5	Controle	5	5	5	5,00
6	Controle	2	3	3	2,67
7	15 mgF/L	5	5	3	4,33
8	15 mgF/L	5	5	5	5,00
9	15 mgF/L	1	1	1	1,00
10	15 mgF/L	5	5	5	5,00
11	15 mgF/L	1	3	3	2,33
12	15mgF/L	2	4	4	3,33
13	50 mgF/L	1	1	1	1,00
14	50 mgF/L	1	2	2	1,67
15	50 mgF/L	3	3	4	3,33
16	50 mgF/L	2	2	3	2,33

17	50 mgF/L	3	4	4	3,67
18	50 mgF/L	1	1	2	1,33

Tabela 5. Score (3 observadores) do nível de esteatose (0 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento com água contendo 0 (controle), 15 ou 50 mgF/L F por 20 dias e ração Presence.

Animal	[] de F	Score - observador 1	Score - observador 2	Score - observador 3	Média dos Scores
1	Controle	0	0	0	0,00
2	Controle	0	1	0	0,33
3	Controle	0	0	0	0,00
4	Controle	0	1	0	0,33
5	Controle	1	0	0	0,33
6	Controle	0	0	0	0,00
7	15 mgF/L	0	0	0	0,00
8	15 mgF/L	0	1	0	0,33
9	15 mgF/L	1	0	0	0,33
10	15 mgF/L	0	1	0	0,33
11	15 mgF/L	0	1	0	0,33
12	15mgF/L	1	1	1	1,00
13	50 mgF/L	1	1	1	1,00
14	50 mgF/L	0	0	0	0,00
15	50 mgF/L	0	1	0	0,33
16	50 mgF/L	1	2	1	1,33
17	50 mgF/L	0	0	0	0,00
18	50 mgF/L	0	1	0	0,33

Tabela 6 Score (3 observadores) do nível de esteatose (0 até 5) referente a cada animal do grupo que recebeu tratamento com água contendo 0 (controle), 15 ou 50 mgF/L F por 60 dias e ração Presence.

Animal	[] de F	Score - observador 1	Score - observador 2	Score - observador 3	Média dos Scores
1	Controle	0	1	0	0,33
2	Controle	0	0	0	0,00
3	Controle	0	0	0	0,00
4	Controle	0	0	0	0,00
5	Controle	1	0	0	0,33
6	Controle	0	1	0	0,33
7	15 mgF/L	0	0	0	0,00
8	15 mgF/L	1	0	0	0,33
9	15 mgF/L	0	1	0	0,33
10	15 mgF/L	0	1	0	0,33
11	15 mgF/L	0	0	0	0,00
12	15mgF/L	0	0	0	0,00
13	50 mgF/L	0	1	0	0,33
14	50 mgF/L	0	0	0	0,00
15	50 mgF/L	0	0	0	0,00
16	50 mgF/L	0	0	0	0,00
17	50 mgF/L	0	0	0	0,00
18	50 mgF/L	0	0	0	0,00

Os scores médios (\pm DP) encontrados nas lâminas histológicas, em animais tratados por um período de 20 dias foram, $0,165\pm 0,181$, $0,386\pm 0,328$ e $0,498\pm 0,547$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente. O teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn* não detectou diferenças significativas entre os grupos ($KW= 7,089$, $p=0,214$). O maior valor encontrado foi para o grupo 50 mgF/L F, que não se diferenciou significativamente dos outros grupos. O menor valor foi observado para o grupo controle. Para o período de 60

dias para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F os *scores* médios (\pm DP) foram $0,165\pm 0,181$, $0,165\pm 0,181$ e $0,055\pm 0,135$, respectivamente. O teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* não detectou diferenças significativas entre os grupos ($KW= 7,089$, $p=0,2141$).

Em relação às lâminas impregnadas com tetróxido de ósmio dos grupos que receberam a ração AIN-93M, houve a confirmação de que os vacúolos observados e indicados como inclusões lipídicas nas lâminas coradas com H&E são realmente lipídios (figura 5). Porém, não foi possível quantificar as inclusões, pois a técnica não possibilitou uma impregnação homogênea do tecido.

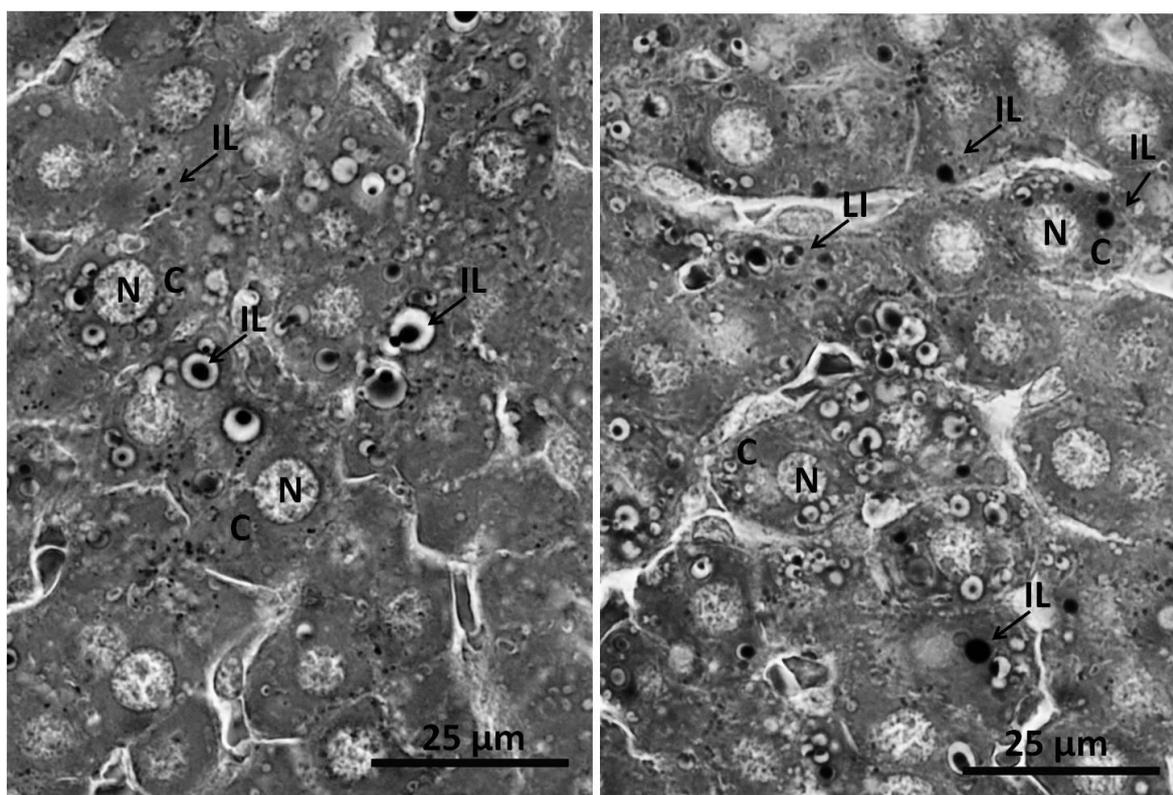


Figura 5: Fotomicrografia de fígado de rato tratado com 50 mgF/L F que recebeu a ração AIN-93M com tetróxido de Osmium, demonstrando a presença de inclusão lipídicas (IL) dentro dos vacúolos. N – núcleo E C - citoplasma

A ANOVA a três critérios (tempo de tratamento, concentração de F e tipo de ração) indicou diferença significativa para o tipo de ração ($F=137,48$ $p<0,001$), bem como para a interação entre ração x concentração de F ($F=4,22$, $p=0,019$). Em relação ao tipo de ração, foram observados valores de *score* significativamente maiores para o grupo que recebeu ração AIN-93M em

comparação à Presence ($p < 0,001$). Em relação à interação ração x dosagem de F, o teste de *Tukey* indicou uma redução para os animais que receberam a ração AIN-93M para o grupo tratado com 50 mgF/L quando comparado aos grupos 0 mgF/L ($p = 0,003$) e o 15 mgF/L ($p = 0,010$) (Figura 6).

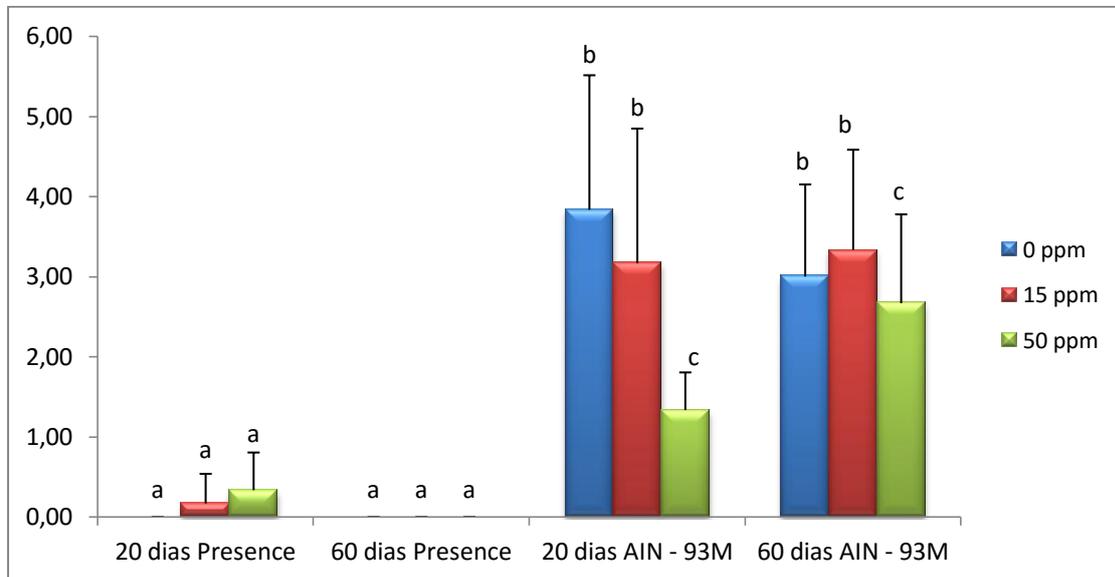


Figura 6. Média dos scores do nível de esteatose relacionando tempo, dose e ração. Letras distintas indicam diferenças significativas (ANOVA a 3 critérios, $p < 0,05$). As barras indicam desvio-padrão. $n = 6$.

A análise morfológica revelou um aumento significativo da esteatose quando administrada uma dieta hipercalórica, em relação à dieta normocalórica. Os maiores níveis de esteatose foram encontrados no grupo controle quando tratado com uma dieta hipercalórica por 20 dias e os menores níveis para o grupo de 60 dias que receberam a dieta normocalórica. Para os grupos que receberam a dieta hipercalórica foi observado que para o período de 60 dias ocorreu uma homogeneização dos níveis de *score* e para o período de 20 dias foi observada uma dose-resposta inversa, onde o grupo que recebeu o tratamento com 50 mgF/L teve uma redução significativa dos níveis de esteatose. Esta redução no grupo tratado por 20 dias pode estar relacionada ao fato de que, neste período de vida do animal (40 dias), o mesmo é muito jovem e logo mais suscetível à ação do F. Já para o período de 60 dias pode ter ocorrido uma adaptação do fígado frente

ao tratamento com o F e à dieta hipercalórica, ocorrendo assim uma homogeneização da esteatose (Dabrowska, Letko *et al.*, 2006). Desta forma podemos sugerir que o F pode ter um efeito protetor quando administrado em animais jovens por 20 dias, o que pode estar relacionado ao fato deste íon ativar proteínas responsáveis pela homeostase, como é o caso da GRP78 (Kammoun, Chabanon *et al.*, 2009). Muitos trabalhos vêm indicando que o F provoca o aumento desta proteína a qual, por sua vez, aumenta em resposta ao estresse oxidativo (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013)

5.1.3 Dosagem de Colesterol no plasma

5.1.3.1. Análise de HDL

A figura 7 mostra os valores da concentração média de HDL-colesterol, em mg/dL, encontrada no plasma em função da concentração de F administrada, em animais tratados durante períodos de 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de HDL (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: 38,3 \pm 4,2, 40,8 \pm 2,5 e 56,1 \pm 4,8 mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram 46,6 \pm 8,0, 56,1 \pm 4,8 e 49,9 \pm 6,2 μ g/g, respectivamente. As concentrações médias de F (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram: 16,2 \pm 5,2, 28,6 \pm 5,3 e 26,4 \pm 0,8 μ g/mL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram 6,8 \pm 1,9, 7,0 \pm 1,9 e 3,4 \pm 1,8 μ g/mL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas (F=561,32, p<0,001), as concentrações de F (F=7,814 p=0,001) e entre os tempos experimentais (F=9,385, p=0,004), com interação entre dieta e tempo (F=111,160, p<0,001), bem como entre dieta, tempo e dosagem de F (F=4,696, p=0,014).

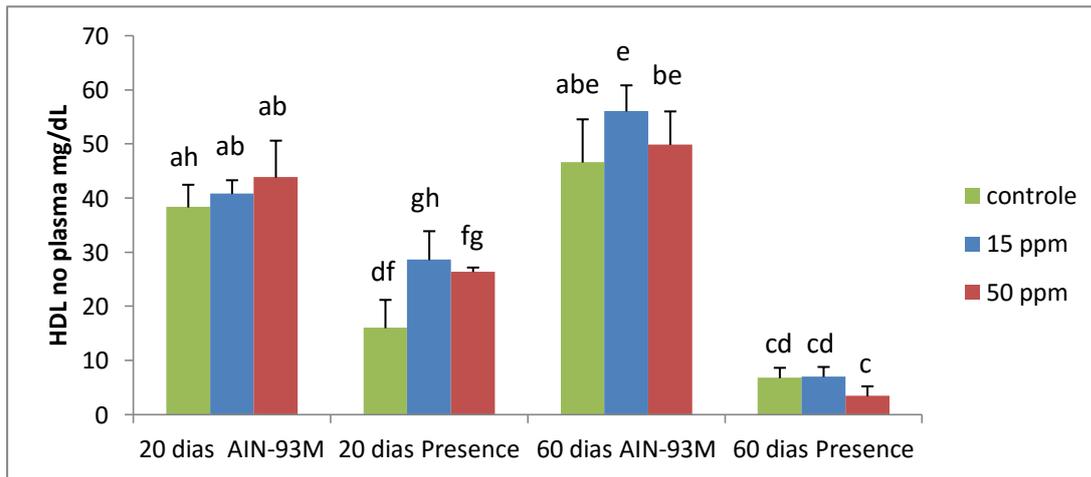


Figura 7 - Concentração média de HDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias) e dois tipos de dieta. Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA a 2 critérios, $p > 0,05$). Barras verticais representam desvio padrão, $n=6$.

5.1.3.2 Análise de Colesterol total

A figura 8 mostra os valores da concentração média de colesterol total em mg/dL encontrada no plasma, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de colesterol total (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $113,5 \pm 10,5$, $112,4 \pm 7,9$ e $104,5 \pm 6,4$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $100,2 \pm 10,5$, $103,7 \pm 8,1$ e $107,0 \pm 9,1$ mg/dL, respectivamente. As concentrações médias de colesterol total (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $125,7 \pm 14,7$, $130,8 \pm 8,8$ e $112,8 \pm 3,5$ μ g/mL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $75,0 \pm 7,2$, $81,3 \pm 10,1$ e $83,4 \pm 8,8$ μ g/mL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas ($F=6,069$, $p=0,016$) e entre os

tempos experimentais ($F=9,385$, $p=0,004$), mas não entre as concentrações de F ($F=7,814$ $p=0,001$), com interação entre dieta e tempo ($F=111,160$, $p<0,001$), e entre dieta, tempo e dosagem de F ($F=4,696$, $p=0,014$).

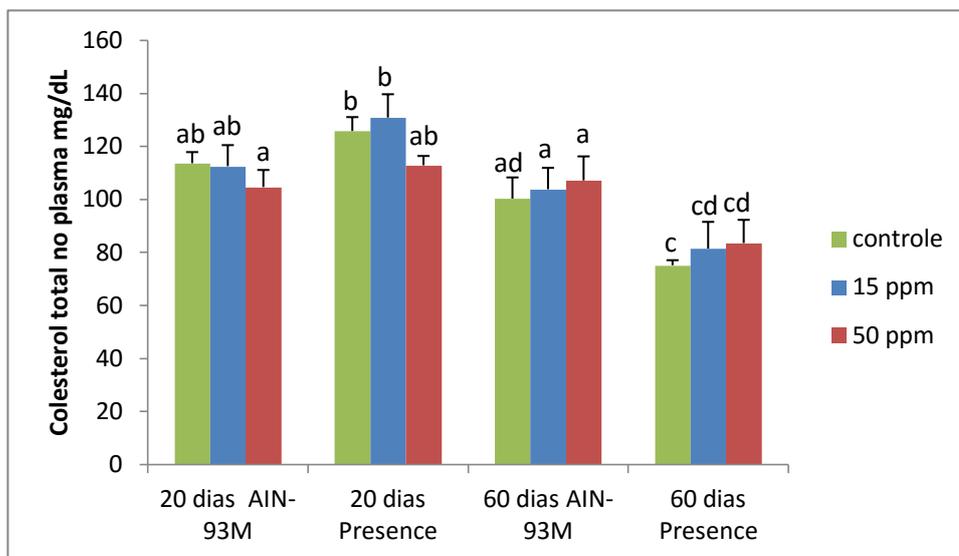


Figura 8- Concentração média de colesterol total nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p<0,05$). $n=6$.

5.1.3.3. Análise de Triglicerídeos

A figura 9 mostra os valores da concentração média de triglicerídeos, em mg/dL, encontrada no plasma, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de triglicerídeos ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $92,3 \pm 10,8$, $38,0 \pm 6,1$ e $48,7 \pm 10,5$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $151,6 \pm 20,5$, $111,7 \pm 15,7$ e $146,8 \pm 8,1$ mg/dL, respectivamente. As concentrações médias de triglicerídeos ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $135,0 \pm 25,2$, $124,0 \pm 5,4$ e $115,6 \pm 21,9$ mg/dL

para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $63,6 \pm 8,9$, $103,3 \pm 15,7$ e $54,7 \pm 8,1$ mg/dL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios não observou diferença significativa entre as dietas ($F=0,071$, $p=0,791$), mas houve diferença para as concentrações de F ($F=7,615$ $p=0,001$), entre os tempos experimentais ($F=8,608$, $p=0,005$), com interação entre ração e tempo ($F=208,32$, $p<0,001$), entre ração e dosagem de F ($F=16,60$, $p<0,001$), entre dosagem de F e tempo ($F=4,72$, $p=0,01$) e entre ração, tempo e dosagem de F ($F=4,382$, $p=0,018$).

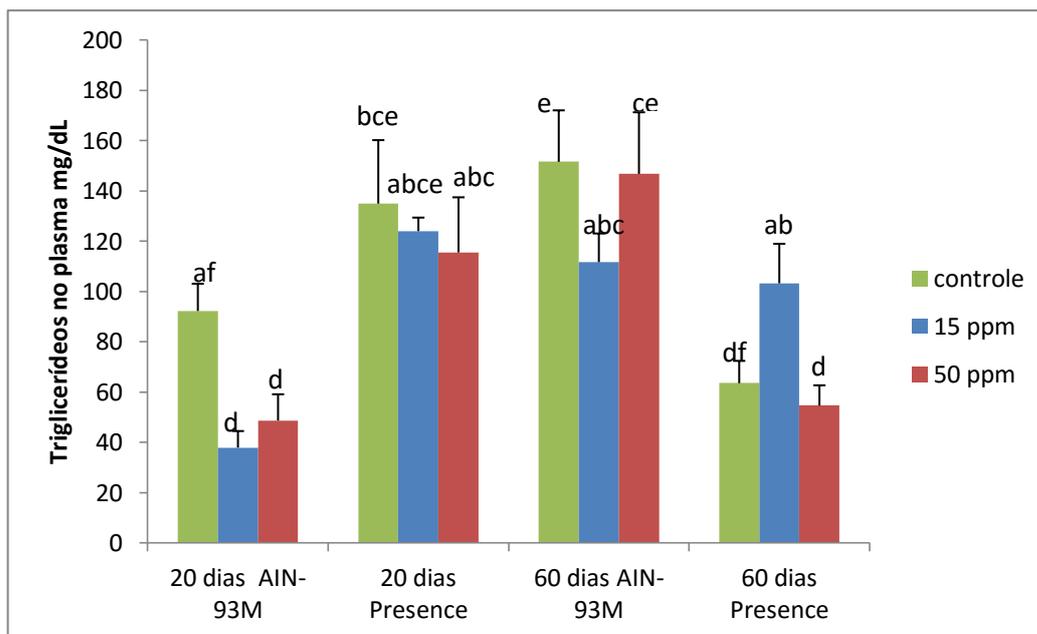


Figura 9- Concentração média de triglicerídeos nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento e concentrações de F, respectivamente (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p<0,05$). $n=6$.

5.1.3.4. Análise LDL

A figura 10 mostra os valores da concentração média de LDL, em mg/dL, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de LDL (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $53,8\pm 17,2$, $64,4\pm 7,8$ e $53,0\pm 15,7$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $39,9\pm 9,3$, $30,8\pm 11,4$ e $33,5\pm 11,8$ mg/dL, respectivamente. As concentrações médias de LDL (\pm DP) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $80,7\pm 11,4$, $31,7\pm 10,1$ e $62,7\pm 8,0$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $58,4\pm 8,0$, $57,0\pm 9,8$ e $68,7\pm 5,2$ mg/dL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas ($F=18,76$, $p<0,001$), para as concentrações de F ($F=4,766$ $p=0,014$), entre os tempos experimentais ($F=8,99$, $p=0,005$), com interação entre ração e tempo ($F=15,52$, $p<0,001$), entre ração e dosagem de F ($F=6,66$, $p=0,003$) e entre ração, tempo e dosagem de F ($F=8,81$, $p<0,001$).

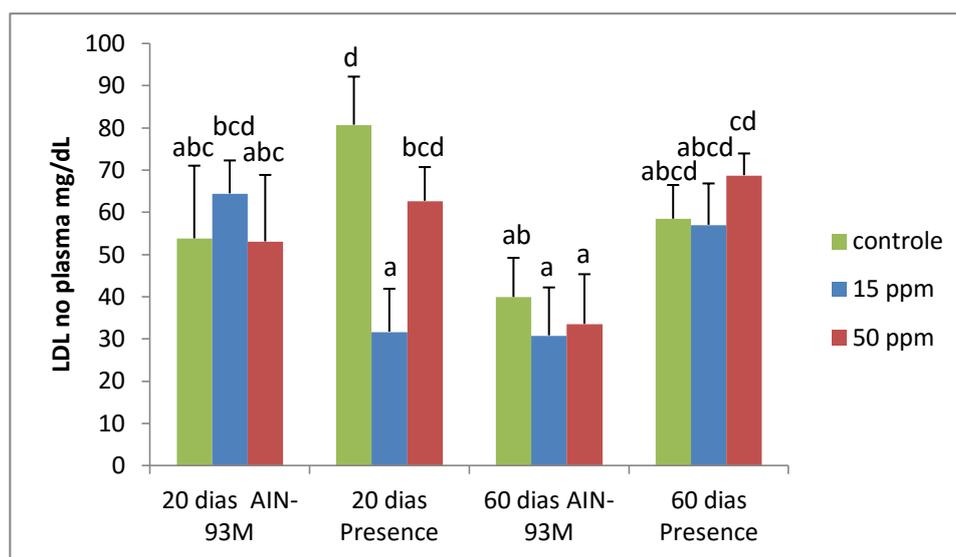


Figura 10 - Concentração média de LDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas

entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p < 0,05$). $n=6$.

5.1.3.5. *Análise VLDL*

A figura 11 mostra os valores da concentração média de VLDL, em mg/dL, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de VLDL ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $18,4 \pm 2,2$, $7,6 \pm 1,3$ e $8,6 \pm 0,3$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $30,5 \pm 9,3$, $30,8 \pm 11,4$ e $33,5 \pm 11,8$ mg/dL, respectivamente. As concentrações médias de LDL ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram: $24,9 \pm 6,2$, $27,6 \pm 5,6$ e $23,2 \pm 5,7$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente, em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $14,5 \pm 3,1$, $19,7 \pm 3,4$ e $12,3 \pm 2,2$ mg/dL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou que não houve diferença significativa entre as dietas ($F=0,001$, $p < 0,955$), nem entre as concentrações de F ($F=1,076$ $p=0,347$) ou entre os tempos experimentais ($F=0,367$, $p=0,546$), mas houve interação entre ração e tempo ($F=7,001$, $p=0,002$) e interação entre ração e tempo ($F=89,683$, $p < 0,001$), mas não entre dosagem de F e tempo ($F=0,611$, $p=0,545$) e com interação entre ração, tempo e dosagem de F ($F=0,817$, $p < 0,446$).

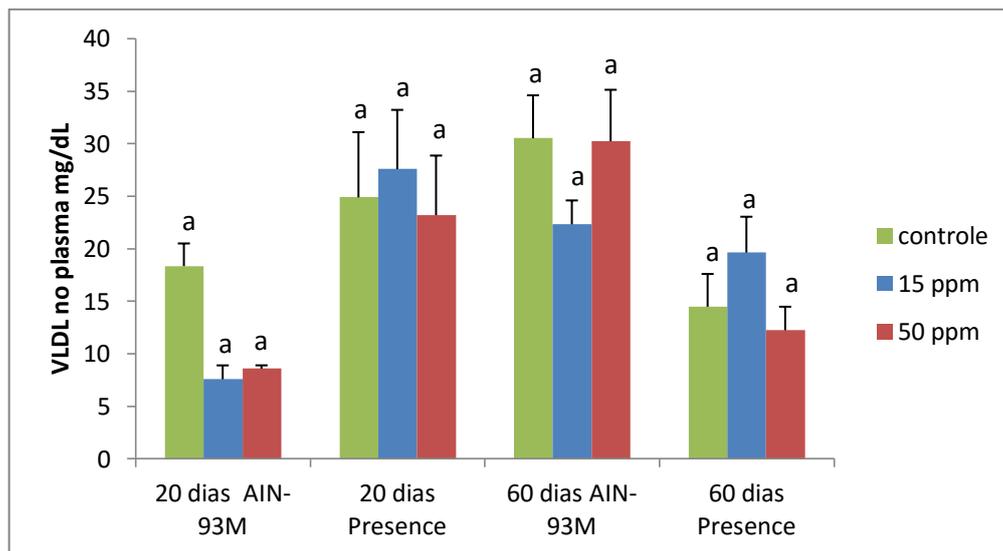


Figura 11- Concentração média de VLDL nas amostras de plasma (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p < 0,05$). $n = 6$.

5.1.4. Análise de triglicerídeos no fígado

A figura 12 mostra os valores da concentração média de triglicerídeos (em mg/g) encontrada no fígado, em função da concentração de F administrada por meio da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As concentrações médias de triglicerídeos ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram $6,4 \pm 2,9$, $7,7 \pm 2,9$ e $6,2 \pm 1,4$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $8,7 \pm 2,5$, $9,2 \pm 1,9$ e $6,9 \pm 1,0$ mg/dL, respectivamente. As concentrações médias de triglicerídeos ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $8,8 \pm 1,2$, $3,7 \pm 0,7$ e $4,3 \pm 1,0$ mg/dL para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $7,6 \pm 1,5$, $7,7 \pm 2,0$ e $10,6 \pm 2,5$ mg/dL, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios não observou diferença significativa entre as dietas ($F = 0,55$, $p = 0,45$) nem entre as concentrações de F ($F = 1,13$, $p = 0,33$), mas encontrou para os tempos experimentais ($F = 20,06$,

$p < 0,001$), com interação entre ração e tempo ($F = 208,32$, $p < 0,001$), entre ração e dosagem de F ($F = 3,31$, $p = 0,04$) e entre ração, tempo e dosagem de F ($F = 6,86$, $p = 0,002$).

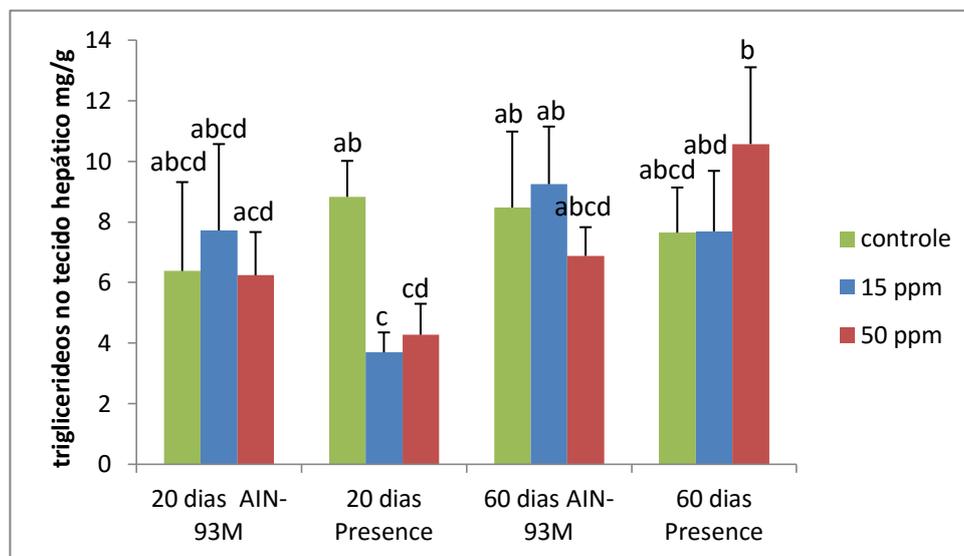


Figura 12- Concentração média de triglicerídeos nas amostras de fígado (mg/dL) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento e concentrações de F, respectivamente (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p < 0,05$). $n = 6$.

Com base nesses resultados podemos observar que, para o perfil lipídico, os grupos tratados por 20 dias (41 dias de vida), as alterações foram mais pronunciadas para vários parâmetros. Isto pode estar relacionado ao curto período de tratamento, sendo que os animais podem não ter conseguido se reestruturar, permitindo a detecção das diferenças, as quais foram menos pronunciadas quando o tratamento foi realizado por 60 dias, como relatado em outro estudo (Dabrowska et al., 2006). Quando o F foi administrado na maior concentração, na presença da dieta controle, foi capaz de melhorar o perfil lipídico, o que pode ser constatado pelo aumento do HDL e diminuição do colesterol e TGA do grupo tratado com 50 mgF/L F em relação ao controle, sendo este fenômeno dependente do tempo de administração. Outro trabalho recente

também observou essa redução do HDL no plasma de coelhos tratados com doses crônicas de F (50 e 100 mg F/L), mas em contrapartida foi observado um aumento do LDL e de acordo com o autor o aumento do HDL é uma forma de compensar o aumento do LDL, com o intuito de suavizar (Sun, Gao *et al.*, 2014). Quando há interferência da dieta, ou seja, administração de uma ração hipercalórica, observamos uma diminuição no TGA no plasma. Isto era esperado, já que no histológico foi observada uma diminuição das inclusões lipídicas para os grupos tratados. A redução do TGA pode ser relacionada ao estresse oxidativo que o F causa no retículo endoplasmático, o qual pode ser constatado pelo aumento da GRP 78, que por sua vez inibe a via da produção de TGA, o que leva à redução de VLDL e LDL, os quais são frações do TGA e colesterol (Pereira; Leite *et al.*, 2013). Em relação ao TGA no fígado, apesar de ter sido observada uma redução nos grupos tratados em relação ao controle, esta não foi estatisticamente significativa. Porém houve diferença quando comparadas as rações no período de 20 dias, com menor concentração de TGA quando administrada a ração Presence. Isto vem de acordo com o que foi observado na análise histológica, que indicou uma presença menor de inclusões lipídicas no fígado comparado com a ração AIN-93M.

Foi observada uma alteração no grupo de 15 mgF/L F para o TGA, onde ocorreu um aumento para o grupo de 60 dias tratado com a ração Presence bem como para o VLDL, enquanto que para o grupo de 20 dias que recebeu o mesmo tratamento, houve uma redução no LDL. Porém, com os dados que dispomos no momento e de acordo com a literatura vigente, não foi possível explicar estas alterações. Mesmo assim, supomos que o organismo provavelmente não reconheça as concentrações plasmáticas de F oriundas do tratamento com água contendo 15 mgF/L F como tóxicas e, possivelmente pode ainda não ter se adaptado a esta ingestão de F aumentada. Por este motivo, são observadas alterações diferentes daquelas observadas na maior concentração de F.

Estes resultados indicam que o F pode interferir no metabolismo de lipídeos e que sua ação parece ficar mais acentuada quando maior for o tempo de exposição e maior a idade do animal. Trabalhos recentes vêm sugerindo esta ação do F no metabolismo de lipídios, gerando desta forma uma dislipidemia

(Chiba Fy, Garbin Cas *et al.*, 2015; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015). Ratos tratados com 25 mgF/Kg por 4 semanas têm um aumento significativo de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL, além de uma redução no HDL (Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015). Quando ratos castrados foram tratados por 42 dias com água contendo 55 mgF/L NaF, houve um aumento de TG, colesterol total e VLDL, sem alteração no HDL e LDL (Chiba Fy, Garbin Cas *et al.*, 2015). Assim, essa atuação do F no metabolismo de lipídios vem se mostrando importante e está intimamente ligada ao estresse oxidativo que o F pode provocar.

5.1.5 Peso dos animais e fígado

5.1.5.1. Peso dos animais

A figura 13 mostra os valores média do peso dos animais, em função da concentração de F administrada, em animais tratados durante um período de 20 e 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

Os pesos médios (\pm DP) encontrados para os grupos que receberam a dieta AIN-93M foram 125,50 \pm 16,49, 125,167 \pm 11,86 e 138,66 \pm 9,39 g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Para o período de 60 dias as concentrações médias do peso (\pm DP) encontradas foram: 277,27 \pm 27,32, 282,60 \pm 36,99 e 278,38 \pm 37,81 g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente. Para o grupo que recebeu a dieta Presence, as concentrações médias do peso (\pm DP) encontradas foram 133,89 \pm 4,87, 139,62 \pm 30,74 e 134,25 \pm 3,24 g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. As concentrações médias do peso (\pm DP) encontradas foram 270,82 \pm 44,65, 291,92 \pm 39,94 e 288,01 \pm 46,13 g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 60 dias. A ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa apenas entre os tempos de tratamento ($F=293,39$, $p=0<0001$), mas não entre as concentrações de F ($F=1,07$, $p=0,35$), bem como para a dieta ($F=0,14$, $p=0,70$), sem interação significativa entre ração e dosagem de F ($F=0,68$, $p=0,51$), ração e tempo ($F=0,64$, $p=0,43$), dosagem de F e tempo ($F=0,34$, $p=0,71$) e também não se observou interação entre ração, dosagem de F e tempo ($F=0,30$, $p=0,74$).

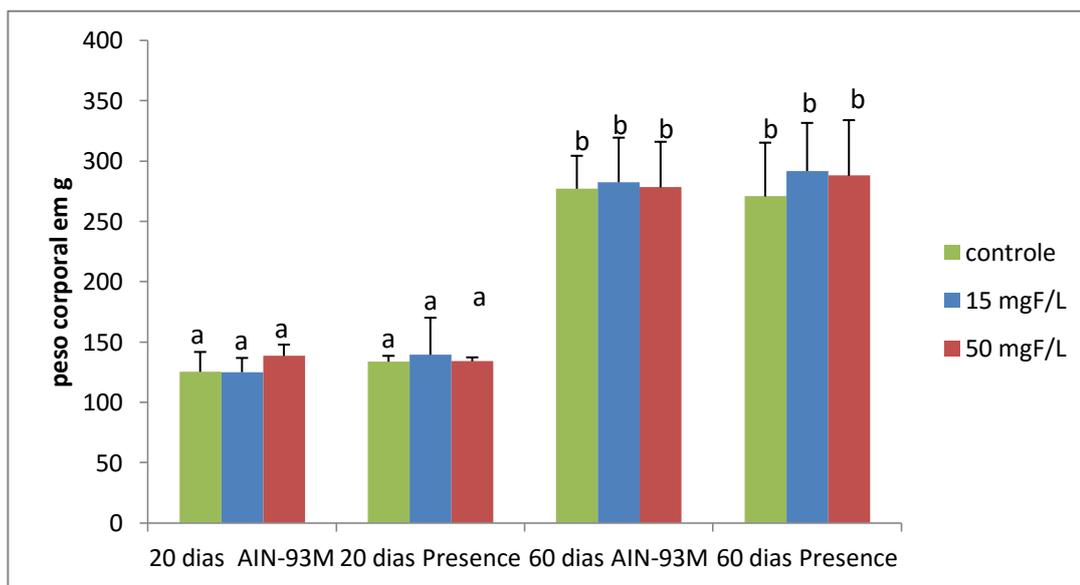


Figura 13 – Peso corporal médio (g) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p < 0,05$). $n=6$.

5.1.5.2 Peso dos fígados

A figura 14 mostra os valores da concentração média do peso do fígado, em g, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

Os pesos médios ($\pm DP$) encontrados para o fígado dos animais que receberam a dieta AIN-93M foram: $7,17 \pm 0,98$, $6,83 \pm 1,17$ e $7,16 \pm 1,72$ g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $10,11 \pm 2,74$, $11,29 \pm 2,01$ e $10,50 \pm 1,38$ g, respectivamente. Os pesos médios do fígado ($\pm DP$) encontrados para os animais que receberam a dieta Presence foram $5,44 \pm 0,33$, $5,45 \pm 0,70$ e $5,38 \pm 0,23$ g para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $8,55 \pm 1,68$, $9,86 \pm 1,29$ e $10,5 \pm 0,85$ g, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as

dietas ($F=9,52$, $p=0,003$), entre os tempos experimentais ($F=95,341$, $p<0,001$) mas não entre as doses de F ($F=1,31$ $p=0,28$), e não indicou interação entre ração e tempo ($F=0,05$, $p=0,81$), entre ração e dosagem de F ($F=0,24$; $p=0,78$), interação entre dosagem de F e tempo ($F=1,21$, $p=0,33$), assim como interação entre ração, tempo e dosagem de F ($F=0,14$, $p=0,86$).

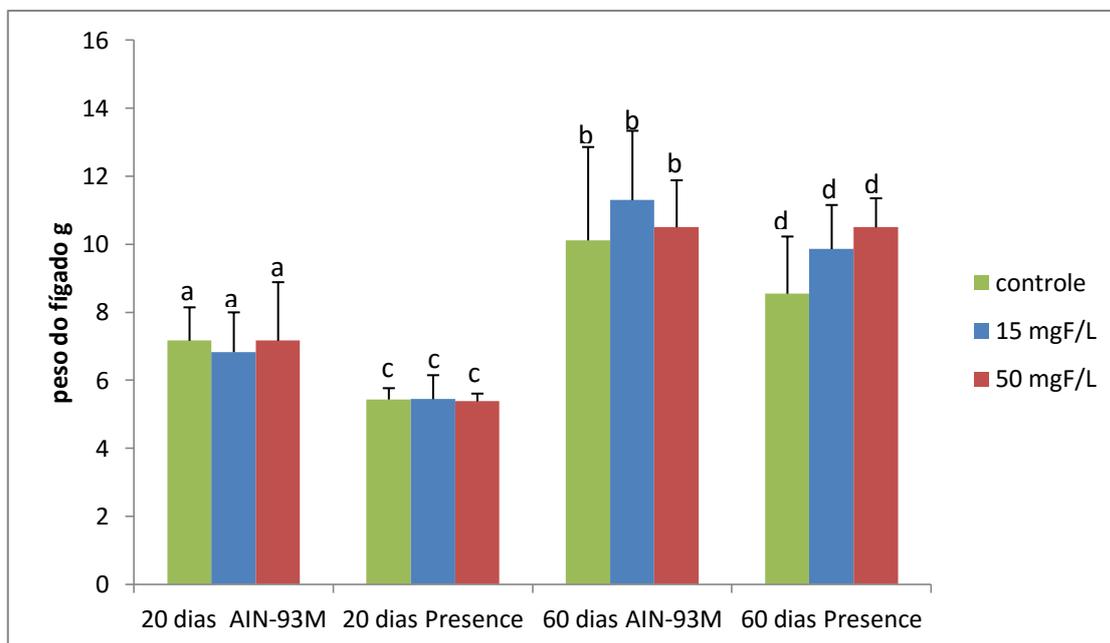


Figura 14 – Peso médio (g) do fígado dos de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de tratamento (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p<0,05$). $n=6$.

5.1.5.3. Relação peso corporal/peso do fígado

A figura 15 mostra os valores médios da razão entre o peso corporal e o peso do fígado, em função da concentração de F administrada através da água, nos animais tratados por 20 ou 60 dias com ração AIN-93M e Presence.

As razões médias ($\pm DP$) encontradas para os animais que receberam a dieta AIN-93M foram $17,652 \pm 2,46$, $18,63 \pm 2,90$ e $20,17 \pm 4,14$ grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos

valores para os grupos tratados por 60 dias foram $29,54 \pm 10,48$, $25,31 \pm 2,64$ e $26,62 \pm 2,59$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. As razões médias ($\pm\text{DP}$) encontradas para os animais que receberam a dieta Presence foram $24,64 \pm 0,96$, $25,48 \pm 2,94$ e $24,95 \pm 0,50$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L F, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os valores correspondentes para os grupos tratados por 60 dias foram $31,90 \pm 2,06$, $29,62 \pm 1,44$ e $27,41 \pm 3,67$, respectivamente. A ANOVA a 3 critérios observou diferença significativa entre as dietas ($F=11,35$, $p=0,001$), entre os tempos experimentais ($F=26,48$, $p<0,001$) mas não entre as doses de F ($F=0,312$ $p=0,73$), e não indicou interação entre ração e tempo ($F=3,09$, $p=0,08$), entre ração e dosagem de F ($F=1,24$; $p=0,29$), interação entre dosagem de F e tempo ($F=2,71$, $p=0,07$), assim como interação entre ração, tempo e dosagem de F ($F=0,33$, $p=0,71$).

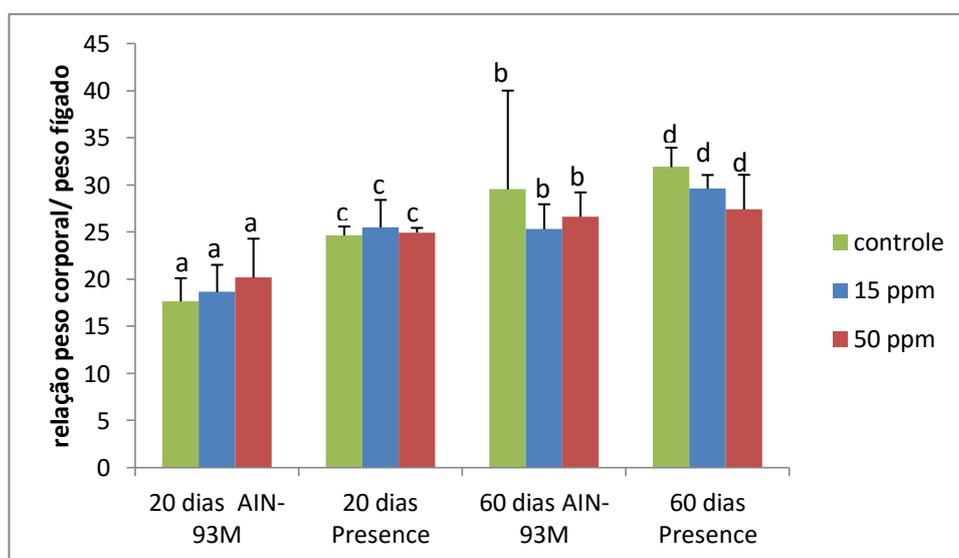


Figura 15 – Razão média entre peso corporal e peso do fígado de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de F, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 3 critérios e teste de *Tukey*, $p<0,05$). $n=6$. Barras indicam DP.

Para as análises relacionadas ao peso dos animais não foram observadas alterações em relação ao tratamento, apenas em relação ao período, o que era esperado uma vez que devido ao desenvolvimento normal do animal ocorre um

ganho natural de peso. Porém, nessa comparação podemos verificar que este crescimento natural ocorreu para todos os grupos, independente da dose de F administrada, similarmente ao relatado por outros trabalhos, que não observaram alteração no peso dos animais submetidos à administração de F por 60 dias (Carvalho, Leite et al, 2009; Iano, Ferreira et al., 2014). Entretanto, no trabalho de Shanthakumari et al. (2004), quando foi administrada uma concentração de 25 mgF/L F por 8 ou 16 semanas, os pesquisadores observaram uma diminuição do peso mediante o tratamento com o F, para ambos os períodos de tratamento. Assim, a literatura ainda é contraditória em relação às alterações de peso em função da administração de F. Para o peso do fígado não foi observada diferença em relação dos grupos tratados em relação ao controle; foi vista diferença apenas em relação ao período, o que já era esperado também, como já foi citado acima para o peso corporal, pois existe um crescimento natural dos animais, levando a um ganho de peso no órgão. Entretanto, em pesquisa recentemente publicada, foi observado um ganho de peso significativo no fígado para o grupo de animais que recebeu 15 mgF/L de F por 60 dias em relação ao controle (Iano, Ferreira et al., 2014), mas em nosso trabalho apenas houve alterações em relação ao tempo de exposição, o que foi relacionado ao crescimento natural dos animais. Já para a razão entre o peso corporal e o peso do fígado foi observado para os grupos tratados um aumento desta relação, porém a mesma não foi significativa, embora possa ser um indício de que, quando o F é administrado juntamente com uma dieta controle, pode provocar alterações no metabolismo do fígado. Outros trabalhos também observaram esse aumento em animais que receberam doses de 5 mgF/L ou 15 mgF/L, porém não para aqueles que receberam a dose de 50 mgF/L por 60 dias (Iano, Ferreira et al., 2014), diferente do que foi observado em nosso trabalho. No nosso estudo as diferenças significativas se concentraram no tempo de tratamento, com dependência do tipo de dieta. Apesar de reconhecer que existe uma diferença do peso dos animais oriunda da idade dos mesmos, as comparações feitas são relevantes, pois em trabalhos anteriores foi observado que o F tem um efeito diferente dependendo do tempo de exposição bem como da idade dos animais no momento da exposição e isto está relacionado a diferenças no metabolismo do mesmo e a um processo de adaptação que ocorre

no fígado (Dąbrowska, Letko et al.2006). Em virtude disto propusemos, em nosso trabalho, comparar animais com idades diferentes no momento da exposição ao F, já que a administração deste íon através da água de beber ocorre em muitas regiões do Brasil de forma controlada como em Bauru (Ramirez et al., 2006) e de forma endêmica como na Paraíba, o que também é observado em outros países como na Índia. Portanto, estudos com modelos experimentais que venham a contemplar doses bem como tempo e idade de exposição são de grande relevância (Susheela, 1999) porque ajudam a entender melhor a ação do F no organismo. Em adição, a comparação dos grupos de 20 e 60 dias é importante, uma vez que o objetivo do trabalho é verificar a ação do F para dois períodos de tratamentos com animais de idades diferentes, com o intuito de verificar se existe um processo de adaptação do fígado ao F devido ao tempo de exposição, bem como à idade dos animais.

5.1.6. Western Blotting: GTP78, Erp29, Apo-E, SOD2 e SREBP

A figura 16 mostra os *blots* e o gráfico da densitometria realizados para todos os grupos, sendo que para cada grupo foi utilizado um n=6. A densitometria foi analisada utilizando o *software* Image Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixel individuais para cada banda e o mesmo foi normalizado a partir das bandas da proteína constitutiva. A análise estatística ANOVA ou Kruskal-Wallis foi realizada para cada grupo (AIN-93M 20 dias, AIN -93M 60 dias, Presence 20 dias e Presence 60 dias).

Para o Grupo AIN-93M 20 dias, o teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferença significativa (KW=10,649, p=0,005) e o teste de Dunn revelou um aumento da expressão da GRP78 apenas no grupo de 50 mgF/L em comparação ao controle e ao grupo de 15 mgF/L F. Para a Apo-E, o teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferença significativa (KW=11,021, p=0,004) e o teste de Dunn mostrou uma redução para os grupos experimentais em relação ao controle. Para a Erp29 foi observado um aumento dose-resposta, mas apenas o grupo 50 mgF/L F diferiu do controle (KW=11,489, p= 0,0032). A SOD2 teve um aumento significativo para os grupos experimentais em relação ao controle (KW=7,614, p=0,0222).

Já para o Grupo Presence 20 dias, a ANOVA encontrou diferença significativa para a expressão da GRP78 ($F=10,649$, $p=0,005$) e o teste de *Tukey* indicou que apenas o grupo 50 mgF/L diferiu do grupo controle e 15 mgF/L F. Apesar de se observar uma dose-resposta, o aumento não foi significativo para o grupo 15 mgF/L F em relação ao controle. Para a Apo-E, a ANOVA encontrou diferença significativa ($F=11,021$, $p=0,004$) e o teste de *Tukey* indicou diferença do grupo 15 mgF/L F em comparação ao controle. A ANOVA encontrou diferença significativa para a Erp29 ($F=11,489$, $p=0,0032$) e SOD2 ($F=7,614$, $p=0,0222$) e o teste de *Tukey* indicou um aumento significativo para o grupo 50 mgF/L F em relação ao grupo de 15 mgF/L F.

Para o Grupo AIN-93M 60 dias, a ANOVA não encontrou diferença na expressão da GRP78 e ERP29, mas indicou diferença para a Apo-E ($F=11,016$, $p=0,0041$) sendo que o teste de *Tukey* mostrou diferença apenas do grupo 50 mgF/L F para o controle apesar de se observar um efeito dose-resposta. Para a SOD2 a ANOVA também observou diferença significativa e o teste de *Tukey* revelou um efeito dose-resposta com aumento da expressão da SOD2 de acordo com o aumento da dose de F administrada.

Para o Grupo Presence 60 dias o teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferença significativa e o teste de *Dunn* revelou um aumento da expressão da GRP78. Apesar de se observar um efeito dose resposta, apenas houve diferença significativa entre o grupo 50 mgF/L e o controle. Para a Apo-E, o teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferença significativa e o teste de *Dunn* revelou uma redução significativa para grupo 15 mgF/L em relação ao controle ($KW=11,726$, $p=0,0028$). Já para a Erp29 foi observado um aumento dose-resposta, mas apenas o grupo 50 mgF/L diferiu do controle ($KW=10,182$, $p=0,0062$). A SOD2 teve um aumento significante para o grupo 15 mgF/L em relação ao controle ($KW=10,182$, $p=0,006$).

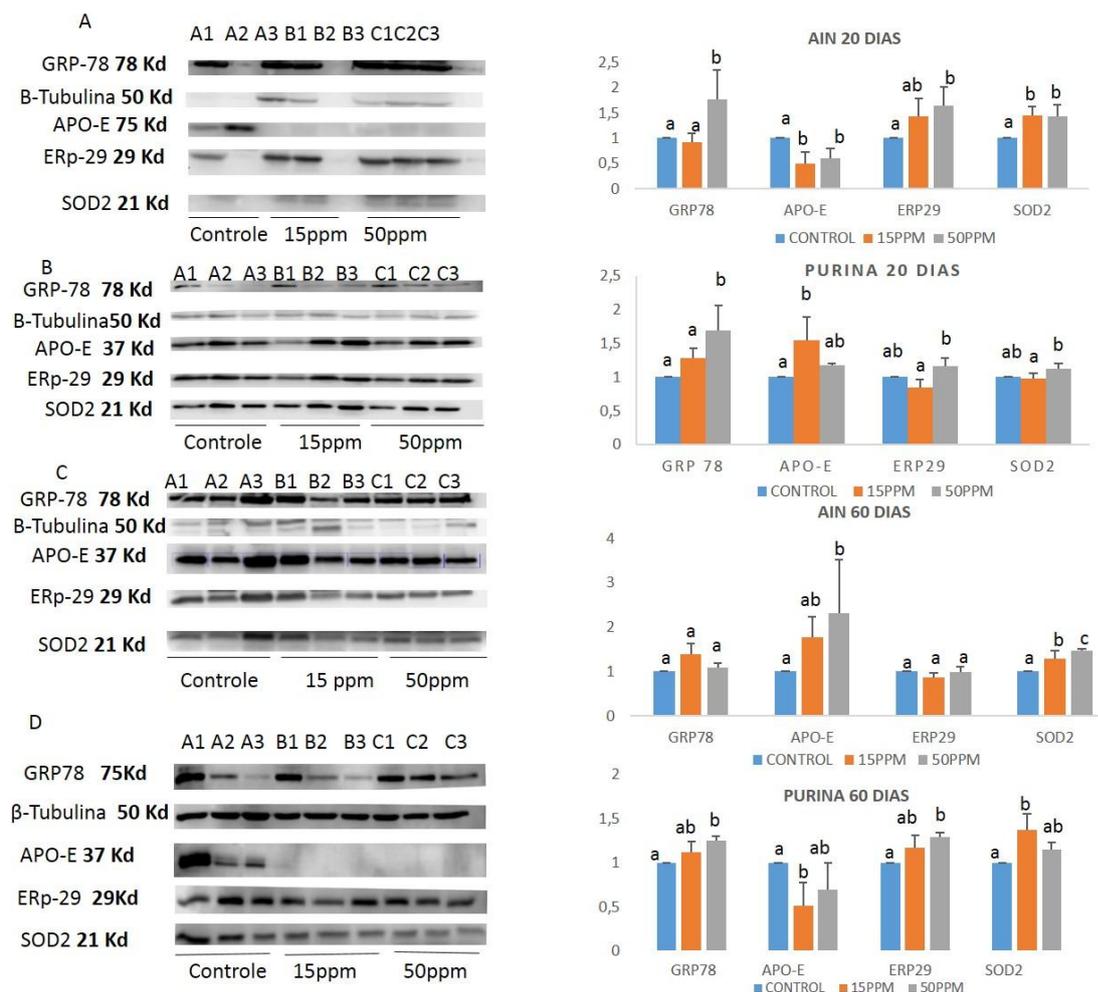


Figura 16 – Expressão das proteínas GRP78, Apo-E, SOD2 e Erp29 e da constitutiva β -tubulina em amostras individuais dos animais de cada grupo ($n=6$) e análise de densitometria. **A)** Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo AIN-93M tratados por 20 dias; **B)** Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo Presence tratados por 20 dias; **C)** Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo AIN-93M tratados por 60 dias. **D)** Expressão das proteínas em fígado de ratos no grupo Presence tratados por 60 dias. A Densitometria foi analisada utilizando o *software* Image Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixel individuais ($n=6$). Barras verticais representam desvio padrão. $n=6$.

A Figura 17 mostra a expressão da SREBP. Para o Grupo AIN- 93M 20 dias, o teste de anova indicou diferença significativa ($F=5.330$, $p=0,019$) e o teste de *Tukey* revelou um aumento da expressão da SREBP apenas no grupo de 15 mgF/L F em comparação ao controle. Já para o Grupo Presence 20 dias, a ANOVA encontrou uma redução significativa para a expressão da SREBP ($F=6,165$, $p=0,012$) e o teste de *Tukey* indicou que apenas o grupo 50 mgF/L F diferiu do grupo controle. Para o Grupo AIN-93M 60 dias, a ANOVA encontrou diferença na expressão da SREBP ($F=6,539$, $p=0,009$) com um aumento no grupo 50 mgF/L F em relação ao controle e ao 15 mgF/L F. Para o Grupo Presence 60 dias o teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferença significativa ($KW=9,195$, $p=0,010$) e o teste de *Dunn* revelou redução da expressão da SREBP no grupo 50 mgF/L F em relação ao controle.

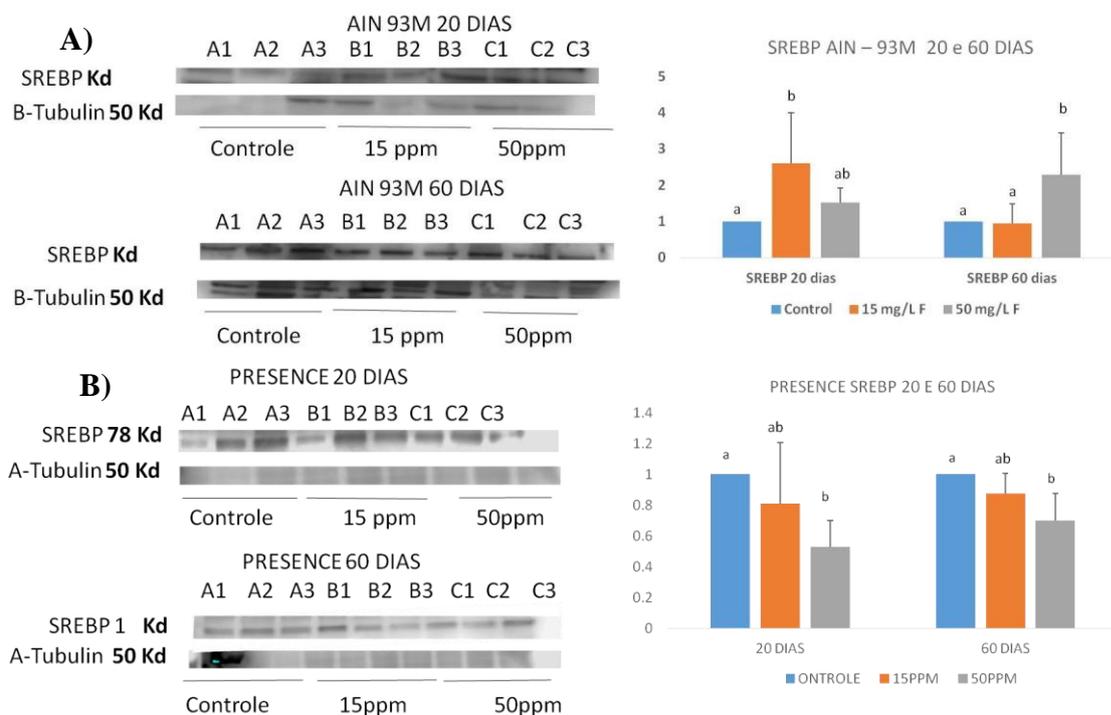


Figura 17. Expressão da SREBP em amostra individuais e da constitutiva α -tubulina ou β -tubulina dos animais de cada grupo ($n=6$) e a análise de densitometria. **A)** Expressão da SREBP em fígado de ratos no grupo AIN 93M tratados por 20 dias e por 60 dias **B)** Expressão da SREBP em fígado de ratos no

grupo AIN 93M tratados por 20 dias e 60 dias. A Densitometria foi analisada utilizando o *software* Image Studio Lite, o qual gera um valor referente à soma das intensidades de pixel individuais (n=6). Barras verticais representam desvio padrão. n=6.

Os dados referentes às análises de *Western Blotting* nos permitem sugerir que o F pode provocar estresse no retículo endoplasmático, independentemente do tempo de exposição, já que a GRP78 e a ERP29 aumentaram nos grupos experimentais quando os animais foram tratados com a dieta normocalórica. Porém, quando foi utilizada a dieta hipercalórica, esse aumento só ocorreu para o período de 20 dias. Aumento da GRP78 também foi observado em outra pesquisa que utilizou 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, Jiang et al., 2013). Para o grupo da AIN-93M não foi observado esse aumento para o grupo de 60 dias, possivelmente devido ao fato da dieta por si só provocar um estresse devido à alta quantidade de carboidrato, que leva a um acúmulo de triacilgliceróis no fígado e acaba por levar ao estresse oxidativo (Kammoun, Chabanon et al., 2009). Isso pode ser verificado pelo aumento da SOD2 em ambos os períodos, independentemente da dieta, indicando esse estresse oxidativo. Possivelmente, devido ao fato de o fígado ter se adaptado a essa ação no tempo de 60 dias, não houve alteração na GRP78 nem na ERP29. Em relação à Apo-E foi observada uma redução nos grupos experimentais para a dieta hipercalórica no período de 20 dias. Para a dieta normocalórica, para o período de 60 dias e para o período de 20 dias foi observado um aumento para o grupo 15 mgF/L e para o período de 60 dias do grupo que recebeu a ração hipercalórica houve um aumento mais pronunciado para o grupo 50 mgF/L. Isto sugere que o F pode aumentar a expressão desta proteína, que está envolvida no transporte de lipídios. Assim sua redução diminui este transporte e essas alterações estão associadas ao tempo, bem como à dieta administrada. Alterações em proteínas de transporte de lipídios podem provocar uma disfunção no metabolismo de lipídios (Pejic, Lee et al., 2006); logo essas alterações podem estar relacionadas às alterações que podemos observar no perfil lipídico.

A expressão da SREBP parece reduzir quando a GRP78 aumenta sua expressão nos grupos experimentais, como foi observado no grupo que recebeu a dieta hipercalórica por 20 dias e também nos grupos que receberam a dieta normocalórica, independente do período. Esses dados estão de acordo com o que vem sendo relatado na literatura, que indica que a GRP78 pode inibir a SREBP. Este fato pode também estar relacionado à redução da esteatose no grupo de 50 mgF/L que foi tratado com uma dieta hipercalórica por 20 dias. A GRP78 é uma proteína de homeostase, cujo aumento inibe as SREBPs, as quais, por sua vez, são responsáveis pela ativação da síntese de TGA através da conversão de Acetil CoA e outros precursores no fígado (Kommoun, Chabanon et al, 2009; Tacer, Rozman, 2011). Logo a sua inibição reduz a produção de TGA no fígado, o que reduz as inclusões lipídicas. No entanto, como há uma redução na conversão de Acetil CoA, esta acaba por se acumular no fígado, gerando uma resposta que provoca a redução de Apo-E, que é uma proteína responsável pelo transporte de lipídios até o fígado para serem processados (Kockx, Dinnes et al., 2012). Desta forma, quando os animais são tratados com uma ração hipercalórica, a mesma provoca um aumento de Acetil CoA e conseqüentemente pode levar a uma inibição da Apo-E.

Os dados permitem-nos concluir que o F pode alterar o metabolismo hepático, sendo que estas alterações envolvem o metabolismo de lipídios. O possível mecanismo parece estar relacionado à inibição da Apo-E dependente do tempo, bem como do tipo de dieta administrada. Apesar de haver indícios de que o F provoca redução de antioxidantes, o mesmo não foi observado e sim um aumento, mas sim um aumento independentemente do tipo de dieta e do tempo experimental. Em contrapartida, foi observado um aumento de proteínas referentes ao estresse oxidativo no retículo endoplasmático, o que pode ser um indício de que as possíveis alterações nessas proteínas estejam relacionadas a um estresse nesta organela.

A Figura 18 é um esquema que sugere baseado nos resultados obtidos e descritos acima como o F pode agir para alterar o metabolismo de lipídio. Quando ocorre a administração de uma dieta normocalórica é observado um aumento do estresse oxidativo que leva a um aumento da GRP78, essa por sua vez pode

inibir a SREBP a qual tem uma redução na sua expressão, por se tratar de uma proteína que ativa a via da lipogênese *de novo* esta via fica menos ativa e desta forma ocorre uma menor da conversão de Acetil-CoA em triglicerídios dado esse confirmado pela redução do triglicerídios no fígado. No entanto quando foi administrada uma dieta hipercalórica nos também observamos o aumento da GRP78 embora a SREBP não tenha apresenta redução em relação ao grupo não tratado com o F. Em contrapartida foi observada uma redução da Apo-E indicando que a redução da presença de inclusões lipídicaas indicada pela análise histológica bem como no plasma pode se dar por essa redução uma vez que alterações nesta proteína indicam uma diminuição do transporte de lipídios até o fígado para serem metabolizado. Assim podemos sugerir que a ação do F no metabolismo de lipídio está ligada ao tipo de dieta administrada sendo ativados mecanismos diferentes de defesa contra a esteatose dependente do tipo de dieta.

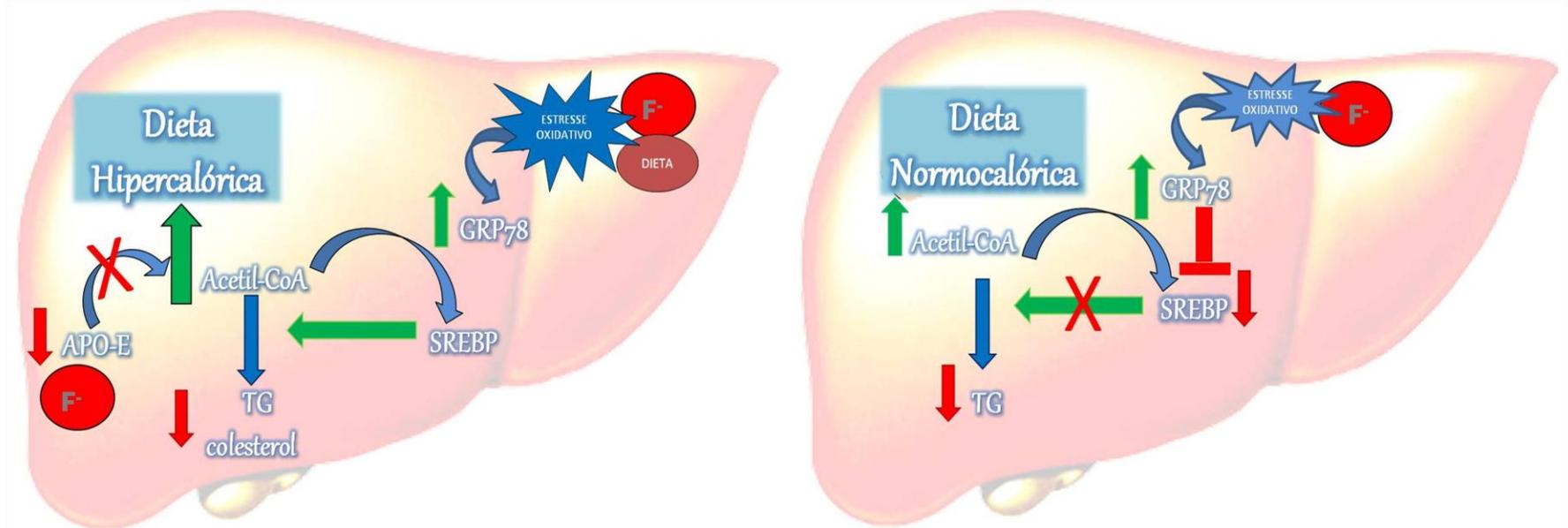


Figura 18: Esquema indicando um mecanismo para alteração no metabolismo de lipídio provocado pelo fluoreto e influenciado pelo tipo de dieta. **A-** O Fluoreto (F⁻) provoca o aumento do estresse oxidativo gerando o aumento da GRP78 que por sua vez inibe a SREBP que deixa de ativar a via de formação do triglicérides (TG). **B-** O F⁻ em conjunto com uma dieta hipercalórica aumenta o estresse oxidativo e leva ao aumento da GRP78 porém não altera a SREBP, no entanto o F⁻ reduz a Apo-E e conseqüentemente o transporte de precursores para formação do colesterol e TG.

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A DOIS PERÍODOS EXPERIMENTAIS E DOSES CRÔNICAS DE FLUORETO

5.2.1 Dosagens de fluoreto plasma e fígado

A figura 19 mostra os valores da concentração média de fluoreto encontrada no plasma, em função da concentração de fluoreto administrada, em animais tratados durante períodos de 20 e 60 dias, que receberam a ração Presence. As concentrações médias de fluoreto (\pm DP) encontradas foram: $0,006\pm 0,001$, $0,017\pm 0,007$ e $0,040\pm 0,007$ $\mu\text{g/mL}$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L fluoreto, respectivamente em animais tratados por 20 dias. Os respectivos valores para os grupos tratados por 60 dias foram $0,002\pm 0,004$, $0,017\pm 0,004$ e $0,053\pm 0,013$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A ANOVA a 2 critérios observou diferença significativa entre as concentrações de fluoreto ($F=33,067$, $p<0,0001$), 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 fluoreto administradas, embora tenha havido uma relação dose-resposta, apenas os animais tratados com 50 mm fluoreto tiveram concentrações plasmáticas deste íon significativamente maiores que os demais.

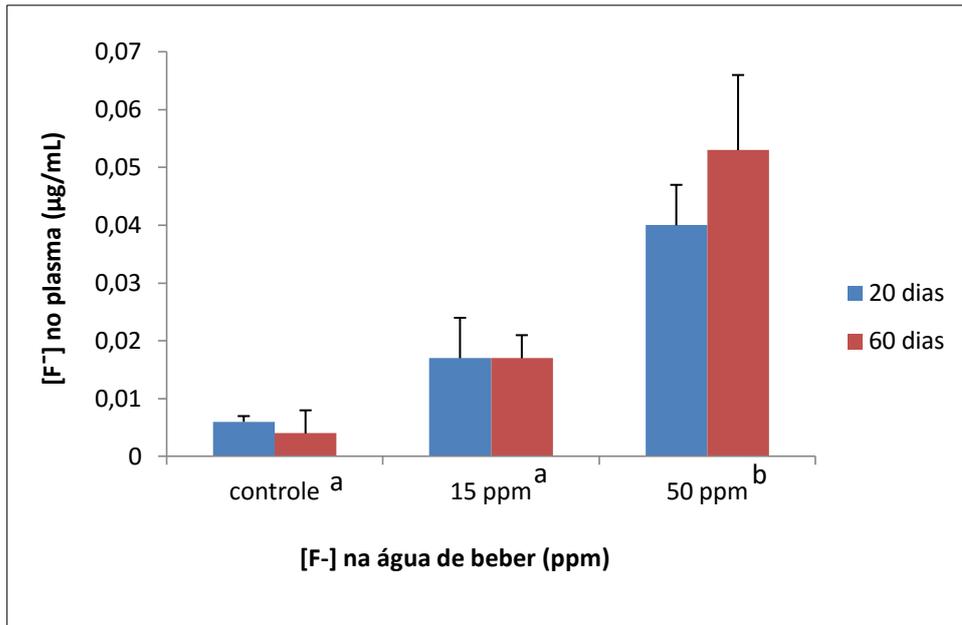


Figura 19 - Concentração média de fluoreto nas amostras de plasma ($\mu\text{g/mL}$) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n = 6$.

As concentrações médias ($\pm\text{DP}$) de fluoreto encontradas no tecido hepático, em animais tratados por um período de 20 dias foram, $0,003 \pm 0,001$, $0,005 \pm 0,001$ e $0,014 \pm 0,005$ $\mu\text{g/g}$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L fluoreto, respectivamente. Os respectivos valores para os animais tratados por 60 dias foram: $0,003 \pm 0,001$, $0,004 \pm 0,001$ e $0,012 \pm 0,002$ $\mu\text{g/g}$ para os grupos controle, 15 e 50 mgF/L fluoreto, respectivamente (Figura 20). Assim como observado para o plasma, a ANOVA a 2 critérios observou diferença significativa entre as concentrações de fluoreto ($F = 52,669$, $p < 0,0001$), mas não entre os tempos experimentais ($F = 2,400$, $p = 0,145$), sem interação entre ambos ($F = 1,375$, $p = 0,287$). Em relação às concentrações de fluoreto administradas, embora tenha havido uma relação dose-resposta, apenas os animais tratados com 50 mm fluoreto tiveram concentrações plasmáticas deste íon significativamente maiores que os demais.

Pereira (2011) em trabalho semelhante onde administrou cronicamente fluoreto nas concentrações de 0 mgF/L, 5 mgF/L e 50 mgF/L de fluoreto

observou uma dose-resposta nas amostra de plasma de animais tratados por 60 dias, assim como foi observado no presente trabalho. De acordo com a autora, esta dose-resposta confirma que o tratamento dos mesmos com água fluoretada foi efetivo. Porém neste caso não foi possível encontrar uma dose resposta com diferença significativa mas houve uma tendência muito forte para esse efeito.

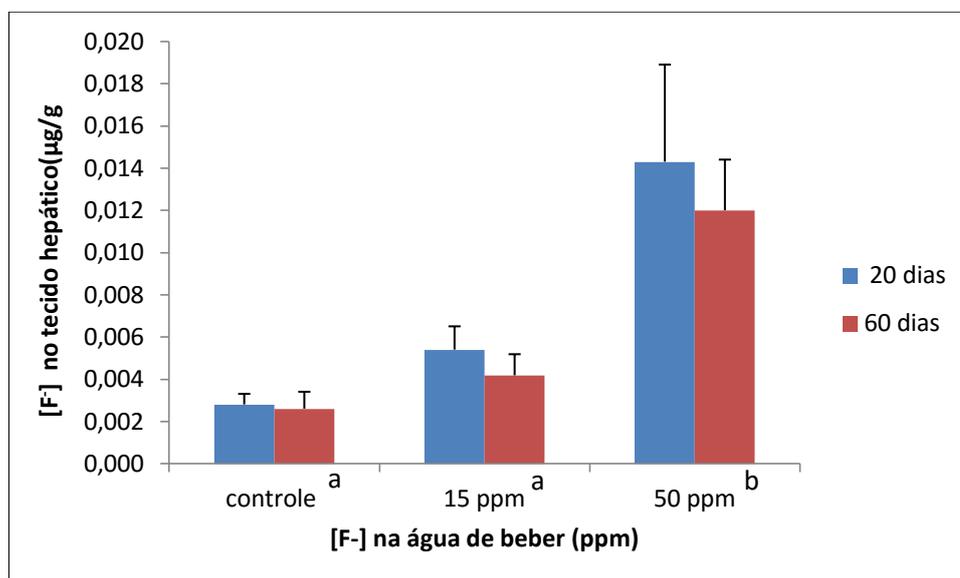


Figura 20 - Concentração média de Fluoreto nas amostras de fígado (µg/g de tecido hepático) de ratos tratados com água contendo diferentes concentrações de fluoreto, por 2 períodos (20 ou 60 dias). Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA a 2 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=6$.

Apesar de se observar uma tendência para a dose-resposta nas concentrações de fluoreto no tecido hepático, a diferença não foi significativa entre todos os grupos, como ocorreu para o plasma. Muitos autores em seus trabalhos também não observaram essa dose-resposta. Tsunoda et al. (2005) não encontraram diferença significativa entre as concentrações de fluoreto no tecido hepático do grupo controle quando comparado aos animais tratados com 5 mgF/L e 25 mgF/L de fluoreto através da água de beber durante um mês, sendo que só foi observado aumento significativo quando foi

administrada uma dose de 125 mgF/L de fluoreto. Pereira et al. (2013) também não observaram uma dose-resposta nas concentrações de fluoreto no tecido hepático de ratos tratados com 0 mgF/L e 5 mgF/L de fluoreto, somente tendo sido observado aumento significativo nestas concentrações quando os animais foram tratados com 50 mgF/L de fluoreto, de modo similar ao observado no presente estudo.

5.2.2 Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada com o grupo que recebeu a dieta Presence, uma vez que neste caso o objetivo do trabalho foi verificar se existiam alterações de expressão em proteínas em relação ao tratamento com o F, bem como ao tempo de administração, sem interferência da dieta, já que a dieta AIN-93M é hipercalórica e pode, por si só, alterar o metabolismo de lipídios.

Foram identificadas ao todo 1608 proteínas para os grupos dos animais que receberam a dieta Presence. A tabela 7 indica os números de proteínas que foram encontradas com alteração de expressão, enquanto que a tabela 8 mostra as proteínas exclusivas para cada grupo.

Tabela 7. Número de proteínas com alteração de expressão em cada comparação

Comparações	Número de proteínas com alteração de expressão
Controle 20 dias vs. Controle 60 dias	90
Controle 20 dias vs. 15mgF/L 20 dias	2
Controle 20 dias vs. 50 mgF/L 20 dias	12
Controle 60 dias vs 15 mgF/L 60 dias	34
Controle 60 dias vs. 50 mgF/L 60 dias	7
15 mgF/L 20 dias vs 15 mgF/L 60 dias	49
15 mgF/L 20 dias vs 50 mgF/L 20 dias	10
15 mgF/L 60 dias vs. 50 mgF/L 60 dias	15
50 mgF/L 20 dias vs. 50 mgF/L 60 dias	79

Tabela 8. Número de proteínas exclusivas encontradas em cada grupo.

Grupos	Número de proteínas exclusivas
Controle 20 dias	117
Controle 60 dias	87
15 mgF/L 20 dias	104
15 mgF/L 60 dias	94
50 mgF/L 20 dias	107
50mgF/L 60 dias	69

Esses dados indicam uma maior expressão de proteínas exclusivas para os grupos tratados por 20 dias em comparação àqueles tratados por 60 dias. Ainda ao comparar períodos de tratamento diferentes também podemos observar uma quantidade grande de proteínas com alterações de expressão. Esses dados indicam que os grupos tratados por 20 dias têm uma maior expressão de proteínas, o que pode estar relacionado ao fato dos animais serem jovens (com 41 dias de vida) e estarem em um período de grande desenvolvimento, o que implica em um alto metabolismo.

O diagrama de Venn (figura 21) permite uma visualização mais fácil das relações de alteração de expressão indicadas nas tabelas acima.

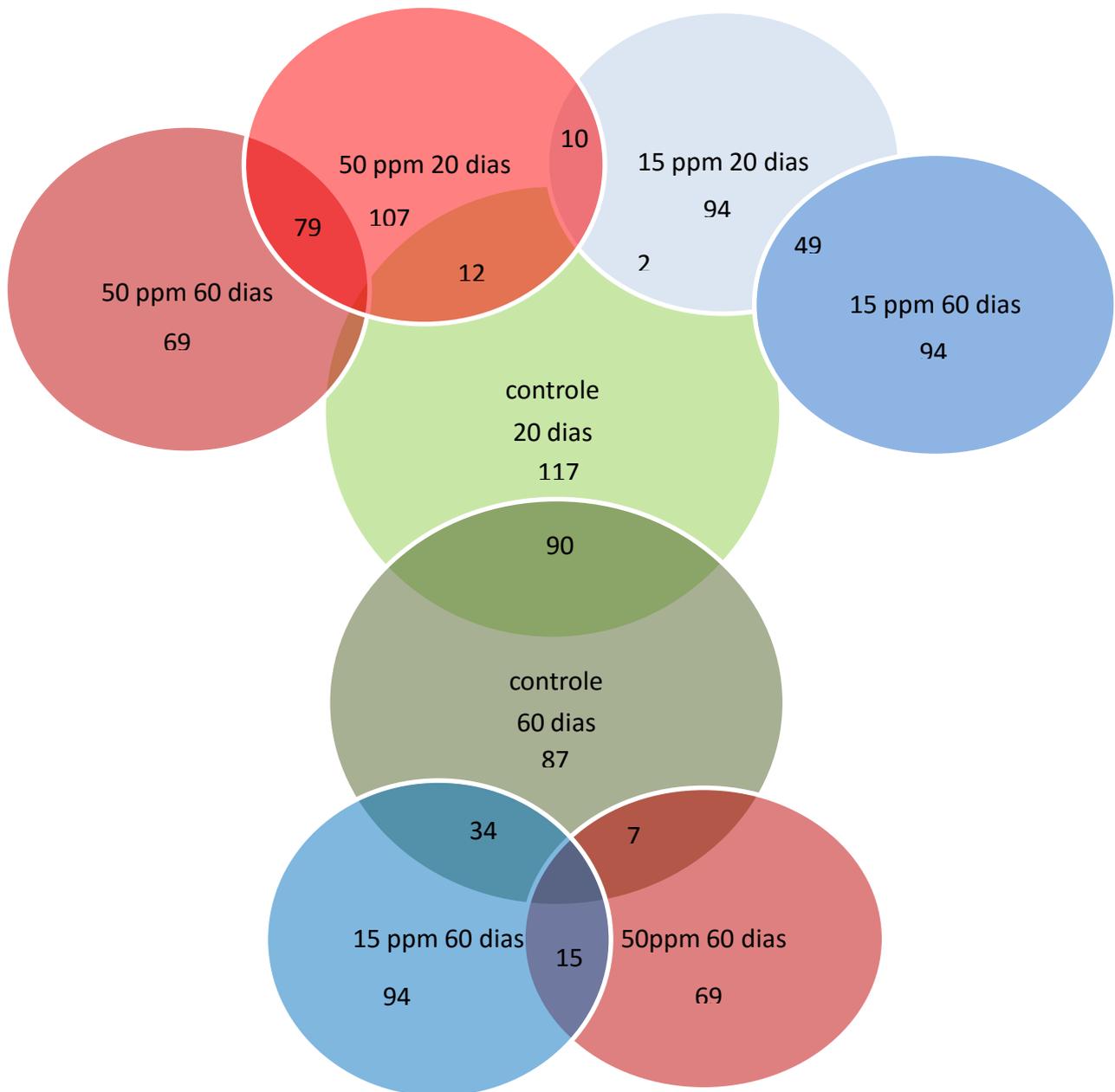


Figura 21. Gráfico de Venn mostrando os números de proteínas expressas em cada grupo.

As tabelas contendo todas as proteínas identificadas em cada grupo encontram-se no Anexo 2

Classificação funcional

Para cada comparação foi feita a classificação funcional, como descrito em matérias e métodos.

A figura 22 mostra o gráfico referente à comparação entre os grupos controle de 20 e 60 dias. Podemos observar que os termos com maiores porcentagens de genes associados estão relacionados ao desenvolvimento (desenvolvimento do fígado – 22% e desenvolvimento do tecido adiposo - 17%), bem como ao processo energético (processo metabólico do ATP – 20%). Estes aspectos estão coerentes, uma vez que, estamos comparando animais com idades diferentes. Assim os animais jovens estão em pleno desenvolvimento e desta forma possuem um aumento em proteínas relacionadas a estes aspectos.

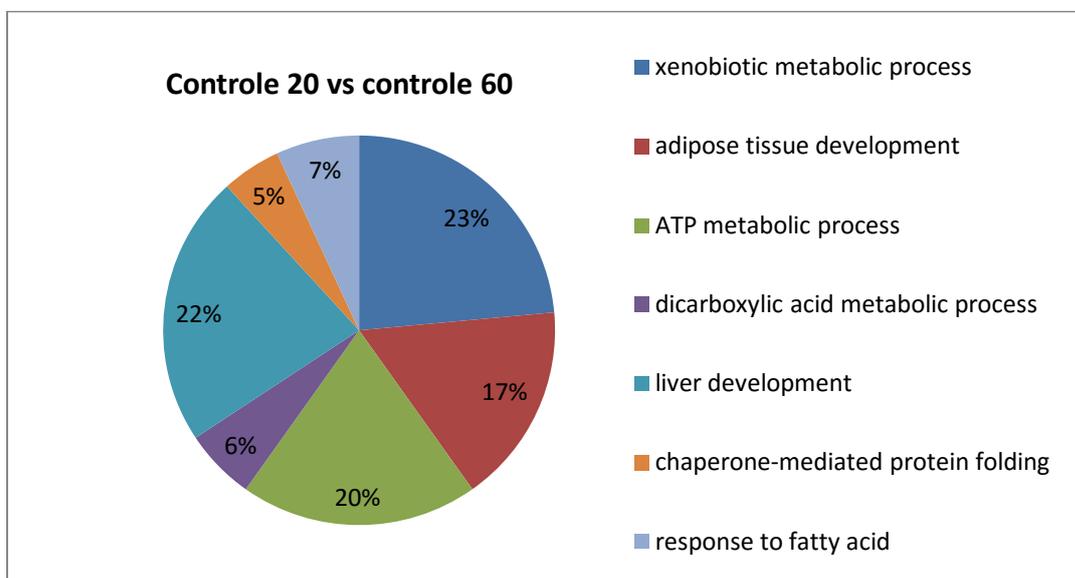


Figura 22. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle de 20 dias e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software* Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 23 mostra o gráfico referente à comparação entre os grupos controle e 15 mgF/L, no período de 20 dias. Podemos observar que o termo com maior porcentagem de genes associados está relacionado à fosforilação oxidativa (44%). Indicando que as alterações mais evidentes podem estar relacionadas a alterações na mitocôndria, bem como ao processo de produção energética.

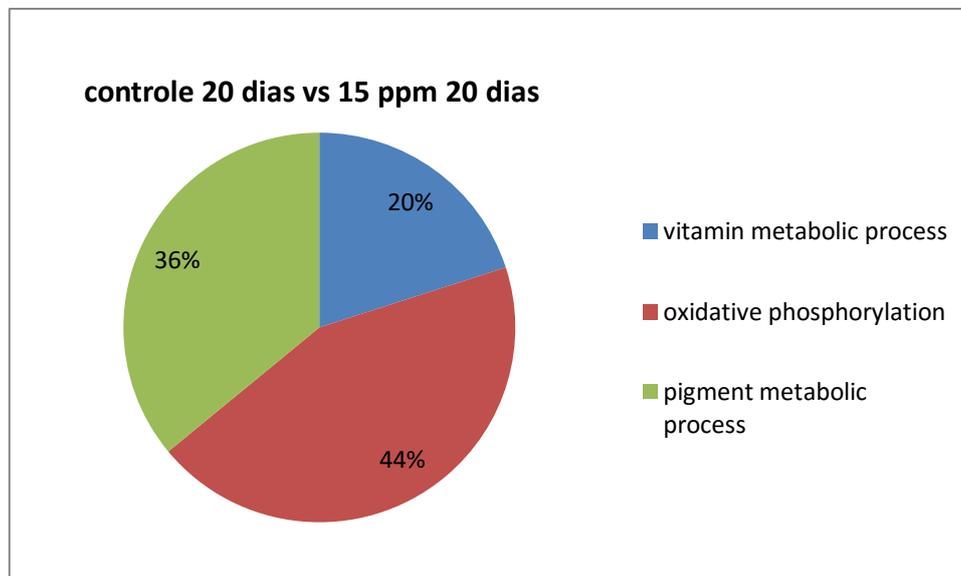


Figura 23. Análise funcional da comparação entre os animais do grupo controle e tratado com 15 mgF/L F por 20 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software Cytoscape® 3.0.2*. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 24 mostra o gráfico referente à comparação entre os grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por dias. Podemos observar que o termo com maior porcentagem de genes associados está relacionado à respiração celular (40%). Assim como foi citado anteriormente, esta alteração também pode estar relacionada a alterações na mitocôndria, bem como no processo energético.

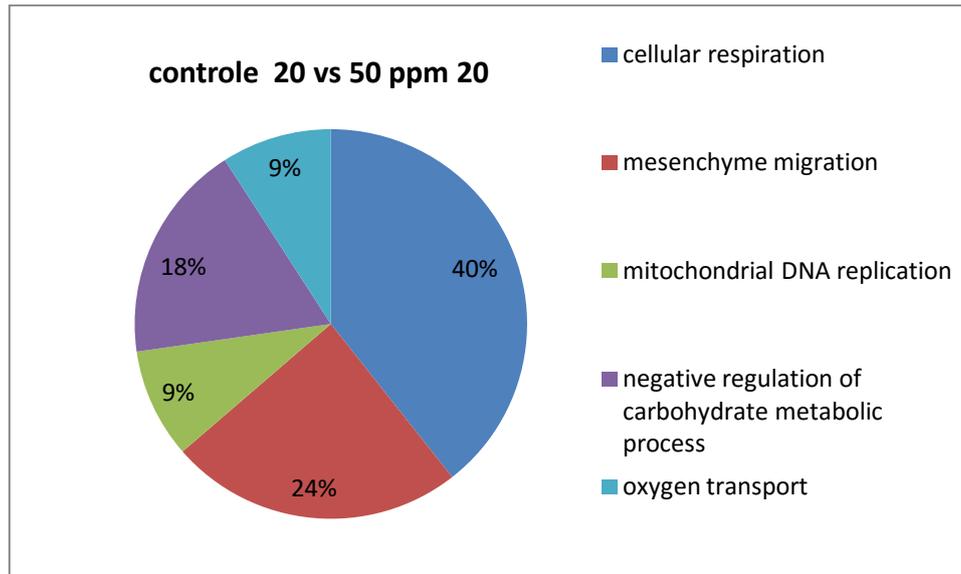


Figura 24. Análise funcional da comparação entre os animais do grupo controle e tratado com 50 mgF/L F por 20 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software Cytoscape® 3.0.2*. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 25 mostra o gráfico referente a comparação entre os grupos controle e tratado com 15 mgF/L F por 60 dias. Podemos observar que o termo com maior porcentagem de genes associados está relacionado ao metabolismo de aminoácidos (processo biossintético - 32%) e ao metabolismo de xenobióticos (32%). Estes termos podem indicar que o organismo está aumentando a defesa em relação à ação tóxica do F.

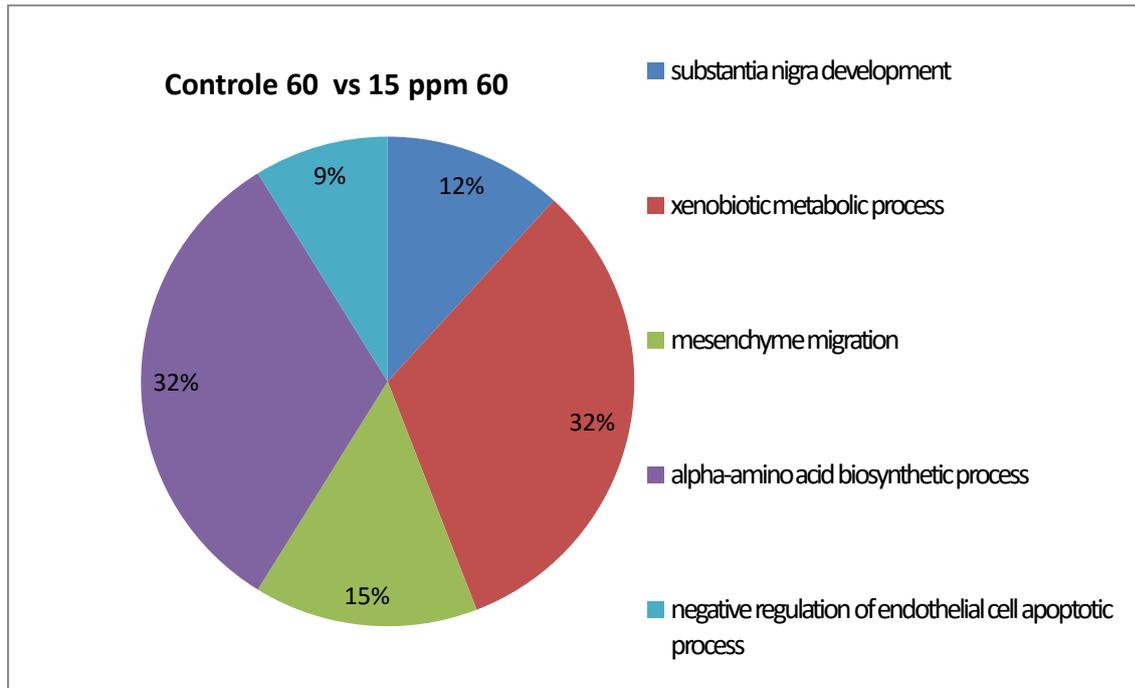


Figura 25. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 15 mgF/L F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software Cytoscape® 3.0.2*. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 26 mostra o gráfico referente a comparação entre os grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 60 dias. Podemos observar que neste caso apenas 2 termos foram relevantes, estando à fosforilação oxidativa (60%) e ao metabolismo de aminoácidos (metabolismo da glutamina - 40%). Como observado para a mesma comparação no período de 20 dias, estes dados indicam alterações no processo energético, relacionadas possivelmente a alterações na mitocôndria. Vários trabalhos indicam que o F altera proteínas relacionadas à mitocôndria (Pereira, Leite et al., 2013; Miltonprabu, Thangapandiyar, 2015), o que poderia interferir nos termos encontrados para essa comparação.

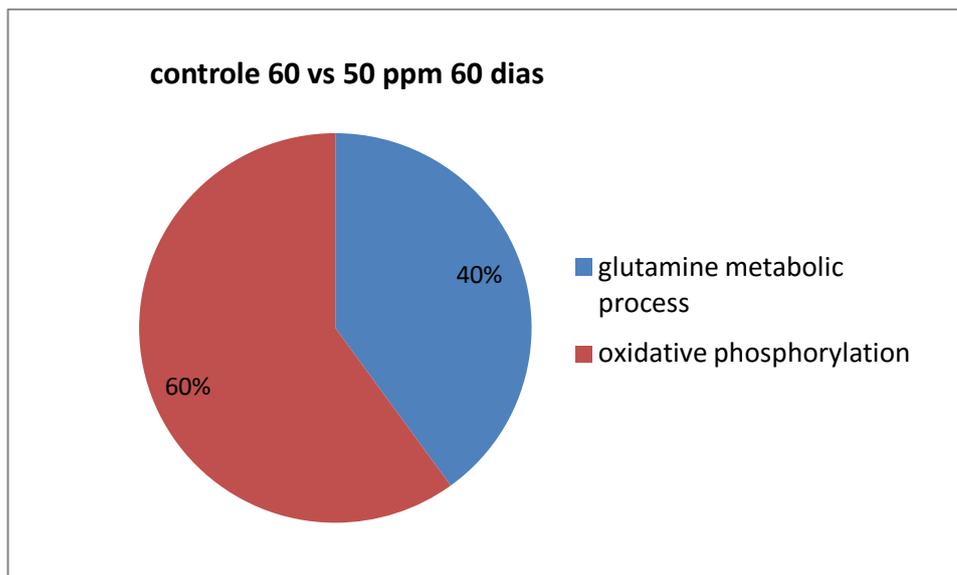


Figura 26. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo *software Cytoscape® 3.0.2*. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 27 mostra o gráfico referente a comparação entre os grupos tratados com 15 mgF/L F por 20 e 60 dias. Podemos observar que neste caso o termo com maior porcentagem foi o que estava relacionado ao processo catabólico de alfaaminoácidos (32%). Possivelmente esta alteração está relacionada ao desenvolvimento do animal. Também podemos observar alterações relacionadas à localização da mitocôndria (24%).

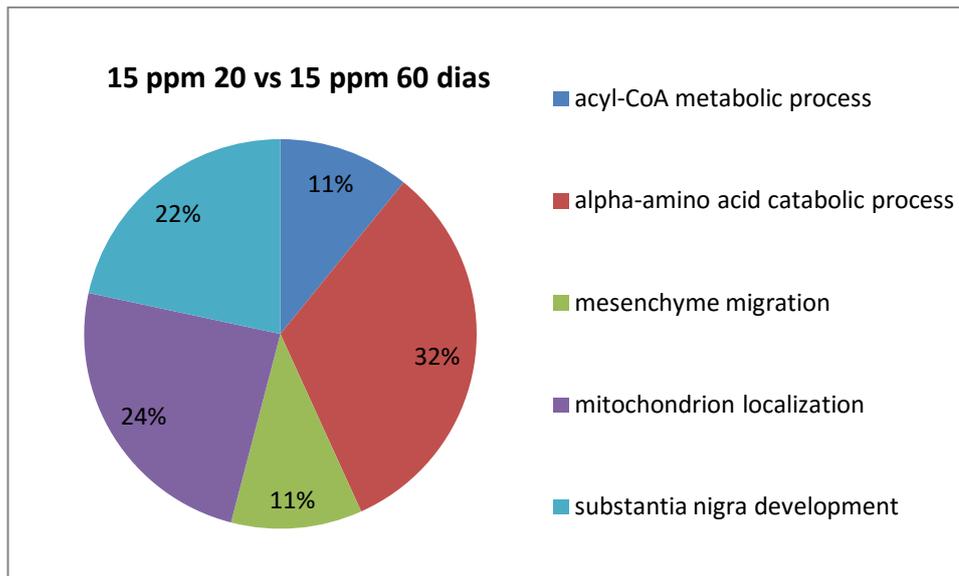


Figura 27. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 15 mgF/L F por 20 e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 28 mostra o gráfico referente à comparação entre os grupos tratados com 15 e 50 mgF/L F por 20 dias. O termo com maior porcentagem de genes associados foi estava relacionado ao ciclo do ácido tricarboxílico (45%), indicando novamente problemas na expressão de proteínas relacionadas ao processo energético.

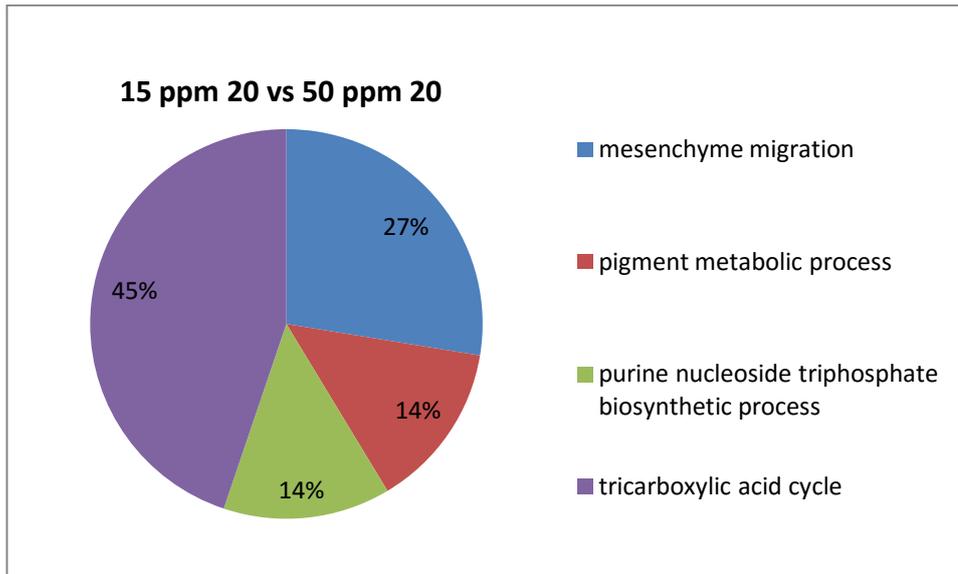


Figura 28. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 29 mostra o gráfico referente a comparação entre os grupos tratados com 15 e 50 mgF/L F por 60 dias. Podemos observar que neste caso o termo com maior porcentagem de genes associados estava relacionado ao processo de migração mesenquimal (42%), indicando alteração na expressão de proteínas do citoesqueleto, relacionadas à migração celular.

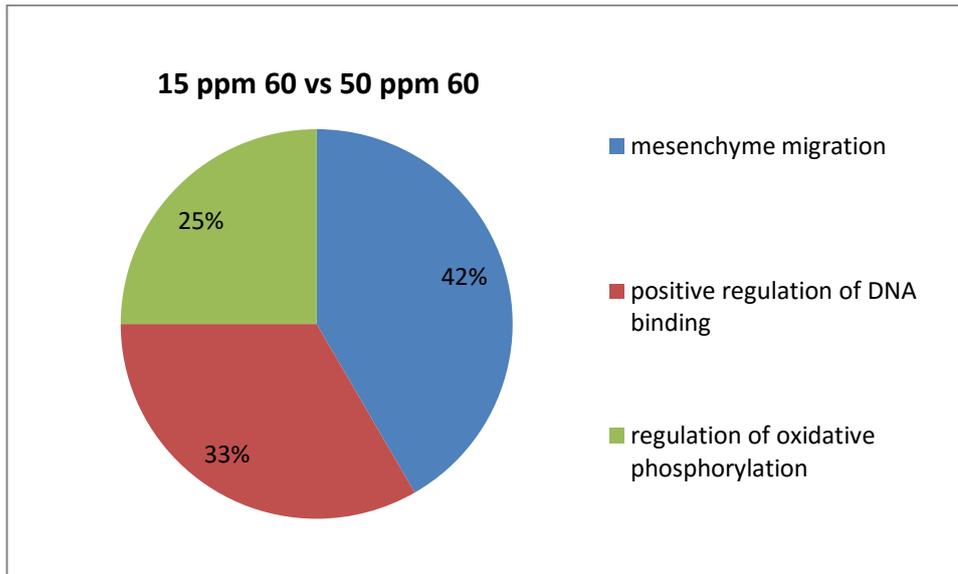


Figura 29. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 15 e 50 mgF/L F por 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

A figura 30 mostra o gráfico referente à comparação entre os grupos tratados com 50 mgF/L F, por 20 e 60 dias. Podemos observar que neste caso o termo com maior porcentagem de genes associados (41%) foi o que estava relacionado ao metabolismo de derivados de aminoácidos (41%), o que pode estar relacionado ao ciclo de Krebs.

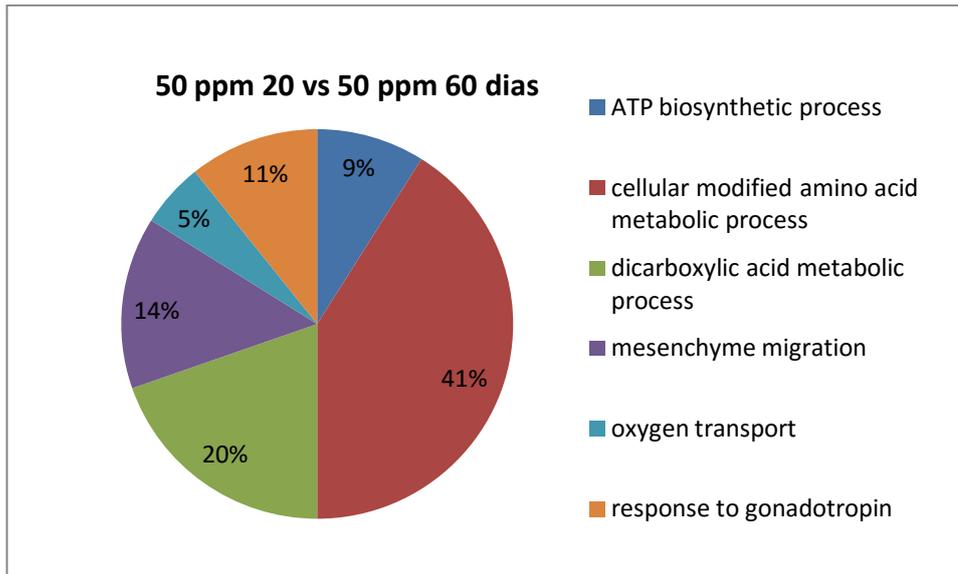


Figura 30. Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos tratados com 50 mgF/L F por 20 e 60 dias. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.0.2. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.

Em relação à análise proteômica, quando efetuamos as classificações da função biológica, podemos observar alterações relacionadas ao metabolismo energético, bem como alterações na respiração celular e conseqüentemente alterações na estrutura e função mitocondrial. Além dos aspectos energéticos, também podemos observar alterações relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e ao crescimento celular. Quando foram comparados o grupo controle com os experimentais tratados com F por 20 dias, os termos com maior porcentagem de genes associados estavam relacionados ao processo energético e respiração celular, bem como estrutura mitocondrial. Esses dados sugerem que a ação do F pode estar relacionada a algum tipo de disfunção mitocondrial, uma vez que todos esses processos estão localizados nesta organela, sendo esta essencial para o metabolismo energético. Alterações em proteínas relacionadas à mitocôndria e a processos energéticos são citadas por vários autores, incluindo trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Barbier, Arreola-Mendoza et al, 2010; Pereira, Leite et al, 2011; Leite, Lobo et al, 2014; Lobo, Leite et al, 2015; Sun, Gao et al., 2015). Pesquisas recentes indicam que o F pode diminuir a produção de ATP

mitocondrial e estas alterações parecem estar relacionadas a alterações na cadeia de transportadora de elétrons (Sun, Gao et al., 2015). Ao observar as tabelas com as proteínas com alteração de expressão (anexo 2) podemos verificar a presença de ATPases, bem como proteínas como a Citocromo oxidase (Cox), que estão intimamente ligadas à produção de energia na mitocôndria, indicando que o F altera o metabolismo energético.

Já para as comparações entre o grupo controle e os experimentais tratados com F por de 60 dias, o que fica mais evidente são as alterações relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, o que pode estar relacionado à síntese proteica bem como ao estresse oxidativo observado no retículo endoplasmático (RE), o qual tem função importante no processo de síntese proteica. Muitos trabalhos indicam que o F provoca estresse oxidativo no RE (Pereira, Leite et al., 2013; Leite, Lobo et al., 2014; Lobo, Leite et al., 2015; Zhou, Zhao et al., 2015; Bharti, Srivastava et al., 2014; Fina, Lombarte et al., 2014; Miltonprabu, Thangapandiyar et al., 2014). No presente trabalho também foram realizadas análises de *Western Blotting* que indicaram o estresse oxidativo pelo aumento da GRP78, ERp29 e também em alguns casos aumento da SOD2, confirmando, portanto, que estas alterações são passíveis de serem observadas quando ocorre o tratamento com o F.

Quando comparamos os grupos controle nos períodos de 20 e 60 dias podemos observar que as proteínas para este grupo foram mais relacionadas aos termos de divisão celular, indicando crescimento, o que já era esperado, uma vez que estamos comparando animais jovens e adultos. Na comparação entre os grupos tratados com 15 e 50 mgF/L F por 60 dias também observamos que os termos estavam relacionados ao crescimento celular, o que poderia ser um indicativo de que, dependendo da dosagem de F o mesmo poderia interferir no crescimento celular (Barbier, Arreola-Mendoza et al., 2010). Em relações às outras comparações entre os grupos experimentais, os termos com maior porcentagem estavam relacionados ao processo energético, bem como ao processo do metabolismo de aminoácidos, assim como foi indicado quando comparamos com os grupos

controle de 20 e 60 dias. Desta forma, além do tratamento com o F a dosagem também parece influenciar nestas alterações metabólicas.

Diante destes dados podemos inferir que a ação do F parece estar relacionada a uma possível disfunção mitocondrial, bem como ao estresse no RE. Análises através de redes de interação poderão esclarecer melhor as vias mais atingidas e assim os possíveis candidatos chave para estas alterações.

Interações

As Figuras 31 a 39 mostram as *subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para cada comparação. Para os animais controle dos grupos de 20 e 60 dias, a maioria das proteínas com alteração de expressão apresentavam interação com *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (P61980) e *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4* (SLC2A4; P19357) (Figura 31). A proteína K está envolvida com diversos eventos. Tem função primordial na expressão gênica, sendo fosforilada em resposta à sinalização extracelular, participando na resposta insulínica (Ostrowski, Kawata *et al.*, 2001). Já a SLC2A4 está envolvida com a homeostase da glicose e está relacionada à expressão da GLUT4 (Alves-Wagner, Sabino-Silva *et al.*, 2014). As proteínas que interagem com essas duas proteínas estavam com expressão reduzida no grupo controle de 60 dias em relação ao controle 20 dias, indicando, portanto que no grupo controle de 20 dias estaria ocorrendo um aumento desta expressão e possivelmente a ativação do transporte de glicose, bem como do processo de expressão gênica, provavelmente ligada ao crescimento celular, divisão celular e alta atividade celular, uma vez que estamos comparando animais jovens com adultos e os primeiros, portanto, estão em pleno desenvolvimento.

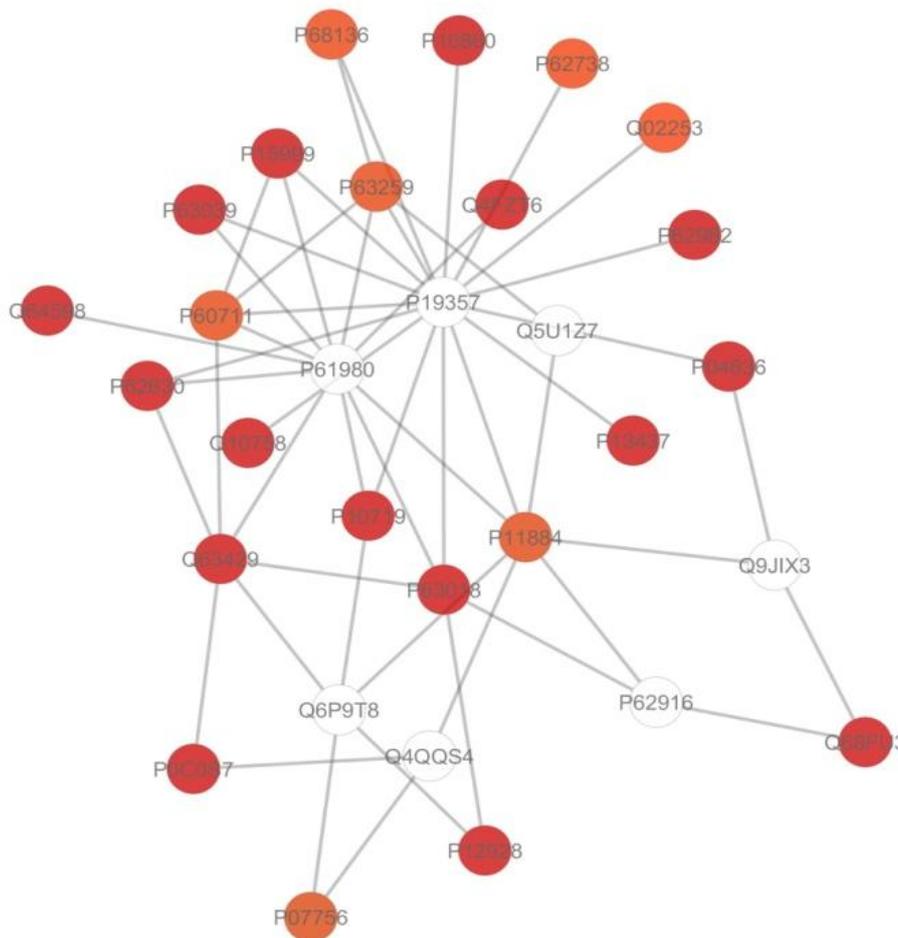
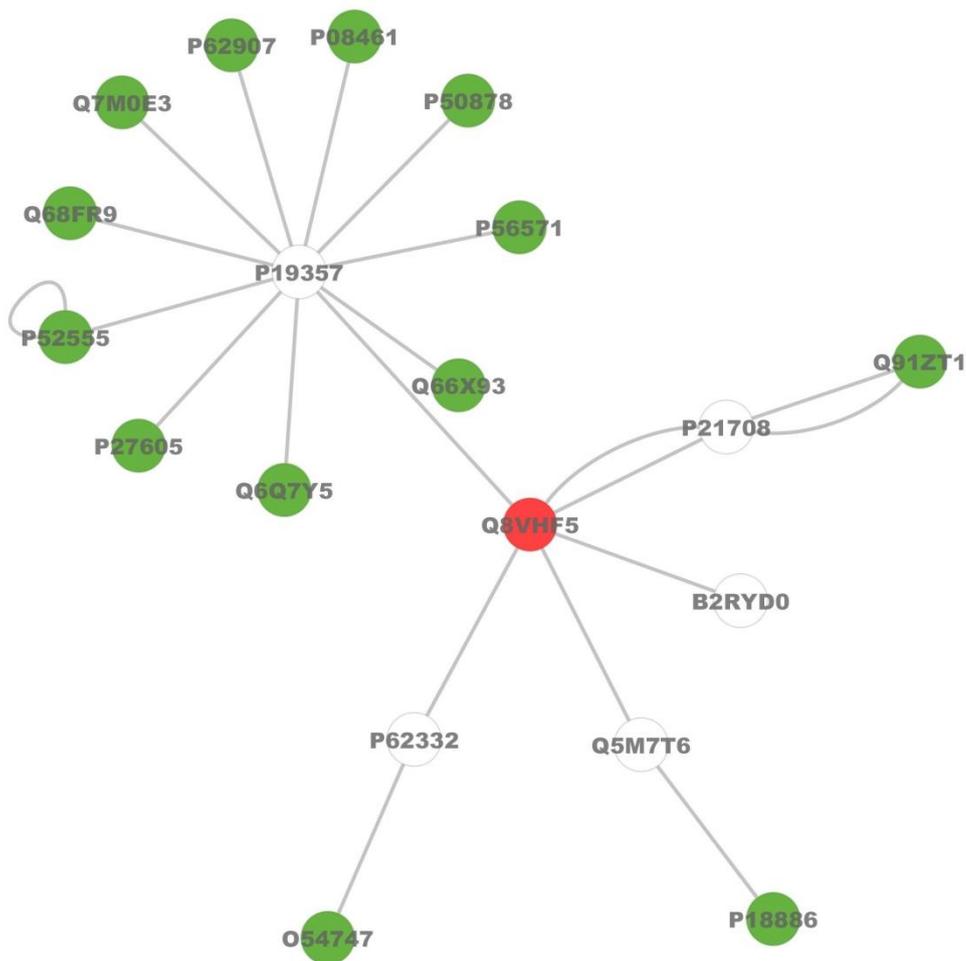


Figura 31. *Subnetwork* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com expressão diferencial no grupo controle 20 dias em relação ao grupo controle 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína, nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e superregulação, respectivamente no grupo de 60 dias em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P61980 - *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*; P19357- *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4*; Q5U1Z7- *Centromere protein R*; P62916- *Transcription initiation factor IIB*; Q9JIX3- *Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase*; Q6P9T8- *Tubulin beta-4B chain*; Q4QQS4-*RuvB-like 2 (E. coli)*. Os números de acesso nos nodos vermelhos

correspondem a: P04636 - Malate dehydrogenase, mitochondrial; P07756 - Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial; P0C0S7- Histone H2A.Z; P10719- ATP synthase subunit beta, mitochondrial; P10860- Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial; P11884- Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial; P12928- Pyruvate kinase PKLR; P13437-3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial; P15999- ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;; P60711- Actin, cytoplasmic 1; P62630- Elongation factor 1-alpha 1; P62632- Elongation factor 1-alpha 2; P62738- Actin, aortic smooth muscle;; P62982- Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; P63018- Heat shock cognate 71 kDa protein; P63039-60 kDa heat shock protein, mitochondrial; P63259- Actin, cytoplasmic 2; P68136- Actin, alpha skeletal muscle; Q02253- Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial; Q02253- Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial; Q10758- Keratin, type II cytoskeletal 8; Q4FZT6- RuvB-like 2 (E. coli); Q63429- Polyubiquitin-C; Q64598- Histone H2A type 1-F; Q68FU3- Electron transfer flavoprotein subunit beta;

Quando os animais controle foram comparados aos tratados com 15 mgF/L F por 20 dias (Figura 32), a maioria das proteínas com alteração de expressão apresentavam interação com a SLC2A4 (P19357), que, como descrito anteriormente, está envolvida com a homeostasia da glicose e com a expressão da GLUT4 (Alves-Wagner, Sabino-Silva *et al.*, 2014). As proteínas que interagem com essas duas proteínas estavam com expressão aumentada no grupo 15 mgF/L em comparação ao controle, indicando uma possível ativação do transporte de glicose e na expressão gênica neste grupo, em comparação ao controle. Tem sido relatado que altas doses de F estão associadas com a intolerância à glicose e na secreção da insulina (De La Sota *et al.*, 1997; Lupo, Lombarde *et al.*, 2011; Trivedi, Mithal *et al.*, 1993; Rigalli, Ballina *et al.*, 1990). Trabalho recente de nosso grupo observou um aumento da sensibilidade à insulina nos grupos de animais diabéticos que receberam 10 mgF/L de F pela água de beber por 22 dias, sendo que este aumento foi relacionado à interação de 2 proteínas com a GLUT4 (Lobo, Leite *et al.*, 2015). Apesar de se observar um aumento da expressão de proteínas

relacionadas ao metabolismo energético, uma proteína estava reduzida no grupo tratado com 15 mgF/L F, a *Citrate synthase, mitochondrial*. Esta enzima catalisa a condensação da acetil CoA e oxaloacetato, formando citrato, sendo uma enzima chave e a primeira enzima que limita o ciclo de Krebs (Kerner e Hoppel, 2000). Em adição, estudos indicam que a redução na expressão desta enzima pode ser provocada pelo estresse oxidativo (Jezek e Hlavata, 2005). O estresse oxidativo é um efeito recorrente que vem sendo documentado quando o F é administrado (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015; Zhou, Zhao *et al.*, 2015).



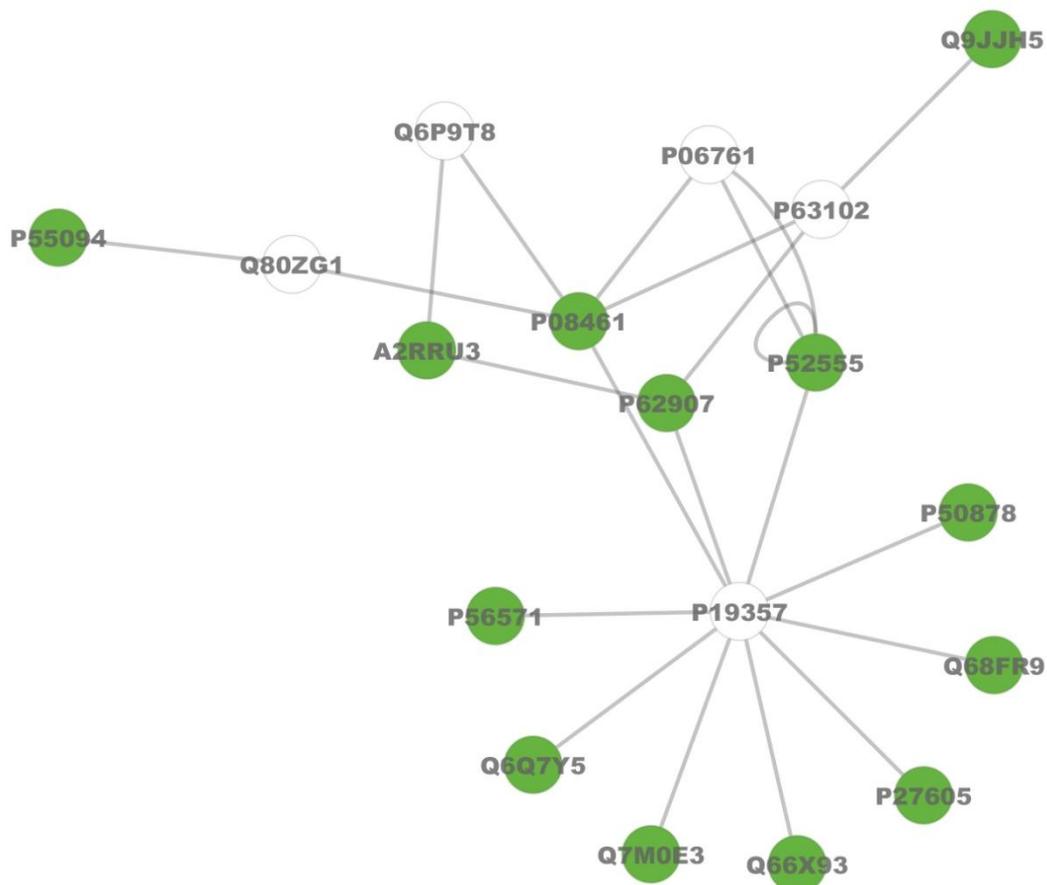


Figura 32. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo de controle em relação ao tratado com 15 mgF/L F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína, nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado 15 mgF/L F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P19357- *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4*; P06761- *78 kDa glucose-regulated protein*; P21708- *Mitogen-activated protein kinase 3*; P62332- *ADP-ribosylation factor 6*; P63102- *14-3-3 protein zeta/delta*; Q5M7T6- *ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1*; Q80ZG1- *Synembryn-A*. Os números de acesso nos nodos verdes

correspondem a: Q8VHF5- *Citrate synthase, mitochondrial*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: O54747- *DNA polymerase delta catalytic subunit*; P08461: *Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial*; P18886- *Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial*; P27605- *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*; P50878-60S *ribosomal protein L4*; P52555- *Endoplasmic reticulum resident protein 29*; P55094- *Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2*; P56571- *ES1 protein homolog, mitochondrial*; P62907 -60S *ribosomal protein L10a*; Q66X93- *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1*; Q68FR9- *Elongation factor 1-delta*; Q6Q7Y5- *Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13*; Q7M0E3- *Dextrin*; Q91ZT1- *Vascular endothelial growth factor receptor 3*; Q9JJH5-6- *phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2*.

Quando os animais controle foram comparados com aqueles tratados com 50 mgF/L F por 20 dias (Figura 33), proteínas com alteração de expressão apresentavam interação com a *Growth factor receptor-bound protein 2* (P62994) e com o *Tumor necrosis factor type 1 associated death domain-like protein* (TNFR1; Q8K3Z8), uma proteína associada com a necroptose, uma forma regulada de necrose induzida pelo estresse do RE (Saveljeva et al., 2015). Duas proteínas com expressão diminuída no grupo tratado com 50 mgF/L F em relação ao controle interagem com a TNFR1: a 40S *ribosomal protein S3* (RPS3; P62909) e a *Actin, cytoplasmic 2* (P63259). A RPS3 faz parte da subunidade 40S do ribossomo e está envolvida no processo de tradução. Quando localizada na mitocôndria, reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio, assim como o dano ao DNA. A redução desta proteína no grupo de 50 mgF/L de 20 dias pode provocar o aumento do estresse oxidativo que, como citado anteriormente, é um efeito recorrente e vem sendo documentado quando administrado o F (Pereira, Leite Ade et al., 2013; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015; Zhou, Zhao et al., 2015). O aumento de proteínas relacionadas ao metabolismo energético bem como ao processo energético também é observado quando da administração de F (Pereira, Leite et al, 2013). A proteína *Actin, cytoplasmic 2* também apresentou expressão

reduzida no grupo que recebeu 50 mgF/L F e está relacionada à estrutura ou organização dos filamentos de actina no citoesqueleto, o que está intimamente ligado à movimentação celular, a qual pode ocorrer pelo arranjo do citoesqueleto de actina. Estes filamentos são componentes estruturais celulares que têm como papel chave determinar a forma e a mobilidade celular. A polimerização e despolimerização destas fibras de actina estão envolvidas na regulação da migração celular (Zigmond, 1996). Neste trabalho foi observado que proteínas que estão relacionadas a estas atividades tiveram sua expressão alterada, o que possivelmente provocou alterações nestes mecanismos. Barbier; Arreola-Mendoza e Razo (2010) relataram em sua revisão que o F pode provocar alterações no citoesqueleto, bem como na mobilidade e proliferação celular. No presente trabalho, foi verificado que algumas proteínas relacionadas à estrutura ou à migração celular tiveram alterações tanto direcionadas para o aumento de expressão como para a diminuição de expressão nos grupos experimentais em relação ao controle. De acordo com Zigmond (1996), alterações nestes processos são complexas e necessitam ser mais esclarecidas. Leite (2010) encontrou alterações em 3 cadeias de α -tubulina, que se apresentaram subexpressas mediante tratamento agudo com F. A autora concluiu que a exposição aguda ao F, especialmente na dose mais alta, foi capaz de alterar a expressão de diferentes proteínas relacionadas à estrutura e organização celular.

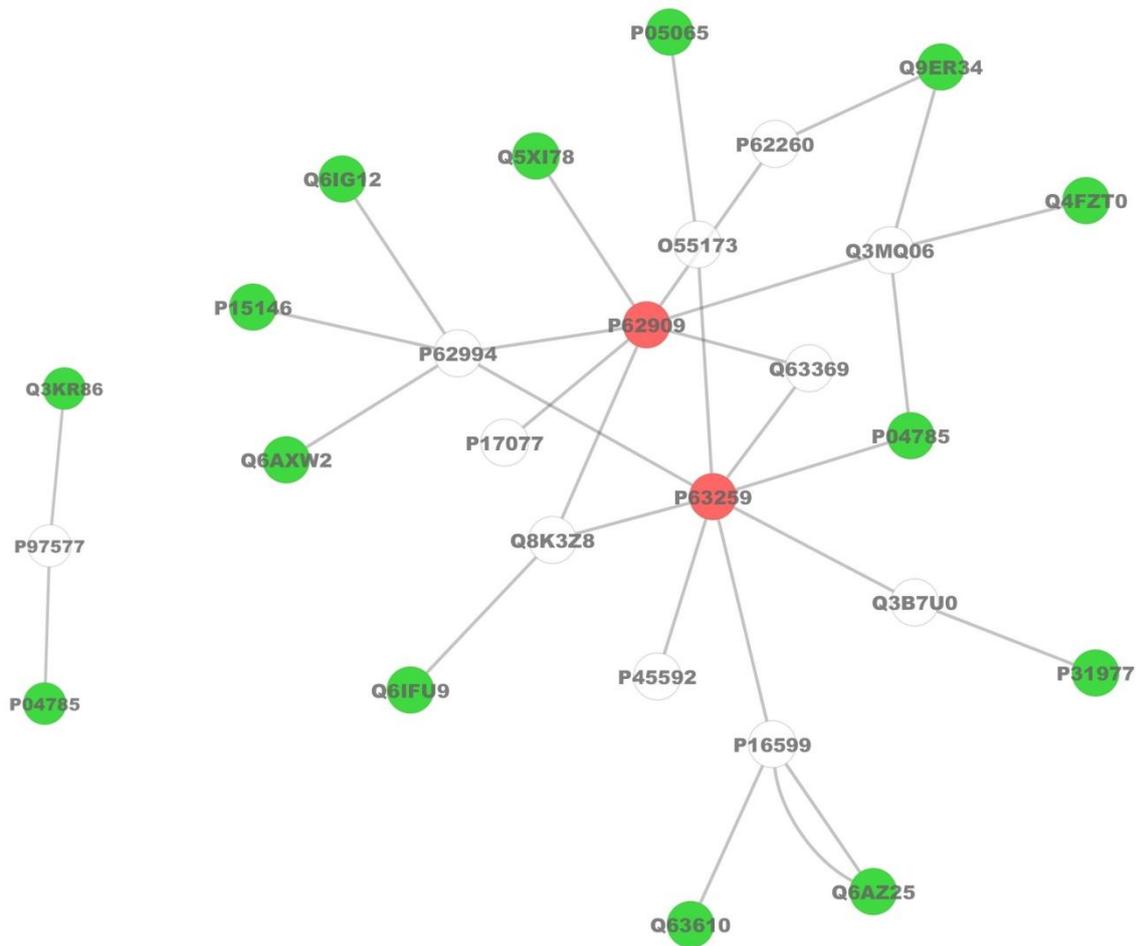


Figura 33. *Subnetwork* criada pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial nos grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente no grupo tratado com 50 mgF/L F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem à: *O55173- 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*; *P16599- Tumor necrosis factor*; *P17077- 60S ribosomal protein L9*; *P45592- Cofilin-1*; *P63102-14-3-3 protein zeta/delta*; *P62994-Growth factor receptor-bound protein 2*; *P97577- Fasciculation and elongation protein zeta-1*; *Q3B7U0-*

Ripk2 protein; Q3MQ06- *Autophagy protein 5*; Q63369- *Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit* ; Q8K3Z8- *Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain-like protein*. Os números de acesso nos nodos verde correspondem à: P62909-40S *ribosomal protein S3*; P63259-*Actin, cytoplasmic 2*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: P04785-*Protein disulfide-isomerase*; P05065-*Fructose-bisphosphate aldolase A*; P15146-*Microtubule-associated protein 2*; P31977- *Ezrin*; P52944- *PDZ and LIM domain protein 1*; Q3KR86- *MICOS complex subunit Mic60*; Q4FZT0- *Stomatin-like protein 2, mitochondrial*; Q5X178-*2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial*; Q63610- *Tropomyosin alpha-3 chain*; Q6AXW2- *Protein Tmod3*; Q6AZ25- *Tropomyosin 1, alpha*; Q6IFU9- *Protein Krt16*; Q6IG12- *Keratin, type II cytoskeletal 7*; Q9ER34- *Aconitate hydratase, mitochondrial*.

Ao se compararem os grupos controle e tratado com 15 mgF/L F por 60 dias, foi observada a redução da *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial* (P15999) no grupo tratado com F, o que pode levar, portanto a uma redução na produção de ATP (Figura 34). Este dado está de acordo com relatos da literatura que indicam que o F reduz a produção de ATP (Strunecka, Patocka et al., 2007; Barbier; Arreola-Mendoza, 2010; Pereira, Leite et al., 2013). Essa redução da produção de ATP devido a alterações na ATP sintase pode estar relacionada ao cálcio, já que nesta comparação podemos observar a redução de proteínas relacionadas ao transporte de cálcio (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha* -P11275; *Calmodulin*- P62161; Figura 30). O Ca^{2+} é um importante alvo de hormônios glicogenolíticos, que pode ativar o metabolismo oxidativo mitocondrial para aumentar a síntese de ATP, e por isso necessita da proximidade do retículo endoplasmático, de onde o Ca^{2+} pode ser captado (Bartlett, Gaspers et al., 2014). Observando as proteínas com alteração de expressão podemos constatar um aumento, mediante tratamento com F, destes transportadores de cálcio (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha*-P11275; *Calmodulin*-P62161), bem como de proteínas chave da regulação do transporte de vesícula intracelular, como a Ras (*Ras-related protein Rab-2A* -

P05712; *Ras-related protein Rab- 1A-Q6NYB7*) responsável pela regulação do transporte vesicular de proteínas para o retículo endoplasmático (RE). Podemos observar ainda um aumento induzido pela exposição ao F na expressão da *NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2 (Q5RJQ4)*, que tem papel chave na regulação da via das pentoses fosfato, ativando a glucose-6-fosfato e desta maneira estimulando a produção citosólica de NADPH para conter a injúria oxidativa. Assim, estas alterações observadas parecem estar intimamente relacionadas à homeostasia do Ca que, por sua vez, pode gerar um impacto importante sobre os hepatócitos bem como sobre o fígado como um todo, devido a sua atuação tão próxima na produção mitocondrial de energia, bem como à sua desregulação, causando danos. Alterações em proteínas mitocondriais vêm sendo bem documentadas na literatura mediante tratamento com o F, porém sua relação com a homeostasia do Ca não é muito bem documentada (Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013; Lobo, Leite *et al.*, 2015; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015).

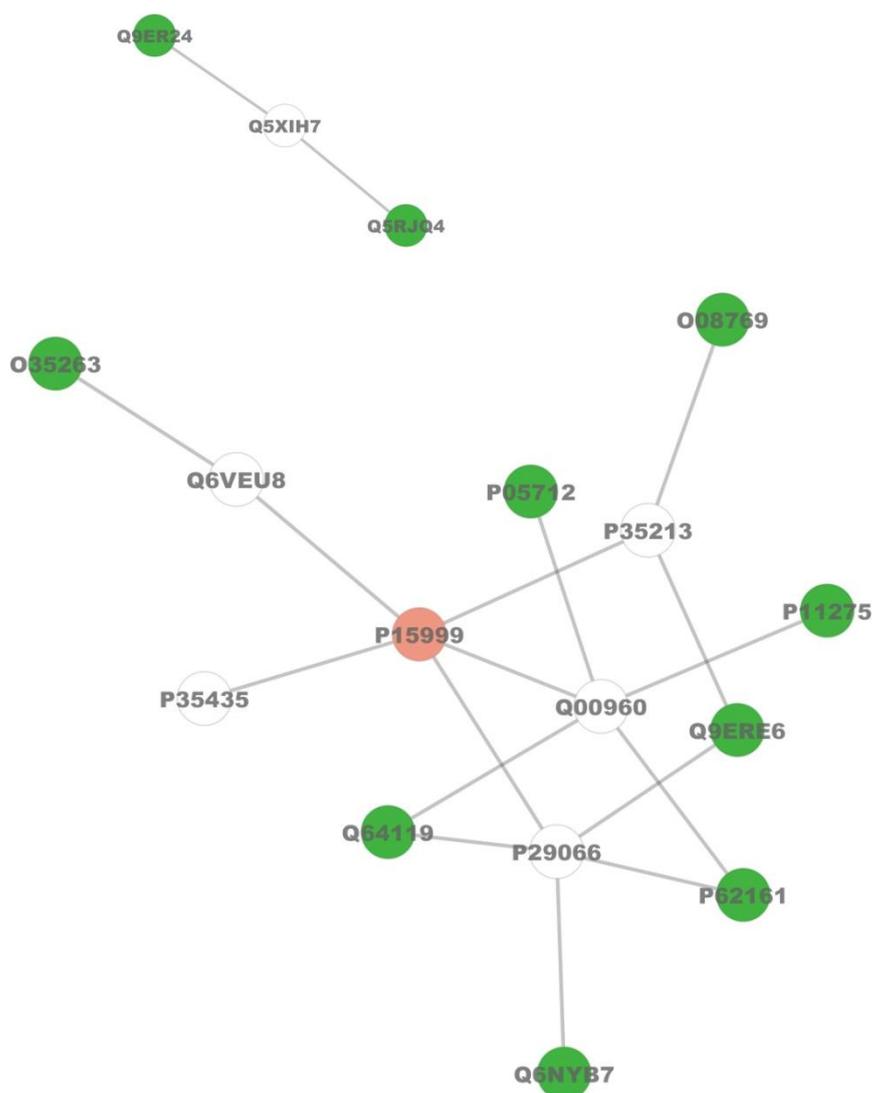


Figura 34. *Subnetwork* criada pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos controle e tratado com 15 mgF/L F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: *P29066-Beta-arrestin-1*; *P35213-14-3-3 protein beta/alpha*; *P35435-ATP synthase subunit gamma, mitochondrial*; *Q00960-Glutamate*

receptor ionotropic, NMDA 2B; Q6VEU8-DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24; Q5XIH7-Prohibitin-2. Os números de acesso nos nodos verde correspondem à: P15999-ATP synthase subunit alpha, mitochondrial. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: O08769-Cyclin dependent kinase inhibitor; O35263-Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma; P05712-Ras-related protein Rab-2A; P11275-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha; P62161-Calmodulin; Q64119-Myosin light polypeptide 6; Q6NYB7-Ras-related protein Rab-1A; Q9ERE6-Myosin phosphatase Rho-interacting protein; Q5RJQ4-NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2; Q9ER24-Ataxin-10.

Para a comparação entre os grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 60 dias (Figura 35), foi observada redução no grupo tratado da *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B* (Ppib; P24368), chaperona responsável pelo dobramento de proteínas. Esta redução mediante tratamento com F poderia levar a um desarranjo estrutural tanto das proteínas do citoesqueleto, uma vez que houve a redução da *KIF1-binding protein* e *Actin-related protein*, quanto em outras que necessitassem da ação da Ppib, já que a ausência desta enzima poderia deixar mais lento o enovelamento de proteínas que contêm resíduos de prolina (Nelson; Cox, 2002). Também podemos observar alterações em proteínas relacionada à síntese e glicosilação proteica (*40S ribosomal protein S27-Q71TY3; Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit- Q641Y0*;). Como mencionado anteriormente, na comparação do grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 20 dias proteínas com redução de expressão no grupo tratado interagem com a TNFR1 e com a *40S ribossomal protein S27*, indicando que estas alterações ocorrem independentemente do tempo de exposição ao F. Outra proteína com expressão reduzida no grupo de 50 mgF/L em relação ao controle no período de 60 dias foi a *Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit*, relacionada à glicosilação de proteínas. A N-glicosilação ocorre em 3 passos, no lúmen do RE (Helenius, Aeds 2001). Defeitos neste evento podem causar o acúmulo de proteínas

desdobradas ou deformadas no ER, caracterizando o estresse do RE, comumente relatado mediante exposição a altas doses de F (Chlubek D, 2003; Blaszczyk, Grucka-Mamczar *et al.*, 2008; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010; Sun, Gao *et al.*, 2014; Lobo, Leite *et al.*, 2015; Miltonprabu e Thangapandiyan, 2015; Zhou, Zhao *et al.*, 2015).

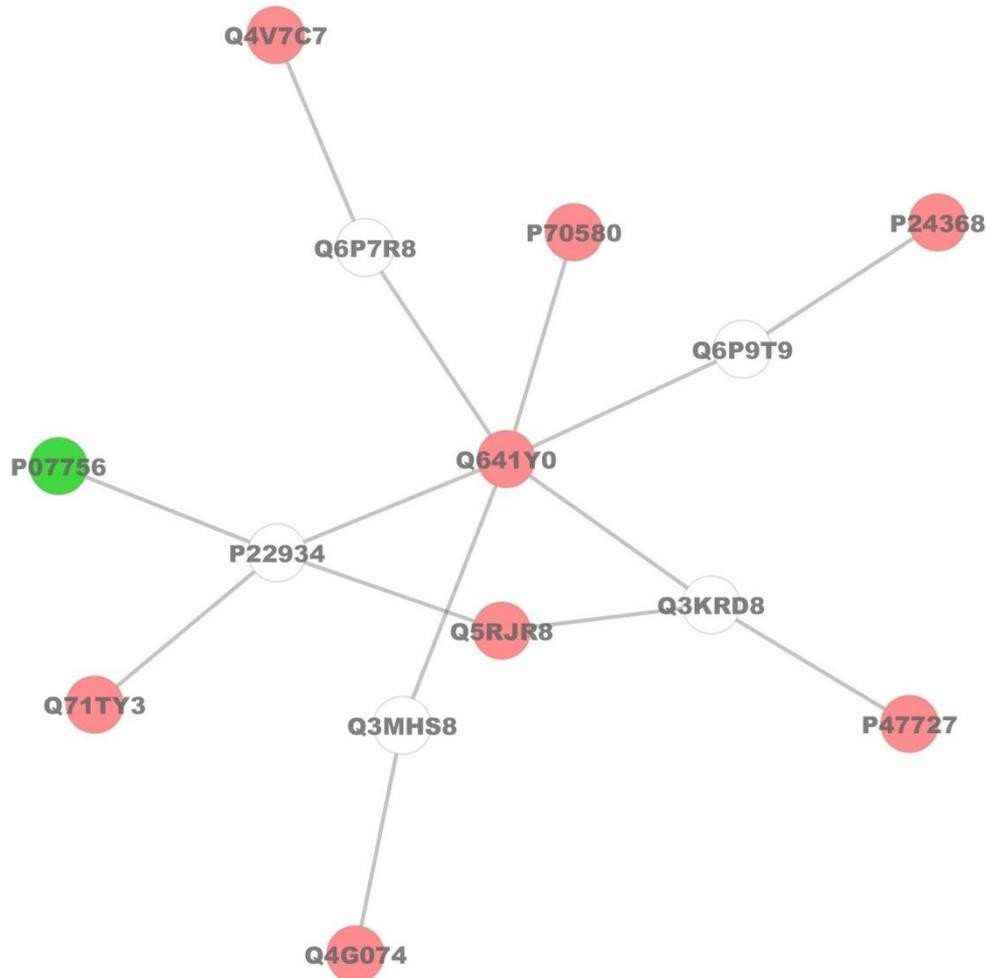


Figura 35. *Subnetwork* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos controle e tratado com 50 mgF/L F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com F em relação ao controle. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram

identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: *P22934-Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*; *Q3KRD8-Eukaryotic translation initiation factor 6*; *Q3MHS8-Sin3-associated polypeptide 18*; *Q6P7R8-Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase*; *Q6P9T9-Protein Tmbim4*. Os números de acesso nos nodo verdes correspondem a: *P07756-Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial*; números de acesso nos nodo vermelho correspondem a: *P24368-Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B*; *P47727- Carbonyl reductase [NADPH]*; *P70580-Membrane-associated progesterone receptor component 1*; *Q4G074-KIF1-binding protein*; *Q4V7C7-Actin-related protein 3*; *Q5RJR8-Leucine-rich repeat-containing protein 59*; *Q641Y0-Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit*; *Q71TY3-40S ribosomal protein S27*.

Na comparação entre os grupos tratados com 50 e 15 mgF/L F por 20 dias (Figura 36), foram observadas alterações de proteínas estruturais ou envolvidas na organização dos filamentos de actina no citoesqueleto, o que está intimamente ligado à movimentação celular, a qual pode ocorrer pelo arranjo do citoesqueleto de actina. Estes filamentos são componentes estruturais celulares que têm como papel chave determinar a forma e a mobilidade celular. A polimerização e despolimerização destas fibras de actina está envolvida na regulação da migração celular (Zigmond, 1996). Neste trabalho foi observado que proteínas que estão relacionadas a estas atividades tiveram sua expressão aumentadas no grupo de 50 mgF/L F comparado ao de 15 mgF/L F, o que possivelmente provocou alterações nestes mecanismos. Barbier; Arreola-Mendoza e Razo (2010) relataram em sua revisão que o F pode provocar alterações no citoesqueleto, bem como na mobilidade e proliferação celular. De acordo com Zigmond (1996), alterações nestes processos são complexas e necessitam ser mais esclarecidas. Xu et al. (2005) relatam um aumento na β -tubulina no rim de ratos tratados com 100 mg/L de F, o que foi relacionado a uma proliferação secundária no rim.

Este último relato vem de encontro com que foi observado no presente

trabalho, indicando um aumento destas proteínas estruturais no grupo que recebeu uma concentração maior de F (50 mgF/L). Em contrapartida, foi observado uma diminuição das *60S ribosomal protein L4e* (P62907) e *60S ribosomal protein L10a* (P62907) no grupo de 50 mgF/L F em relação ao de 15 mgF/L F. Sabe-se que o número de ribossomos aumenta na medida em que a velocidade do crescimento celular aumenta. Assim, um aumento na expressão destas proteínas nos grupos experimentais poderia ser um indício de aumento na síntese protéica (Nelson; Cox, 2002), que ocorreria em casos de aumento na proliferação celular induzida pelo F (XU, HU et al., 2005; Barbier; Arreola-Mendoza; 2010).

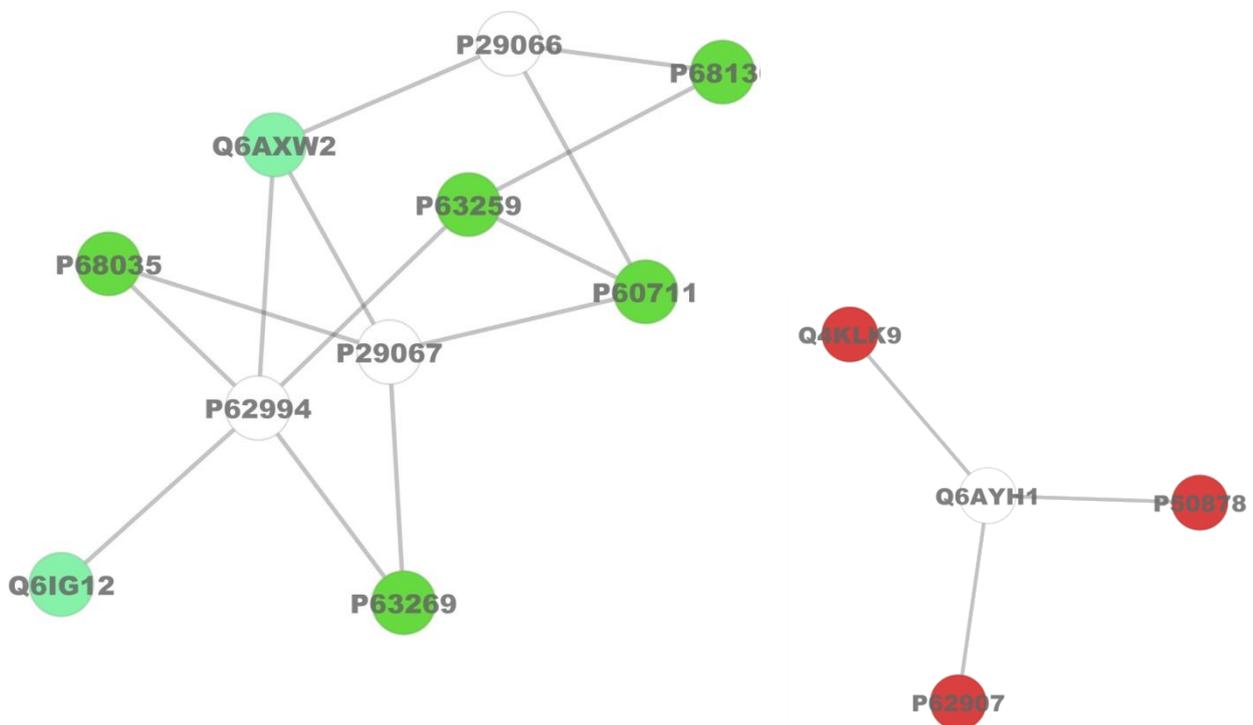
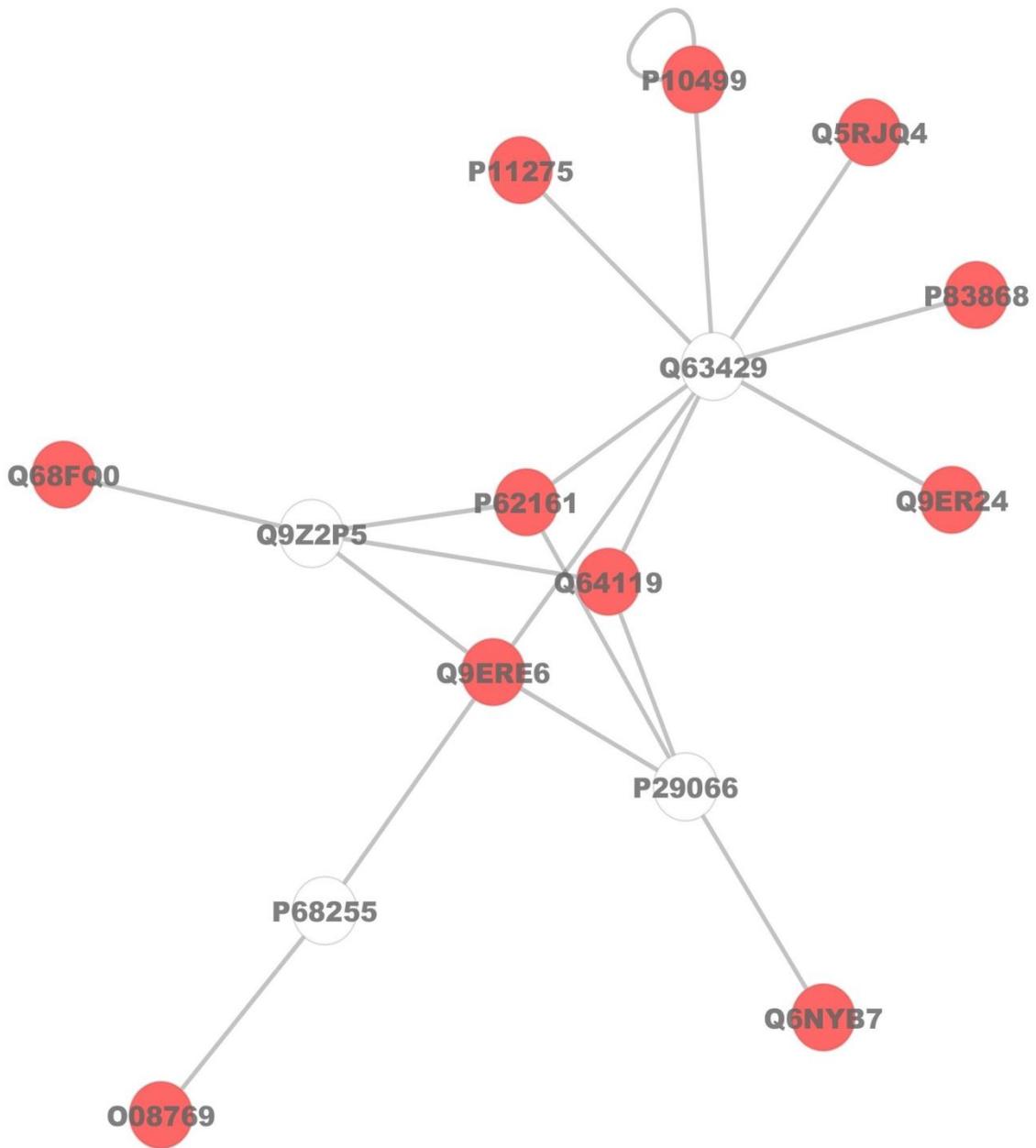


Figura 36. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 ou 15 mgF/L F por 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação,

respectivamente, no rupo tratado com 50 mgF/L F em relação ao tratado com 15 mgF/L F. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: P29066-Beta-arrestin-1; P29067-Beta-arrestin-2; P62994-Growth factor receptor-bound protein 2; Q6AYH1-Poly (A) polymerase beta (Testis specific). Os números de acesso nos nodos verdes correspondem: P60711-Actin, cytoplasmic 1; P63259-Actin, cytoplasmic 2; P63269-Actin, gamma-enteric smooth muscle; P68035-Actin, alpha cardiac muscle 1; P68136-Actin, alpha skeletal muscle; Q6AXW2-Protein Tmod3; Q6IG12-Keratin, type II cytoskeletal 7. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a P50878-60S ribosomal protein L4; P62907-60S ribosomal protein L10a; Q4KLLK9-RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72.

Na comparação entre os grupos tratados com 50 e 15 mgF/L F por 60 dias (Figura 37), proteínas com alteração de expressão interagem com a *Polyubiquitin-C* (Ubc; Q63429) é um polipeptídeo bem conservado, que se liga covalentemente a outras proteínas celulares, com o intuito de sinalizar sua degradação, bem como interação proteína / proteína e tráfico intracelular de proteína (Crinelli, Bianchi *et al.*, 2015). A *Cyclin dependent kinase inhibitor-* (O08769) interagem com ela e está relacionada ao ciclo celular e precisam da atuação da ubiquitina para a que ocorra o ciclo celular e a proliferação celular (Henchoz, Chi *et al.*, 1997). Logo a redução desta proteína no grupo 50 mgF/L F em contrapartida ao aumento no grupo 15 mgF/L 60 dias indica um aumento na proliferação celular induzida pelo F quando administrado uma concentração menor (XU, HU *et al.*, 2005; Barbier; Arreola-Mendoza; 2010). Durante o estresse do RE, que pode ocorrer mediante exposição a altas doses de F, é muito importante a indução de transcrição de proteínas para combate ao estresse oxidativo, o que vem de encontro ao aumento *Protein deglycase DJ-1*, observado no grupo tratado com 50 mgF/L F, uma vez que esta proteína tem papel fundamental na regulação no sistema redox (Ma, Zhang *et al.*, 2015). Desta maneira, o

tratamento com a dose mais alta de F (50 mgF/L) durante um período prolongado (60 dias) parece induzir uma resposta de proteção do organismo, o que é evidenciado pelo aumento de proteínas envolvidas no controle do estresse do RE, como a *Protein deglycase DJ-1*, bem como de proteínas de proteção contra o estresse oxidativo, como a GRP78 e da SOD2, verificado no *Western blotting*.



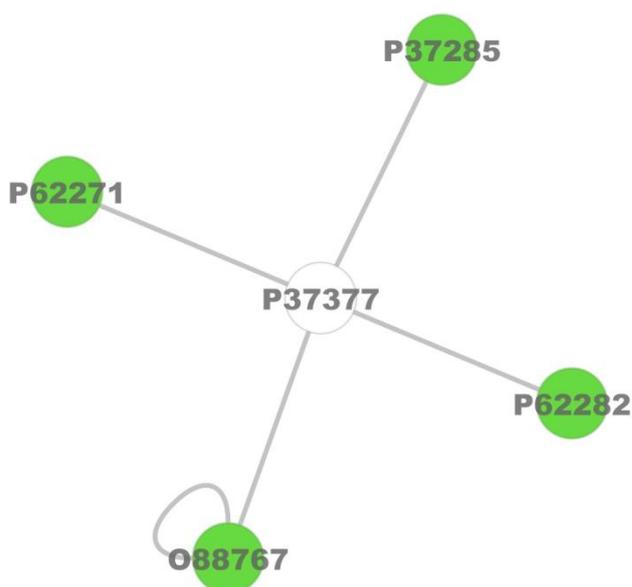


Figura 37. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 e 15 mgF/L F por 60 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente, no grupo tratado com 50 mgF/L F em comparação ao tratado com 15 mgF/L F. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem a: *P29066-Beta-arrestin-1*; *P68255-14-3-3 protein theta*; *Q63429-Polyubiquitin-C*; *Q9Z2P5-Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*; *P37377-Alpha-synuclein* os números de acesso nos nodos verdes correspondem a: *O88767-Protein deglycase DJ-1*; *P37285-Metabotropic glutamate receptor 7*; *P62271-40S ribosomal protein S18*; *P62282-40S ribosomal protein S11*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem à: *O08769-Cyclin dependent kinase inhibitor*; *P10499-Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1*; *P11275-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha*; *P62161-Calmodulin*; *P83868-Prostaglandin E synthase 3*; *Q5RJQ4-NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2*; *Q64119-Myosin light polypeptide 6*; *Q68FQ0-T-*

complex protein 1 subunit epsilon; Q6NYB7-Ras-related protein Rab-1A; Q9ER24-Ataxin-10.

Na comparação entre os grupos tratados com 50 mgF/L F por 60 e 20 dias (Figura 38), similarmente ao que foi observado quando comparamos os grupos controle nestes 2 períodos, verificou-se uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e do retículo endoplasmático no grupo tratado por 60 dias em relação ao controle, como *Peroxirredoxin-6* (Prx6; O35244-), *Catalase* (P04762), *Heat shock cognate 71 kDa protein*, *Heat shock related 70 KdA protein 2* (P14659), *Stress-790 protein, mitochondrial* (P48721) e *Ubiquitin-40S ribosomal protein S27*, indicando que a dose mais alta de F promove uma rápida resposta de reestruturação do organismo frente ao estresse oxidativo e no RE causado pelo F, de forma a reduzir os danos causados. Em relação ao metabolismo energético podemos destacar ainda a redução, no grupo tratado por 60 dias, da expressão da *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (B1WBQ8), - *Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial* (P07756), *3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial* (P13437-3), *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial* (P15999), *Pyruvate carboxylase, mitochondrial* (P52873), relacionadas ao metabolismo energético. Alterações no metabolismo energético vêm sendo relatadas na literatura e estão ligadas ao estresse oxidativo gerado pelo F (Chlubek D, 2003; Blaszczyk, Grucka-Mamczar *et al.*, 2008; Barbier, Arreola-Mendoza *et al.*, 2010; Pereira, Leite Ade *et al.*, 2013; Iano, Ferreira *et al.*, 2014; Lima Leite, Gualium Vaz Madureira Lobo *et al.*, 2014; Lobo, Leite *et al.*, 2015; Zhou, Zhao *et al.*, 2015)

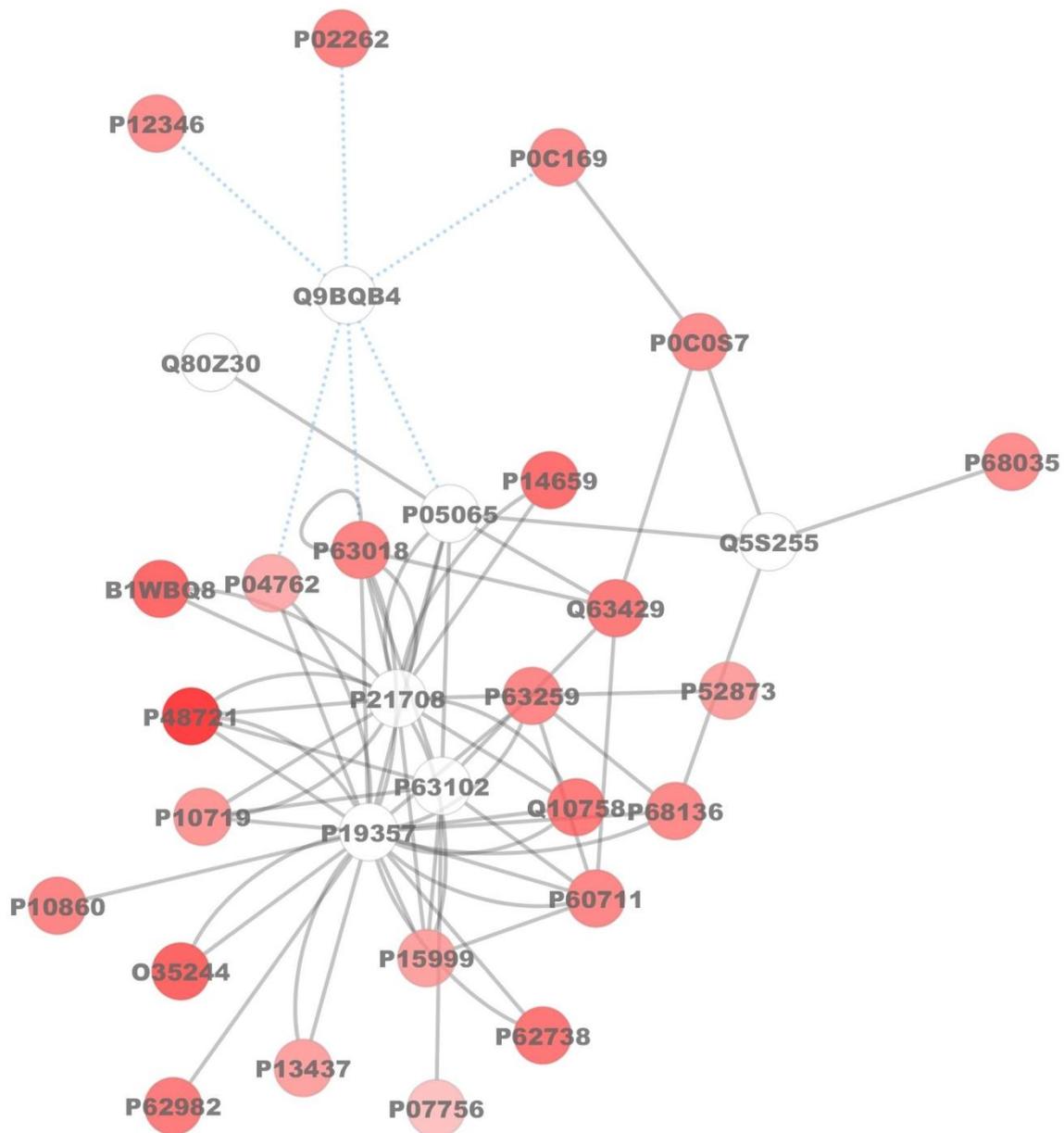


Figura 38. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial entre os grupos tratados com 50 mgF/L F por 60 e 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com seu código de acesso. Vermelho indica subregulação no grupo de 60 dias em relação ao de 20. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos

correspondem a: P00507-*Aspartate aminotransferase, mitochondrial*; P05065-*Fructose-bisphosphate aldolase A*; P19357-*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4*; P21708-*Mitogen-activated protein kinase 3*; P63102-*14-3-3 protein zeta/delta*; Q80Z30-*Protein phosphatase 1E*; Q9BQB4-*Sclerostin*; Q5S255-*Tyrosine-protein kinase*. Os números de acesso nos nodos vermelhos correspondem a: B1WBQ8-*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; O35244-*Peroxiredoxin-6*; P04762-*Catalase*; P07756-*Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial*; P0C0S7-*Histone H2A.Z*; P0C169-*Histone H2A type 1-C*; P10719-*ATP synthase subunit beta, mitochondrial*; P10860-*Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial*; P12346-*Serotransferrin*; P13437-*3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial*; P14659-*Heat shock-related 70 kDa protein 2*; P15999-*ATP synthase subunit alpha, mitochondrial*; P48721-*Stress-70 protein, mitochondrial*; P52873-*Pyruvate carboxylase, mitochondrial*; P62738-*Actin, aortic smooth muscle*; P62982-*Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*; P63018-*Heat shock cognate 71 kDa protein*; P63259-*Actin, cytoplasmic 2*; P68035-*Actin, alpha cardiac muscle 1*.

Na comparação entre os grupos tratados com 15 mgF/L F por 60 e 20 dias (Figura 39), as proteínas com redução da expressão no grupo de 60 dias são ligadas à estrutura e regulação estrutural. A Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Q9ERE6), que se encontra no centro da interação, é requerida para regular o citoesqueleto de actina (UNIPROT). Assim, a redução desta proteína no grupo tratado com 60 mgF/L F parece indicar um distúrbio nesta regulação, uma vez que alteração na regulação pode provocar um aumento ou diminuição destas fibras. Como descrito anteriormente, alterações em proteínas estruturais ocorrem mediante a administração do fluoreto. Em contrapartida, houve o aumento de expressão de proteínas relacionadas à via da glicolítica, como a Fructose-bisphosphate aldolase A (P05065-), que teve sua expressão aumentada no grupo de 60 dias, o que também foi observado no trabalho de Kobayashi et al. (2009), que relatou uma superexpressão de aldolase nos rins dos ratos que receberam 5 mg/L de fluoreto em relação ao controle. Esta enzima participa da fase preparatória da

via glicolítica, clivando a frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (Nelson; Cox, 2002). De acordo com Kobayashi et al. (2009), esse aumento poderia ser um sinal de início de alterações metabólicas das células. O fluoreto é capaz de inibir a enolase, e esse aumento da expressão da aldolase (up-stream em relação à enolase na via glicolítica) poderia ser uma tentativa da célula de garantir a eficiência dessa via (Kobayashi, Leite et Al.2009; Warburg; Christian, 1941).

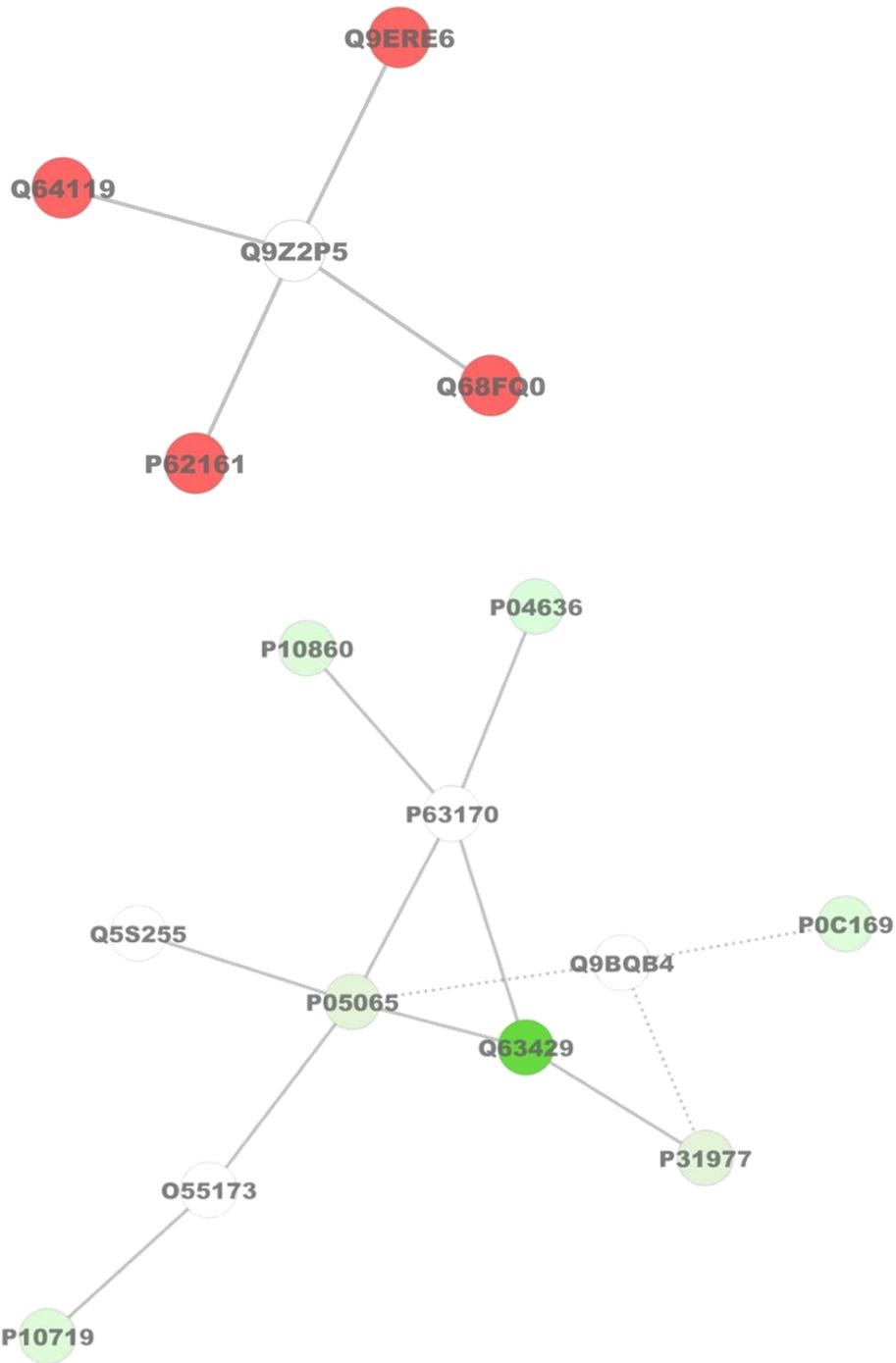


Figura 39. *Subnetworks* criadas pelos *JActiveModules* para estabelecer a interação entre as proteínas identificadas com a expressão diferencial no grupo 50 mgF/L 60 dias em relação ao grupo 50 mgF/L 20 dias. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína nomeada com

seu código de acesso. Vermelho e verde indicam subregulação e suprarregulação, respectivamente. Os nodos em branco e seus códigos de acesso indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo CYTOSCAPE®, as quais não foram identificadas no presente estudo. Os números de acesso nos nodos brancos correspondem à: O55173-3-*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*; P63170-*Dynein light chain 1, cytoplasmic*; Q5S255-*Tyrosine-protein kinase*; Q9BQB4-*Sclerostin*; Q9Z2P5-*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*; Os números de acesso nos nodos verde: P04636-*Malate dehydrogenase, mitochondrial*; P05065-*Fructose-bisphosphate aldolase A*; P0C169-*Histone H2A type 1-C*; P10719-*ATP synthase subunit beta, mitochondrial*; P10860-*Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial*; P31977-*Ezrin*; Q63429-*Polyubiquitin-C* correspondem à Os números de acesso nos nodos vermelho correspondem à: P62161-*Calmodulin*; Q64119-*Myosin light polypeptide 6*; Q68FQ0-*T-complex protein 1 subunit epsilon*; Q9ERE6-*Myosin phosphatase Rho-interacting protein*.

Os resultados obtidos a partir da análise proteômica e confirmados pelo Western Blotting indicam que os efeitos do fluoreto são dependentes tanto da dose quanto do tempo de tratamento. Para a concentração de fluoreto mais alta utilizada o presente estudo (50 mgF/L), observa-se um aumento na expressão de proteínas relacionadas à proteção do organismo contra o estresse oxidativo e do RE a curto prazo (20 dias), sugerindo uma tentativa do organismo de combater rapidamente os efeitos tóxicos do fluoreto, sendo que aos 60 dias existe uma adaptação. Entretanto, para a dose menor de fluoreto utilizada no presente estudo (15 mgF/L) há alterações na expressão de proteínas relacionadas à estrutura e proliferação celular mais a longo prazo. Estes achados ajudam a explicar por quem estudos realizados com longo prazo de tratamento dos animais com fluoreto, a administração de doses mais baixas deste íon (15) parecem levar a um efeito tóxico maior que as doses mais altas (50 mgF/L) (Dabrowska, Letko, et al., Iano, Ferreira et al.,).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A análise de concentrações de F indicaram um aumento dose-resposta no plasma independente do período administrado ou tipo de dieta. Já as concentrações de F no fígado são maior nos grupos que receberam 50 mgF/L F, mas não nos grupos que são tratados com 15 mgF/L F em relação ao control.
- A administração de F altera o perfil lipídico, tendo uma ação mais acentuada quanto maior for o tempo de exposição.
- As inclusões lipídicas no fígado são reduzidas quando o F é administrado em conjunto com uma dieta hipercalórica por um curto período em sua maior concentração
- A expressão de proteínas referente ao estresse oxidativo e ao transporte de lipídios são alteradas pelo F, e sua ação irá ser influenciada pelo tempo de administração e idade do animal bem como ao tipo de dieta .
- A avaliação da expressão proteica indicou alterações principalmente de proteínas relacionada ao estresse oxidativo e mitocondrial . Para os grupos que receberam a concentração de 50 mgF/L F foi observado o aumento de concentração de proteínas relacionadas a defesa contra o estresse oxidativo indicando um processo de adaptação nos grupos submetidos ao período de 60 dias . Para o grupo que recebeu a concentração de 15 mgF/L F houve um aumento nas alterações relacionada a proliferação celular bem como estrutural e mitocondrial, indicando um efeito depende do tempo.

Logo podemos indicar que o tempo de administração influencia a ação do F e que o fígado possui um mecanismo de adaptação à ação do F, sendo que o mesmo parece estar relacionado ao acionamento de proteínas referente a homeostasia e contra o estresse oxidativo induzidas por este íon.

Podemos ainda inferir que ação do F esta relacionada a uma possível disfunção mitocondrial bem como ao estresse no RE. Em adição a administração de doses baixas (15mg/L F) gera um efeito dependente do tempo no qual efeitos colaterais são observados depois de períodos longos de administração não havendo um efeito adptativo como observado para a maior dose (50 mg/L de F)

Podemos afirmar ainda que o F altera o metabolismo hepático e que estas alterações estão ligadas ao metabolismo de lipídios sendo que a ação muda de acordo com o tipo de dieta administrada e está intimamente ligada ao estresse oxidativo que o F pode provocar.

REFERÊNCIA

- Adachi, K., T. Dote, *et al.* Strong acute toxicity, severe hepatic damage, renal injury and abnormal serum electrolytes after intravenous administration of cadmium fluoride in rats. J Occup Health, v.49, n.3, May, p.235-41. 2007.
- Alves-Wagner, A. B., R. Sabino-Silva, *et al.* Decreased diabetes-induced glycemic impairment in WKY and SHR involves enhanced skeletal muscle Slc2a4/GLUT4 expression. Diabetol Metab Syndr, v.6, n.1, p.97. 2014.
- Barbier, O., L. Arreola-Mendoza, *et al.* Molecular mechanisms of fluoride toxicity. Chem Biol Interact, v.188, n.2, Nov 5, p.319-33. 2010.
- Bartlett, P. J., L. D. Gaspers, *et al.* Calcium-dependent regulation of glucose homeostasis in the liver. Cell Calcium, v.55, n.6, Jun, p.306-16. 2014.
- Baykov, A. A. e A. S. Shestakov. Two pathways of pyrophosphate hydrolysis and synthesis by yeast inorganic pyrophosphatase. Eur J Biochem, v.206, n.2, Jun 1, p.463-70. 1992.
- Blaszczyk, I., E. Grucka-Mamczar, *et al.* Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: effects of methionine and vitamin E. Biol Trace Elem Res, v.121, n.1, Jan, p.51-9. 2008.
- 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, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brunt, E. M. e D. G. Tiniakos. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol, v.16, n.42, Nov 14, p.5286-96. 2010.
- Bugianesi, E., N. Leone, *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, v.123, n.1, Jul, p.134-40. 2002.
- Buzalaf, M. A., E. E. Caroselli, *et al.* Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. J Anal Toxicol, v.28, n.4, May-Jun, p.249-52. 2004.
- Buzalaf, M A. R_. The metabolism and toxicity of fluoride. Monogr Oral Sci, v.16 Rev 2, p.1-153. 1996.
- Buzalaf, M. A. et al.. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. J Anal Toxicol, v.29, n.8, Nov-Dec, p.810-3. 2005.

- Buzalaf, M. A., M. M. Linardi, *et al.* Nail and bone surface as indicators of acute exposure to fluoride in rats. J Appl Oral Sci, v.12, n.4, Dec, p.285-9. 2004.
- Carvalho, J. G., L. Leite Ade, *et al.* Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. PLoS One, v.8, n.1, p.e53261. 2013.
- Chiba Fy, Garbin Cas, *et al.* CHRONIC TREATMENT WITH A MILD DOSE OF NaF PROMOTES DYSLIPIDEMIA IN RATS. Fluoride v.48, n.3, July-September 2015, p.205-212. 2015.
- Chlubek D, P. S. FLUORIDE AND OXIDATIVE STRESS. FLUORIDE, v.36, n.4. 2003.
- Cittanova, M. L., B. Lelongt, *et al.* Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. Anesthesiology, v.84, n.2, Feb, p.428-35. 1996.
- Crinelli, R., M. Bianchi, *et al.* Molecular Dissection of the Human Ubiquitin C Promoter Reveals Heat Shock Element Architectures with Activating and Repressive Functions. PLoS One, v.10, n.8, p.e0136882. 2015.
- Dabrowska, E., R. Letko, *et al.* Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. Adv Med Sci, v.51 Suppl 1, p.91-5. 2006.
- Dunipace, A. J., E. J. Brizendine, *et al.* Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. J Dent Res, v.74, n.1, Jan, p.358-68. 1995.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, *et al.* Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem, v.18, n.6, Jun, p.499-502. 1972.
- Ge, Y., R. Niu, *et al.* Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine. Arch Toxicol, v.85, n.1, Jan, p.27-33. 2011.
- He, L. F. e J. G. Chen. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. World J Gastroenterol, v.12, n.7, Feb 21, p.1144-8. 2006.
- Henchoz, S., Y. Chi, *et al.* Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. Genes Dev, v.11, n.22, Nov 15, p.3046-60. 1997.
- Hussain, J., I. Hussain, *et al.* Fluoride and health hazards: community perception in a fluorotic area of central Rajasthan (India): an arid environment. Environ Monit Assess, v.162, n.1-4, Mar, p.1-14. 2010.

- Iano, F. G., M. C. Ferreira, *et al.* Effects of chronic fluoride intake on the antioxidant systems of the liver and kidney in rats. Journal of Fluorine Chemistry, v.168, n.0, p.212-217. 2014.
- Janckila, A. J., T. A. Woodford, *et al.* Protein-tyrosine phosphatase activity of hairy cell tartrate-resistant acid phosphatase. Leukemia, v.6, n.3, Mar, p.199-203. 1992.
- Jezek, P. e L. Hlavata. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. Int J Biochem Cell Biol, v.37, n.12, Dec, p.2478-503. 2005.
- Kammoun, H. L., H. Chabanon, *et al.* GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. J Clin Invest, v.119, n.5, May, p.1201-15. 2009.
- Karaoz, E., M. Oncu, *et al.* Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. Biol Trace Elem Res, v.102, n.1-3, Winter, p.199-208. 2004.
- Kerner, J. e C. Hoppel. Fatty acid import into mitochondria. Biochim Biophys Acta, v.1486, n.1, Jun 26, p.1-17. 2000.
- Kobayashi, C. A., L. Leite Ade, *et al.* Proteomic analysis of urine in rats chronically exposed to fluoride. J Biochem Mol Toxicol, v.25, n.1, Jan-Feb, p.8-14. 2011.
- Kobayashi, C. A., A. L. Leite, *et al.* Bone response to fluoride exposure is influenced by genetics. PLoS One, v.9, n.12, p.e114343. 2014.
- Kobayashi, C. A., L. Leite Ade, *et al.* Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. Chem Biol Interact, v.180, n.2, Jul 15, p.305-11. 2009.
- Landis, J. R. e G. G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, v.33, n.1, Mar, p.159-74. 1977.
- Lima Leite, A., J. Gualium Vaz Madureira Lobo, *et al.* Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. PLoS One, v.9, n.9, p.e106646. 2014.
- Lobo, J. G., A. L. Leite, *et al.* Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. J Dent Res, v.94, n.7, Jul, p.990-7. 2015.
- Luna, L. G. Manual of the histologic staining methods of the armed force intituli of pathology. New York: McGraw Hill. 1968. 258 p.

- Ma, S., X. Zhang, *et al.* Peroxiredoxin 6 is a crucial factor in the initial step of mitochondrial clearance and is upstream of the PINK1-Parkin pathway. Antioxid Redox Signal, Nov 11. 2015.
- Mcdonagh, M. S., P. F. Whiting, *et al.* Systematic review of water fluoridation. BMJ, v.321, n.7265, Oct 7, p.855-9. 2000.
- Mendoza-Schulz, A., C. Solano-Agama, *et al.* The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. Toxicol Lett, v.190, n.2, Oct 28, p.179-86. 2009.
- Merrick, B. A. Toxicoproteomics in liver injury and inflammation. Ann N Y Acad Sci, v.1076, Sep, p.707-17. 2006.
- Miltonprabu, S. e S. Thangapandiyan. Epigallocatechin gallate potentially attenuates Fluoride induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. J Trace Elem Med Biol, v.29, Jan, p.321-35. 2015.
- Moura, L. P., G. A. Figueredo, *et al.* Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. Lipids Health Dis, v.11, p.2. 2012.
- Ostrowski, J., Y. Kawata, *et al.* Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.16, Jul 31, p.9044-9. 2001.
- Palekar, N. A., R. Naus, *et al.* Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Liver Int, v.26, n.2, Mar, p.151-6. 2006.
- Paschos, P. e K. Paletas. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. Hippokratia, v.13, n.1, Jan, p.9-19. 2009.
- Pereira, H. A., L. Leite Ade, *et al.* Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. PLoS One, v.8, n.9, p.e75343. 2013.
- Pereira, M., P. A. Dombrowski, *et al.* Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. Neurotox Res, v.19, n.1, Jan, p.55-62. 2009.
- Pinkse, M. W., M. Merckx, *et al.* Fluoride inhibition of bovine spleen purple acid phosphatase: characterization of a ternary enzyme-phosphate-fluoride complex as a model for the active enzyme-substrate-hydroxide complex. Biochemistry, v.38, n.31, Aug 3, p.9926-36. 1999.
- Satoh, R., K. Kishino, *et al.* Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. Anticancer Res, v.25, n.3B, May-Jun, p.2085-90. 2005.

- Shanthakumari, D., S. Srinivasalu, *et al.* Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. Toxicology, v.204, n.2-3, Nov 15, p.219-28. 2004.
- Stirnemann, G., K. Kessebohmer, *et al.* Liver injury caused by drugs: an update. Swiss Med Wkly, v.140, p.w13080. 2010.
- Strunecka, A., J. Patocka, *et al.* Fluoride Interaction: From Molecules to Disease. Curr Signal Transduct Ther, v.2, n.3, p.190-213. 2007.
- Sun, L., Y. Gao, *et al.* Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. Environ Toxicol Pharmacol, v.38, n.3, Nov, p.1000-6. 2014.
- Umarani, V., S. Muvvala, *et al.* Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity and dyslipidemia in rats. Toxicol Mech Methods, v.25, n.2, Feb, p.143-9. 2015.
- Whitford, G. M. Acute and chronic fluoride toxicity. J Dent Res, v.71, n.5, May, p.1249-54. 1992.
- Wong, M. C., J. Clarkson, *et al.* Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. J Dent Res, v.90, n.5, May, p.573-9. 2011.
- Xiong, X., J. Liu, *et al.* Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. Environ Res, v.103, n.1, Jan, p.112-6. 2007.
- Xu, H., L. S. Hu, *et al.* Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. Toxicol Lett, v.160, n.1, Dec 30, p.69-75. 2005.
- Xu, H., L. Jing, *et al.* Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro. Biol Trace Elem Res, v.123, n.1-3, Summer, p.91-7. 2008.
- Zager, R. A. e M. Iwata. Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability. Am J Pathol, v.150, n.2, Feb, p.735-45. 1997.
- Zhou, B. H., J. Zhao, *et al.* Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. Chemosphere, v.139, Nov, p.504-11. 2015.

Anexo 1 :**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais**

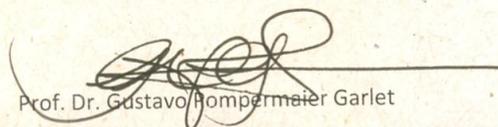
CEEPA-Proc. Nº 037/2011

Bauru, 19 de outubro de 2012.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para acréscimo de 36 animais, para reposição dos grupos experimentais e controle, para desenvolvimento do projeto de pesquisa ***Efeito do tempo de tratamento e da dose de fluoreto administrada cronicamente na expressão protéica em fígado de ratos***, de autoria de Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira, sob sua orientação, informamos que referido pedido foi avaliado por um relator e considerado aprovado "*ad referendum*" desta Comissão, por não haver impedimentos éticos. Lembramos que ao final da pesquisa, os autores deverão encaminhar um relatório com os resultados obtidos para novo parecer.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Hompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais**Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf**

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Anexo 2

Tabela 1. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo controle 60 dias vs. Controle 20 dias

Número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	Exclusivas	Razão Control_60:Control_20_	Valor de P Control_60:Control_20_
2986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	693.38		0.423	0.03
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	683.18		0.383	0.03
Q64550	UDP-glucuronosyltransferase 1-1	199.74		0.395	0.04
P24329	Thiosulfate sulfurtransferase	2687.57		0.554	0.00
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3638.55		0.554	0.01
P02770	Serum albumin	1952.14		0.372	0.00
Q03336	Regucalcin	3100.35		0.577	0.02
P12928	Pyruvate kinase PKLR	230.15		0.497	0.05
F1LU69	Protein Rps27l3	683.18		0.427	0.04
M0R4D7	Protein LOC100910820	3241.12		0.482	0.01
Q63429	Polyubiquitin-C	683.18		0.415	0.05
F1LML2	Polyubiquitin-B	683.18		0.372	0.02
P0CG51	Polyubiquitin-B	683.18		0.395	0.03
Q02253	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	1878.89		0.651	0.00

P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	3660.95	0.492	0.01
Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	1694.48	0.533	0.02
P22791	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	3586.00	0.445	0.00
P0C0S7	Histone H2A.Z	3559.44	0.427	0.00
A0A0A0MXW3	Histone H2A.Z (Fragment)	3559.44	0.407	0.00
A9UMV8	Histone H2A.J	3559.44	0.427	0.00
Q00728	Histone H2A type 4	3559.44	0.427	0.01
Q4FZT6	Histone H2A type 3	3559.44	0.415	0.00
P0CC09	Histone H2A type 2-A	3559.44	0.427	0.00
Q64598	Histone H2A type 1-F	3559.44	0.419	0.00
P0C170	Histone H2A type 1-E	3559.44	0.407	0.00
P0C169	Histone H2A type 1-C	3559.44	0.423	0.00
P02262	Histone H2A type 1	3559.44	0.415	0.00
M0RDM4	Histone H2A	3559.44	0.423	0.01
M0RCL5	Histone H2A	3559.44	0.407	0.00
D4ACV3	Histone H2A	3559.44	0.411	0.00
D3ZWE0	Histone H2A	2865.03	0.379	0.00
D3ZVK7	Histone H2A	3559.44	0.415	0.00
Q6I8Q6	Histone H2A	3559.44	0.411	0.00
G3V9C0	Histone H2A	3559.44	0.415	0.00
D3ZXP3	Histone H2A	3559.44	0.395	0.01

D4AEC0	Histone H2A	3559.44	0.407	0.00
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	2041.86	0.549	0.03
O35077	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	351.56	0.512	0.03
E9PTN6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	493.54	0.571	0.05
P46418	Glutathione S-transferase alpha-5	2606.79	0.664	0.04
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	2606.79	0.527	0.00
P04904	Glutathione S-transferase alpha-3	5083.03	0.684	0.01
P04903	Glutathione S-transferase alpha-2	5083.03	0.684	0.00
P00502	Glutathione S-transferase alpha-1	5101.24	0.664	0.00
D3ZD94	Glutathione S-transferase	2606.79	0.543	0.00
F1LVC6	Glutathione S-transferase	2606.79	0.644	0.01
Q4FZZ3	Glutathione S-transferase	5083.03	0.684	0.01
G3V983	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.20	0.600	0.00
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.20	0.595	0.00
Q6AXY0	Glutathione S-transferase A6	2606.79	0.644	0.02
F7F2H5	Glutathione S-transferase (Fragment)	5083.03	0.677	0.00
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	16767.23	0.463	0.00
M0RCH2	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	12860.62	0.432	0.01
F1LRT1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	1432.69	0.472	0.04
O88752	Epsilon 1 globin	8167.94	0.827	0.01
P07687	Epoxide hydrolase 1	497.24	0.368	0.05

D3ZXS6	Elongation factor 1-alpha	1225.01	0.533	0.02
M0R757	Elongation factor 1-alpha	1225.01	0.522	0.00
P62632	Elongation factor 1-alpha 2	919.34	0.566	0.03
P62630	Elongation factor 1-alpha 1	1225.01	0.538	0.02
M0RAS8	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	1285.23	0.533	0.00
F1M6C2	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	919.34	0.554	0.04
Q68FU3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	3698.51	0.595	0.03
P29147	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2454.91	0.415	0.00
P28037	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1264.57	0.517	0.01
P14141	Carbonic anhydrase 3	859.22	1.974	0.99
P07756	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	4852.95	0.819	0.00
O09171	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	7670.86	0.763	0.01
F1LN88	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	1500.44	0.763	0.04
P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	2630.90	0.771	0.04
G3V7J0	Aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1, isoform CRA_b	1878.89	0.600	0.02
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18	0.698	0.03
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63	0.748	0.02
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63	0.719	0.01
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63	0.756	0.04
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29	0.684	0.03

P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29	0.712	0.02
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29	0.719	0.03
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4191.22	0.502	0.00
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	4191.22	0.517	0.00
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	5931.83	0.527	0.00
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	5906.37	0.527	0.00
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1210.29	0.583	0.02
F1LML3	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	1231.70	0.487	0.00
P31210	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	1231.70	0.492	0.00
G3V9U2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4262.02	0.583	0.00
P13437	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4495.19	0.571	0.00
Q68G44	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Mitochondrial)	3586.00	0.432	0.00
M0R8T2	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1155.12	0.512	0.00
P04276	Vitamin D-binding protein	151.97	Control_20	
P85972	Vinculin	99.02	Control_20	
R9PXU6	Vinculin	99.02	Control_20	
P29534	Vascular cell adhesion protein 1	110.07	Control_20	
Q5U349	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	102.99	Control_20	
Q68FT1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	166.39	Control_20	
Q64638	UDP-glucuronosyltransferase 1-5	189.42	Control_20	

P20720	UDP-glucuronosyltransferase 1-2	96.17	Control_20
Q4KM51	Transcription elongation factor, mitochondrial	74.21	Control_20
R9PXS3	Transcription elongation factor, mitochondrial (Fragment)	74.21	Control_20
Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	137.61	Control_20
D3ZVU1	SprT-like domain-containing protein Spartan	180.37	Control_20
O35412	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	31.96	Control_20
Q63556	Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	74.51	Control_20
Q80WD1	Reticulon-4 receptor-like 2	101.57	Control_20
A0A096MJA0	RCG44919, isoform CRA_b	287.44	Control_20
D4AB73	Putative uncharacterized protein RGD1559496_predicted	168.54	Control_20
D4A5D7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12	86.84	Control_20
B0BNH4	Protein Zfp637	88.77	Control_20
D3ZN52	Protein Triobp	42.00	Control_20
D3ZHT2	Protein Triobp	43.54	Control_20
D3ZM09	Protein Sars2	112.54	Control_20
F1M513	Protein Rufy4	84.19	Control_20
D4A8D2	Protein Rdh8	106.60	Control_20
Q4QR81	Protein Rbms2	81.96	Control_20
F1MAA5	Protein Rangap1	87.28	Control_20
D3ZVH2	Protein RGD1560831	404.28	Control_20
D3ZFB8	Protein RGD1308775	114.56	Control_20

D4A8S2	Protein RGD1307603	328.05	Control_20
D4A830	Protein Ppa2	99.37	Control_20
F1M575	Protein Nuggc (Fragment)	78.20	Control_20
M0R3L1	Protein Mast4	44.77	Control_20
D3ZMX5	Protein LOC102549710	82.18	Control_20
D4ACR5	Protein LOC100911971	78.19	Control_20
D3ZCW3	Protein LOC100911971	98.01	Control_20
M0RA26	Protein LOC100362987	482.88	Control_20
D3ZG07	Protein LOC100360750	222.22	Control_20
D4AC62	Protein Krt222	123.37	Control_20
F1LRS2	Protein Dock7	140.46	Control_20
B2RYJ3	Protein Cul4a	95.54	Control_20
F1LX27	Protein Cngb3 (Fragment)	118.97	Control_20
D3ZP14	Protein Ces2j	182.09	Control_20
D3ZE31	Protein Ces2a	182.09	Control_20
F1LWH5	Protein Catsperg1	118.56	Control_20
D3ZYM6	Protein Calr4	86.17	Control_20
F1M5A1	Protein Calr4 (Fragment)	86.17	Control_20
D4A901	Protein Baiap2l2	77.82	Control_20
D4A5X8	Protein Ahcy1	125.24	Control_20
M0R6F2	Protein Acad10	71.76	Control_20

F1M8L5	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
D4A882	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
P62963	Profilin-1	146.36	Control_20
F1LM18	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
Q00438	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
D3ZB30	Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c	70.36	Control_20
Q5U2V4	Phospholipase B-like 1	84.24	Control_20
P07379	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	140.18	Control_20
Q561S0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	257.21	Control_20
E9PTU4	Myosin-11	52.80	Control_20
Q5U2R4	Mitochondrial ribonuclease P protein 1	174.47	Control_20
Q5PPI6	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	69.96	Control_20
F1LQZ9	Microtubule-associated protein 6	207.05	Control_20
Q63560	Microtubule-associated protein 6	224.84	Control_20
Q6QI15	LRRGT00193	109.30	Control_20
Q6QI82	LRRGT00126	84.77	Control_20
Q6TXE9	LRRGT00050	92.40	Control_20
F1LLW4	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q5R212	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q56R16	Importin subunit alpha-6	109.03	Control_20

F1LZJ4	Hydroxypyruvate isomerase	90.78	Control_20
Q00729	Histone H2B type 1-A	275.94	Control_20
P06866	Haptoglobin	99.46	Control_20
Q68FY4	Group specific component	151.97	Control_20
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	117.44	Control_20
Q07071	Glucokinase regulatory protein	165.90	Control_20
D3ZA46	Gem-interacting protein (Predicted)	105.03	Control_20
D3ZBM3	Ferrochelatase	93.32	Control_20
F1LMQ2	Farnesyl pyrophosphate synthase	114.63	Control_20
F1LND7	Farnesyl pyrophosphate synthase	162.74	Control_20
P05369	Farnesyl pyrophosphate synthase	163.42	Control_20
B2RZA1	Dock7 protein	133.45	Control_20
Q6IMK5	Diamine oxidase-like protein 2	98.20	Control_20
Q6P725	Desmin	72.51	Control_20
P48675	Desmin	72.51	Control_20
P06214	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	153.83	Control_20
P54275	DNA mismatch repair protein Msh2	71.97	Control_20
B1WBQ7	DNA mismatch repair protein Msh2	73.16	Control_20
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	305.26	Control_20
Q5M9I5	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	2111.09	Control_20
P20816	Cytochrome P450 4A2	149.65	Control_20

H7C5X2	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
P20817	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
F1M7X1	Cytochrome P450 4A14 (Fragment)	94.22	Control_20
Q66HE7	Cyclin-dependent kinase-like 1	117.82	Control_20
D4A4Z0	Coiled-coil domain containing 12 (Predicted), isoform CRA_a	107.49	Control_20
G3V836	Clusterin	125.09	Control_20
P05371	Clusterin	143.57	Control_20
F1M779	Clathrin heavy chain	83.68	Control_20
P11442	Clathrin heavy chain 1	86.58	Control_20
Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	144.59	Control_20
G3V936	Citrate synthase	144.59	Control_20
F1LPU4	Choline O-acetyltransferase	134.18	Control_20
P32738	Choline O-acetyltransferase	149.86	Control_20
Q66H89	Centrosomal protein of 83 kDa	117.89	Control_20
Q63108	Carboxylesterase 1E	162.20	Control_20
P10959	Carboxylesterase 1C	132.83	Control_20
Q8K3P6	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	104.53	Control_20
Q3B8N9	Biphenyl hydrolase-like (Serine hydrolase)	179.35	Control_20
Q64057	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	94.61	Control_20
Q3MHS3	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (Dihydrodiol dehydrogenase 1 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid	1000.27	Control_20

dehydrogenase)			
Q6AYQ2	Aldo-keto reductase family 1 member C21	1040.58	Control_20
P37136	Acetylcholinesterase	93.13	Control_20
Q7TP62	Ab2-073	126.87	Control_20
O35817	A-kinase anchor protein 14	98.79	Control_20
P21531	60S ribosomal protein L3	88.40	Control_20
P62909	40S ribosomal protein S3	422.08	Control_20
Q498T4	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	91.97	Control_20
Q5PQS3	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog 1	66.30	Control_60
P19488	UDP-glucuronosyltransferase 2B37	167.00	Control_60
D3ZLR6	UDP-glucuronosyltransferase 2B17	292.04	Control_60
Q6DG50	TANK-binding kinase 1-binding protein 1	75.78	Control_60
P17988	Sulfotransferase 1A1	255.73	Control_60
Q66H48	Protein Zfp219	69.29	Control_60
B2RYG3	Protein Vps9d1	71.61	Control_60
A0A096MJB5	Protein Unc45b	52.37	Control_60
B0BMT9	Protein Sqrdl	532.65	Control_60
F1LP26	Protein Shroom3	64.44	Control_60
D4A2W9	Protein Samhd1	71.99	Control_60
D3Z898	Protein Samhd1	74.10	Control_60

D3ZSX9	Protein S100pbp	110.98	Control_60
D4A306	Protein Rnf207	74.86	Control_60
D4A0E2	Protein Napg	84.22	Control_60
D3ZB33	Protein Mex3a	97.72	Control_60
G3V614	Protein LOC606294	73.84	Control_60
A0A096MKF2	Protein LOC100911797	63.60	Control_60
M0RC68	Protein LOC100911797	63.60	Control_60
D3ZET2	Protein LOC100910851	64.03	Control_60
F1LME8	Protein LOC100364352	142.64	Control_60
D4A2Y3	Protein Immp2l	943.86	Control_60
F1M5Q2	Protein Gpr161 (Fragment)	74.34	Control_60
D3ZWF2	Protein Fbrs	62.32	Control_60
D3ZXM4	Protein Evi5l	87.46	Control_60
D3ZN21	Protein Ddx3y	158.57	Control_60
E9PT29	Protein Ddx17	151.59	Control_60
M0RB90	Protein Cyp2c6v1	143.54	Control_60
D4A9A3	Protein Cenpv	99.48	Control_60
D3ZG65	Protein 4930562C15Rik	60.73	Control_60
B1WCA0	MgF/L1d protein	100.24	Control_60
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	98.68	Control_60
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	157.10	Control_60

P25977	Nucleolar transcription factor 1	113.10	Control_60
C9DQJ9	Neuralized 2	70.27	Control_60
D4ACU5	NADPH oxidase organizer 1 (Predicted)	70.82	Control_60
Q5XIF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	173.04	Control_60
Q5M876	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate- forming)	116.36	Control_60
D3ZCQ9	Myeloid leukemia factor 1 (Predicted), isoform CRA_a	84.97	Control_60
Q00566	Methyl-CpG-binding protein 2	114.33	Control_60
F1LWH6	Methyl-CpG-binding protein 2 (Fragment)	86.57	Control_60
P70580	Membrane-associated progesterone receptor component 1	803.10	Control_60
F1LPD4	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
M0RBQ9	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
Q69CM7	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
B1H257	Loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 homolog (Human)	152.01	Control_60
Q5RJR8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	80.19	Control_60
Q6QI43	LRRGT00165	114.74	Control_60
Q4G074	KIF1-binding protein	73.84	Control_60
P97697	Inositol monophosphatase 1	135.46	Control_60
Q63772	Growth arrest-specific protein 6	81.33	Control_60

P47819	Glial fibrillary acidic protein	87.71	Control_60
M0RAK4	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
A0A0A0MXX7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
D3ZYW7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
Q9JMA8	Exostoses (Multiple)-like 3, isoform CRA_a	66.12	Control_60
D3ZYU0	Enolase	209.26	Control_60
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	75.22	Control_60
D3ZMM4	ERC protein 2	70.73	Control_60
Q8K3M6	ERC protein 2	89.53	Control_60
F1LM69	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	83.81	Control_60
Q641Y0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	83.81	Control_60
Q8K4C0	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	82.13	Control_60
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	69.59	Control_60
F1M5T2	Diacylglycerol kinase (Fragment)	142.97	Control_60
Q6AYI1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	158.64	Control_60
A0A096MIX2	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	178.80	Control_60
Q4KLZ3	DAZ associated protein 1	106.97	Control_60
P05178	Cytochrome P450 2C6	154.23	Control_60
D4A519	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60

P20812	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60
F7FF20	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5 (Predicted), isoform CRA_a	73.50	Control_60
A0A096MK76	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
G3V7M5	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
Q9QZC4	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
F1M835	Carbonyl reductase family member 4	138.39	Control_60
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	67.75	Control_60
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	80.11	Control_60
Q3KR97	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	83.34	Control_60
D3ZCC5	Ankyrin repeat domain 24 (Predicted), isoform CRA_d	111.40	Control_60
B1WC89	Ankrd58 protein	73.60	Control_60
O35460	Angiopoietin-1	92.76	Control_60
F1LSB2	Angiopoietin 1, isoform CRA_a	92.76	Control_60
Q4V7C7	Actin-related protein 3	66.37	Control_60
D3ZNZ8	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
Q71TY3	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	367.06	Control_60

Tabela 2 . Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo controle 20 dias vs. 15mgF/L 20 dias

Número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão
				Control_20:15mgF/L _20_
P62804	Histone H4	1554.15		1.6323
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	1287.31		0.835
P04276	Vitamin D-binding protein	151.97	Control_20	
P85972	Vinculin	99.02	Control_20	
R9PXU6	Vinculin	99.02	Control_20	
P29534	Vascular cell adhesion protein 1	110.07	Control_20	
Q5U349	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	102.99	Control_20	
Q68FT1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	166.39	Control_20	
Q64638	UDP-glucuronosyltransferase 1-5	189.42	Control_20	
P20720	UDP-glucuronosyltransferase 1-2	96.17	Control_20	
Q4KM51	Transcription elongation factor, mitochondrial	74.21	Control_20	
R9PXS3	Transcription elongation factor, mitochondrial (Fragment)	74.21	Control_20	
Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	137.61	Control_20	
D3ZVU1	SprT-like domain-containing protein Spartan	180.37	Control_20	
O35412	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	31.96	Control_20	
Q63556	Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	74.51	Control_20	

Q80WD1	Reticulon-4 receptor-like 2	101.57	Control_20
A0A096MJA0	RCG44919, isoform CRA_b	287.44	Control_20
D4AB73	Putative uncharacterized protein RGD1559496_predicted	168.54	Control_20
D4A5D7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12	86.84	Control_20
B0BNH4	Protein Zfp637	88.77	Control_20
D3ZN52	Protein Triobp	42	Control_20
D3ZHT2	Protein Triobp	43.54	Control_20
D3ZM09	Protein Sars2	112.54	Control_20
F1M513	Protein Rufy4	84.19	Control_20
D4A8D2	Protein Rdh8	106.6	Control_20
Q4QR81	Protein Rbms2	81.96	Control_20
F1MAA5	Protein Rangap1	87.28	Control_20
D3ZVH2	Protein RGD1560831	404.28	Control_20
D3ZFB8	Protein RGD1308775	114.56	Control_20
D4A8S2	Protein RGD1307603	328.05	Control_20
D4A830	Protein Ppa2	99.37	Control_20
F1M575	Protein Nuggc (Fragment)	78.2	Control_20
M0R3L1	Protein Mast4	44.77	Control_20
D3ZMX5	Protein LOC102549710	82.18	Control_20
D4ACR5	Protein LOC100911971	78.19	Control_20
D3ZCW3	Protein LOC100911971	98.01	Control_20

M0RA26	Protein LOC100362987	482.88	Control_20
D3ZG07	Protein LOC100360750	222.22	Control_20
D4AC62	Protein Krt222	123.37	Control_20
F1LRS2	Protein Dock7	140.46	Control_20
B2RYJ3	Protein Cul4a	95.54	Control_20
F1LX27	Protein Cngb3 (Fragment)	118.97	Control_20
D3ZP14	Protein Ces2j	182.09	Control_20
D3ZE31	Protein Ces2a	182.09	Control_20
F1LWH5	Protein Catsperg1	118.56	Control_20
D3ZYM6	Protein Calr4	86.17	Control_20
F1M5A1	Protein Calr4 (Fragment)	86.17	Control_20
D4A901	Protein Baiap2l2	77.82	Control_20
D4A5X8	Protein Ahcyl1	125.24	Control_20
M0R6F2	Protein Acad10	71.76	Control_20
F1M8L5	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
D4A882	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
P62963	Profilin-1	146.36	Control_20
F1LM18	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
Q00438	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
D3ZB30	Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c	70.36	Control_20
Q5U2V4	Phospholipase B-like 1	84.24	Control_20

P07379	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	140.18	Control_20
Q561S0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	257.21	Control_20
E9PTU4	Myosin-11	52.8	Control_20
Q5U2R4	Mitochondrial ribonuclease P protein 1	174.47	Control_20
Q5PPI6	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	69.96	Control_20
F1LQZ9	Microtubule-associated protein 6	207.05	Control_20
Q63560	Microtubule-associated protein 6	224.84	Control_20
Q6QI15	LRRGT00193	109.3	Control_20
Q6QI82	LRRGT00126	84.77	Control_20
Q6TXE9	LRRGT00050	92.4	Control_20
F1LLW4	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q5R212	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q56R16	Importin subunit alpha-6	109.03	Control_20
F1LZJ4	Hydroxypyruvate isomerase	90.78	Control_20
Q00729	Histone H2B type 1-A	275.94	Control_20
P06866	Haptoglobin	99.46	Control_20
Q68FY4	Group specific component	151.97	Control_20
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	117.44	Control_20
Q07071	Glucokinase regulatory protein	165.9	Control_20
D3ZA46	Gem-interacting protein (Predicted)	105.03	Control_20
D3ZBM3	Ferrochelatase	93.32	Control_20

F1LMQ2	Farnesyl pyrophosphate synthase	114.63	Control_20
F1LND7	Farnesyl pyrophosphate synthase	162.74	Control_20
P05369	Farnesyl pyrophosphate synthase	163.42	Control_20
B2RZA1	Dock7 protein	133.45	Control_20
Q6IMK5	Diamine oxidase-like protein 2	98.2	Control_20
Q6P725	Desmin	72.51	Control_20
P48675	Desmin	72.51	Control_20
P06214	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	153.83	Control_20
P54275	DNA mismatch repair protein Msh2	71.97	Control_20
B1WBQ7	DNA mismatch repair protein Msh2	73.16	Control_20
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	305.26	Control_20
Q5M9I5	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	2111.09	Control_20
P20816	Cytochrome P450 4A2	149.65	Control_20
H7C5X2	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
P20817	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
F1M7X1	Cytochrome P450 4A14 (Fragment)	94.22	Control_20
Q66HE7	Cyclin-dependent kinase-like 1	117.82	Control_20
D4A4Z0	Coiled-coil domain containing 12 (Predicted), isoform CRA_a	107.49	Control_20
G3V836	Clusterin	125.09	Control_20
P05371	Clusterin	143.57	Control_20
F1M779	Clathrin heavy chain	83.68	Control_20

P11442	Clathrin heavy chain 1	86.58	Control_20
Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	144.59	Control_20
G3V936	Citrate synthase	144.59	Control_20
F1LPU4	Choline O-acetyltransferase	134.18	Control_20
P32738	Choline O-acetyltransferase	149.86	Control_20
Q66H89	Centrosomal protein of 83 kDa	117.89	Control_20
Q63108	Carboxylesterase 1E	162.2	Control_20
P10959	Carboxylesterase 1C	132.83	Control_20
Q8K3P6	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	104.53	Control_20
Q3B8N9	Biphenyl hydrolase-like (Serine hydrolase)	179.35	Control_20
Q64057	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	94.61	Control_20
	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (Dihydrodiol dehydrogenase 1 20-alpha (3-		
Q3MHS3	alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	1000.27	Control_20
Q6AYQ2	Aldo-keto reductase family 1 member C21	1040.58	Control_20
P37136	Acetylcholinesterase	93.13	Control_20
Q7TP62	Ab2-073	126.87	Control_20
O35817	A-kinase anchor protein 14	98.79	Control_20
P21531	60S ribosomal protein L3	88.4	Control_20
P62909	40S ribosomal protein S3	422.08	Control_20
Q498T4	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	91.97	Control_20
Q91ZT1	Vascular endothelial growth factor receptor 3	154.16	15mgF/L_20

Q3T1I3	Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	113.86	15mgF/L_20
D3ZVQ0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	121.89	15mgF/L_20
Q64637	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	91.14	15mgF/L_20
A2RRU3	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	130.34	15mgF/L_20
P52847	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	737.42	15mgF/L_20
Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	83.45	15mgF/L_20
Q8K3K4	Serpin B10	107.33	15mgF/L_20
Q6TXG7	Serine hydroxymethyltransferase	79.97	15mgF/L_20
G3V6B2	Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (Ovalbumin), member 10	107.33	15mgF/L_20
F1LYQ7	Ribosomal protein	250.55	15mgF/L_20
D4A7Y6	Ribosomal protein (Fragment)	250.55	15mgF/L_20
Q4KLK9	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72	100.25	15mgF/L_20
D3ZUF8	Protein Vrk2	87.72	15mgF/L_20
B0BMY7	Protein Twf2	184.03	15mgF/L_20
D3ZW62	Protein Thsd1	94.03	15mgF/L_20
Q5XIE1	Protein THEM6	109.8	15mgF/L_20
Q6AYN5	Protein Stard6	120.05	15mgF/L_20
D4ABK0	Protein Sgcz (Fragment)	85.89	15mgF/L_20
D3ZKB6	Protein RGD1562948	117.14	15mgF/L_20
D3ZAU6	Protein RGD1561919	237.15	15mgF/L_20
D3ZLT7	Protein RGD1305350	137.33	15mgF/L_20

M0RDK4	Protein Pitpnm3 (Fragment)	81.39	15mgF/L_20
M0R9F7	Protein Marco	78.87	15mgF/L_20
D3ZIV3	Protein Mad11	79.49	15mgF/L_20
F1M7B7	Protein LOC100911725 (Fragment)	185.27	15mgF/L_20
D3ZN87	Protein LOC100361637	139.82	15mgF/L_20
F1LML7	Protein Hip1r	90.6	15mgF/L_20
M0RDI0	Protein Cyp3a73 (Fragment)	94.26	15mgF/L_20
D3ZNU3	Protein Cramp1l	87.36	15mgF/L_20
D3ZX71	Protein Col9a3	96.82	15mgF/L_20
F1MAH8	Protein Clip1	82.1	15mgF/L_20
D4A9J6	Protein Ccdc88b	82.71	15mgF/L_20
D3ZTC4	Protein Ccdc88b	82.35	15mgF/L_20
M0R521	Protein Arrdc5	107.23	15mgF/L_20
F1M943	Protein Armc8	92.71	15mgF/L_20
D3ZHR4	Protein Ankrd35	80.79	15mgF/L_20
F1LM42	Protein Ank2	91.31	15mgF/L_20
D4A4Q9	Protein Ank2	76.69	15mgF/L_20
F1M5N3	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
F1LZM2	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20
F1M9N9	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
M0R511	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20

D3ZN23	Protein Adamts20	36.01	15mgF/L_20
Q5I0K1	Pipecolic acid oxidase	101.68	15mgF/L_20
Q2THW7	Palmitoyltransferase ZDHHC5	85.89	15mgF/L_20
Q4V9H5	PHD finger protein 20-like protein 1	86.45	15mgF/L_20
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	396.26	15mgF/L_20
G3V7F5	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	86.5	15mgF/L_20
P55094	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	87.79	15mgF/L_20
P69060	N-acylneuraminate cytidyltransferase	132.73	15mgF/L_20
G3V9B3	Myelin-associated glycoprotein	101.16	15mgF/L_20
P07722	Myelin-associated glycoprotein	103.62	15mgF/L_20
Q498R1	Methionine synthase reductase	164.67	15mgF/L_20
E9PTQ0	LIM domain binding 2 (Predicted)	93.33	15mgF/L_20
Q3SWU2	Interferon regulatory factor 7	261.91	15mgF/L_20
F1LSL3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.32	15mgF/L_20
Q63269	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.69	15mgF/L_20
P27605	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	113.89	15mgF/L_20
O35952	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	97.53	15mgF/L_20
D4A500	HD domain containing 3 (Predicted), isoform CRA_b	106.39	15mgF/L_20
Q6Q7Y5	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	85.14	15mgF/L_20
F1LNG7	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (Fragment)	85.14	15mgF/L_20
P14480	Fibrinogen beta chain	190.78	15mgF/L_20

F1LR10	Epithelial protein lost in neoplasm	105.43	15mgF/L_20
P0C0K7	Ephrin type-B receptor 6	81.87	15mgF/L_20
P52555	Endoplasmic reticulum resident protein 29	123.11	15mgF/L_20
Q68FR9	Elongation factor 1-delta	95.68	15mgF/L_20
P56571	ES1 protein homolog, mitochondrial	120.59	15mgF/L_20
G3V6U4	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q8CH84	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q64346	Dual specificity protein phosphatase 6	175.39	15mgF/L_20
	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase		
P08461	complex, mitochondrial	139.7	15mgF/L_20
Q7M0E3	Dextrin	88.64	15mgF/L_20
O54747	DNA polymerase delta catalytic subunit	75.31	15mgF/L_20
F1LSD8	DNA mismatch repair protein Mlh1	104.19	15mgF/L_20
P97679	DNA mismatch repair protein Mlh1	107.16	15mgF/L_20
P05183	Cytochrome P450 3A2	153.26	15mgF/L_20
P04800	Cytochrome P450 3A1	185.05	15mgF/L_20
Q06884	Cytochrome P-450	169.71	15mgF/L_20
P01026	Complement C3	104.31	15mgF/L_20
B5DEY9	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	89.36	15mgF/L_20
G3V7N5	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	165.38	15mgF/L_20
P18886	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	177.31	15mgF/L_20

Q5XIJ7	Calcium binding protein 39-like	92.41	15mgF/L_20
Q810D1	Calcineurin B homologous protein 2	154.17	15mgF/L_20
Q9ES38	Bile acyl-CoA synthetase	85.49	15mgF/L_20
Q9JM53	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	127.99	15mgF/L_20
D3ZC34	Ankyrin repeat and MYND domain containing 2 (Predicted)	127.73	15mgF/L_20
D4A3E2	Aminopeptidase-like 1 (Predicted)	120.1	15mgF/L_20
M0R9I6	Aminomethyltransferase	88.88	15mgF/L_20
Q0D2L3	Agmatinase, mitochondrial	94.17	15mgF/L_20
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	128.18	15mgF/L_20
P85970	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	156.25	15mgF/L_20
M0RAP9	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	139.7	15mgF/L_20
F1LS48	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	117.14	15mgF/L_20
Q6QI09	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	113.49	15mgF/L_20
F7FFJ9	ATP synthase subunit gamma	89.38	15mgF/L_20
Q6P3V9	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P50878	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P62907	60S ribosomal protein L10a	250.55	15mgF/L_20
P25114	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	205.05	15mgF/L_20
Q9JJH5	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	139.16	15mgF/L_20
D4AAJ3	40S ribosomal protein S12	146.41	15mgF/L_20

Tabela 3. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo controle 20 dias vs.50 mgF/L 20 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão Controle_20:50mgF/L_20	Valor de P Controle_20:50 mgF/L_20
O35244	Peroxiredoxin-6	1510.58		0.4630	0.00
D4AB01	Histidine triad nucleotide binding protein 2 (Predicted), isoform CRA_a	544.58		0.3198	0.04
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	17634.75		1.2092	1.00
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	1287.31		0.8106	0.01
O88752	Epsilon 1 globin	8167.94		1.2969	1.00
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18		0.6505	0.00
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63		0.7118	0.00
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63		0.7261	0.00
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63		0.7047	0.00
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29		0.6907	0.01
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29		0.6839	0.00
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29		0.6907	0.00
P04276	Vitamin D-binding protein	151.97	Control_20		
P85972	Vinculin	99.02	Control_20		
R9PXU6	Vinculin	99.02	Control_20		

P29534	Vascular cell adhesion protein 1	110.07	Control_20
Q5U349	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	102.99	Control_20
Q68FT1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	166.39	Control_20
Q64638	UDP-glucuronosyltransferase 1-5	189.42	Control_20
P20720	UDP-glucuronosyltransferase 1-2	96.17	Control_20
Q4KM51	Transcription elongation factor, mitochondrial	74.21	Control_20
R9PXS3	Transcription elongation factor, mitochondrial (Fragment)	74.21	Control_20
Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	137.61	Control_20
D3ZVU1	SprT-like domain-containing protein Spartan	180.37	Control_20
O35412	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	31.96	Control_20
Q63556	Serine protease inhibitor A3M (Fragment)	74.51	Control_20
Q80WD1	Reticulon-4 receptor-like 2	101.57	Control_20
AOA096MJA0	RCG44919, isoform CRA_b	287.44	Control_20
D4AB73	Putative uncharacterized protein RGD1559496_predicted	168.54	Control_20
D4A5D7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12	86.84	Control_20
B0BNH4	Protein Zfp637	88.77	Control_20
D3ZN52	Protein Triobp	42	Control_20
D3ZHT2	Protein Triobp	43.54	Control_20
D3ZM09	Protein Sars2	112.54	Control_20
F1M513	Protein Rufy4	84.19	Control_20

D4A8D2	Protein Rdh8	106.6	Control_20
Q4QR81	Protein Rbms2	81.96	Control_20
F1MAA5	Protein Rangap1	87.28	Control_20
D3ZVH2	Protein RGD1560831	404.28	Control_20
D3ZFB8	Protein RGD1308775	114.56	Control_20
D4A8S2	Protein RGD1307603	328.05	Control_20
D4A830	Protein Ppa2	99.37	Control_20
F1M575	Protein Nuggc (Fragment)	78.2	Control_20
M0R3L1	Protein Mast4	44.77	Control_20
D3ZMX5	Protein LOC102549710	82.18	Control_20
D4ACR5	Protein LOC100911971	78.19	Control_20
D3ZCW3	Protein LOC100911971	98.01	Control_20
M0RA26	Protein LOC100362987	482.88	Control_20
D3ZG07	Protein LOC100360750	222.22	Control_20
D4AC62	Protein Krt222	123.37	Control_20
F1LRS2	Protein Dock7	140.46	Control_20
B2RYJ3	Protein Cul4a	95.54	Control_20
F1LX27	Protein Cngb3 (Fragment)	118.97	Control_20
D3ZP14	Protein Ces2j	182.09	Control_20
D3ZE31	Protein Ces2a	182.09	Control_20

F1LWH5	Protein Catsperg1	118.56	Control_20
D3ZYM6	Protein Calr4	86.17	Control_20
F1M5A1	Protein Calr4 (Fragment)	86.17	Control_20
D4A901	Protein Baiap2l2	77.82	Control_20
D4A5X8	Protein Ahcyl1	125.24	Control_20
M0R6F2	Protein Acad10	71.76	Control_20
F1M8L5	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
D4A882	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	115.27	Control_20
P62963	Profilin-1	146.36	Control_20
F1LM18	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
Q00438	Polypyrimidine tract-binding protein 1	70.36	Control_20
D3ZB30	Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_c	70.36	Control_20
Q5U2V4	Phospholipase B-like 1	84.24	Control_20
P07379	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	140.18	Control_20
	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10,		
Q561S0	mitochondrial	257.21	Control_20
E9PTU4	Myosin-11	52.8	Control_20
Q5U2R4	Mitochondrial ribonuclease P protein 1	174.47	Control_20
Q5PPI6	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	69.96	Control_20
F1LQZ9	Microtubule-associated protein 6	207.05	Control_20

Q63560	Microtubule-associated protein 6	224.84	Control_20
Q6QI15	LRRGT00193	109.3	Control_20
Q6QI82	LRRGT00126	84.77	Control_20
Q6TXE9	LRRGT00050	92.4	Control_20
F1LLW4	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q5R212	Inactive serine protease 35	120.36	Control_20
Q56R16	Importin subunit alpha-6	109.03	Control_20
F1LZJ4	Hydroxypyruvate isomerase	90.78	Control_20
Q00729	Histone H2B type 1-A	275.94	Control_20
P06866	Haptoglobin	99.46	Control_20
Q68FY4	Group specific component	151.97	Control_20
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	117.44	Control_20
Q07071	Glucokinase regulatory protein	165.9	Control_20
D3ZA46	Gem-interacting protein (Predicted)	105.03	Control_20
D3ZBM3	Ferrochelatase	93.32	Control_20
F1LMQ2	Farnesyl pyrophosphate synthase	114.63	Control_20
F1LND7	Farnesyl pyrophosphate synthase	162.74	Control_20
P05369	Farnesyl pyrophosphate synthase	163.42	Control_20
B2RZA1	Dock7 protein	133.45	Control_20
Q6IMK5	Diamine oxidase-like protein 2	98.2	Control_20

Q6P725	Desmin	72.51	Control_20
P48675	Desmin	72.51	Control_20
P06214	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	153.83	Control_20
P54275	DNA mismatch repair protein Msh2	71.97	Control_20
B1WBQ7	DNA mismatch repair protein Msh2	73.16	Control_20
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	305.26	Control_20
Q5M9I5	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	2111.09	Control_20
P20816	Cytochrome P450 4A2	149.65	Control_20
H7C5X2	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
P20817	Cytochrome P450 4A14	149.65	Control_20
F1M7X1	Cytochrome P450 4A14 (Fragment)	94.22	Control_20
Q66HE7	Cyclin-dependent kinase-like 1	117.82	Control_20
D4A4Z0	Coiled-coil domain containing 12 (Predicted), isoform CRA_a	107.49	Control_20
G3V836	Clusterin	125.09	Control_20
P05371	Clusterin	143.57	Control_20
F1M779	Clathrin heavy chain	83.68	Control_20
P11442	Clathrin heavy chain 1	86.58	Control_20
Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	144.59	Control_20
G3V936	Citrate synthase	144.59	Control_20
F1LPU4	Choline O-acetyltransferase	134.18	Control_20

P32738	Choline O-acetyltransferase	149.86	Control_20
Q66H89	Centrosomal protein of 83 kDa	117.89	Control_20
Q63108	Carboxylesterase 1E	162.2	Control_20
P10959	Carboxylesterase 1C	132.83	Control_20
Q8K3P6	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	104.53	Control_20
Q3B8N9	Biphenyl hydrolase-like (Serine hydrolase)	179.35	Control_20
Q64057	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	94.61	Control_20
	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (Dihydrodiol dehydrogenase 1 20-alpha		
Q3MHS3	(3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	1000.27	Control_20
Q6AYQ2	Aldo-keto reductase family 1 member C21	1040.58	Control_20
P37136	Acetylcholinesterase	93.13	Control_20
Q7TP62	Ab2-073	126.87	Control_20
O35817	A-kinase anchor protein 14	98.79	Control_20
P21531	60S ribosomal protein L3	88.4	Control_20
P62909	40S ribosomal protein S3	422.08	Control_20
Q498T4	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	91.97	Control_20
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	158.39	50mgF/L_20
F7FK40	Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c	167.39	50mgF/L_20
Q6AZ25	Tropomyosin 1, alpha	167.39	50mgF/L_20
P70541	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma	77.31	50mgF/L_20

Q4FZT0	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	84.3	50mgF/L_20
Q920G0	Src kinase-associated phosphoprotein 2	84.33	50mgF/L_20
Q499U1	Solute carrier family 25 member 38	122.06	50mgF/L_20
P22006	Seminal vesicle secretory protein 2	67.83	50mgF/L_20
Q5U2T3	SPATS2-like protein	158.27	50mgF/L_20
Q6SA80	Rho-related GTP-binding protein RhoE	123.8	50mgF/L_20
P04785	Protein disulfide-isomerase	75.64	50mgF/L_20
Q99PJ6	Protein Zfp709	120.62	50mgF/L_20
F1M0H0	Protein Zfp318 (Fragment)	83.15	50mgF/L_20
M0RD44	Protein Zfp318 (Fragment)	66.03	50mgF/L_20
D3ZZ25	Protein Zfp280c	82.01	50mgF/L_20
Q5XI44	Protein Xrcc4	81.56	50mgF/L_20
F1LZ35	Protein Wdr88 (Fragment)	80.8	50mgF/L_20
D3ZZY2	Protein Utp14a	83.37	50mgF/L_20
D4A7S9	Protein Trim45	87.05	50mgF/L_20
Q6AXW2	Protein Tmod3	76.01	50mgF/L_20
G3V9T2	Protein Tmf1	86.82	50mgF/L_20
D3ZYF8	Protein Tm2d1	79.95	50mgF/L_20
F1LUQ3	Protein Tet1	73.15	50mgF/L_20
F6PUS4	Protein Sh3d21	92.79	50mgF/L_20

Q6P6X2	Protein Sema1	65.86	50mgF/L_20
D4AAU5	Protein Rassf8	92.07	50mgF/L_20
F1LYB7	Protein Rad54b	95.03	50mgF/L_20
D3ZD48	Protein Rab11fip2	79.04	50mgF/L_20
Q6AYH8	Protein RGD1359634	97.81	50mgF/L_20
M0R9L0	Protein Naca	66.17	50mgF/L_20
G3V810	Protein Mtmr10	80.83	50mgF/L_20
D3ZAA6	Protein Lcor	72.18	50mgF/L_20
M0R6S6	Protein LOC689679 (Fragment)	113.95	50mgF/L_20
F1M0Q4	Protein LOC679594 (Fragment)	229.05	50mgF/L_20
D3ZND8	Protein LOC100911271	135.25	50mgF/L_20
Q6IFU9	Protein Krt16	136.61	50mgF/L_20
M0R9K1	Protein Gm7964	78.1	50mgF/L_20
AOA096MJY6	Protein Gbe1	83.6	50mgF/L_20
D4ABF1	Protein Esco2	89.38	50mgF/L_20
AOA096MJS9	Protein Esco2	93.38	50mgF/L_20
F7F3M3	Protein Ces2a	92.02	50mgF/L_20
M0RC14	Protein Cchcr1 (Fragment)	65.84	50mgF/L_20
D4A317	Protein Ccdc18	157.88	50mgF/L_20
D3ZKA3	Protein Ccdc18	140.28	50mgF/L_20

D3ZU26	Protein Bhlhe23	117.59	50mgF/L_20
Q6AYD8	Protein Arhgap8	113.48	50mgF/L_20
D3ZK29	Protein Alkbh8	74.76	50mgF/L_20
P15387	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	89.38	50mgF/L_20
P29524	Plasminogen activator inhibitor 2 type A	151.58	50mgF/L_20
P52944	PDZ and LIM domain protein 1	129.72	50mgF/L_20
D3ZDB9	NmrA-like family domain-containing protein 1	120.2	50mgF/L_20
P86172	NmrA-like family domain-containing protein 1 (Fragments)	122.57	50mgF/L_20
W4VSR4	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20
B5DFC9	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20
Q80Z29	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	77.52	50mgF/L_20
P13697	NADP-dependent malic enzyme	73.87	50mgF/L_20
F1M754	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 (Predicted)	83.49	50mgF/L_20
F1LNK0	Microtubule-associated protein	124.87	50mgF/L_20
Q78DZ1	Microtubule-associated protein	115.84	50mgF/L_20
P15146	Microtubule-associated protein 2	129.39	50mgF/L_20
F1LQQ1	Malic enzyme (Fragment)	69.2	50mgF/L_20
Q3KR86	MICOS complex subunit Mic60 (Fragment)	76.6	50mgF/L_20
Q8K1Q4	Leucine zipper putative tumor suppressor 3	82.54	50mgF/L_20
F1LMK6	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20

P09367	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20
P10867	L-gulonolactone oxidase	80.09	50mgF/L_20
D4A4V3	Kruppel-like factor 3 (Basic) (Mapped), isoform CRA_b	87.45	50mgF/L_20
Q6IG12	Keratin, type II cytoskeletal 7	102.85	50mgF/L_20
G3V712	Keratin complex 2, basic, gene 7, isoform CRA_a	77.46	50mgF/L_20
D3ZVV1	KH domain-containing protein 3	73.5	50mgF/L_20
Q5D059	Hnrpk protein	106.71	50mgF/L_20
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	106.71	50mgF/L_20
P48317	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha	93.04	50mgF/L_20
P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	87.46	50mgF/L_20
Q5M964	Fumarate hydratase 1	86.44	50mgF/L_20
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	213.27	50mgF/L_20
P31977	Ezrin	97.78	50mgF/L_20
Q6AYG2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	79.49	50mgF/L_20
F1M7X5	Dipeptidyl peptidase 4	100.36	50mgF/L_20
P14740	Dipeptidyl peptidase 4	100.61	50mgF/L_20
P11348	Dihydropteridine reductase	90.27	50mgF/L_20
D3ZH41	Cytoskeleton-associated protein 4 (Predicted)	117.08	50mgF/L_20
P11950	Cytochrome c oxidase subunit 6C-1	211.6	50mgF/L_20
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	196.2	50mgF/L_20

G3V802	Cyclin A2, isoform CRA_b	104.32	50mgF/L_20
F1LS40	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
P02466	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
Q66HA5	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	78.81	50mgF/L_20
B4F7A7	Centrosomal protein of 57 kDa	83.72	50mgF/L_20
Q8R2H3	Barttin	92.26	50mgF/L_20
D4A4U2	Bardet-Biedl syndrome 1 homolog (Human) (Predicted), isoform CRA_a	98.14	50mgF/L_20
D3ZR43	Angiopoietin 4 (Predicted)	82.39	50mgF/L_20
Q6EV76	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	80.89	50mgF/L_20
D4IGX4	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	79.2	50mgF/L_20
G3V7I5	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
Q66HF8	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
P70470	Acyl-protein thioesterase 1	83.26	50mgF/L_20
F1M9A7	Acyl-coenzyme A oxidase	74.49	50mgF/L_20
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	84.28	50mgF/L_20
P24008	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	500.62	50mgF/L_20
G8JLS2	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1 (Fragment)	500.62	50mgF/L_20
P97532	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	106.16	50mgF/L_20
Q62904	3-keto-steroid reductase	93.81	50mgF/L_20
G3V9P0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20

Q9WTV5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	67.14	50mgF/L_20

Tabela 4. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo controle 60 dias vs.15 mgF/L 60 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão Control_60:15mgF/L_60_	Valor de P Control_60:15 mgF/L_60
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3638.55		0.6313	0.04
F1LMG2	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2	3598.83		0.7711	0.05
Q68FT5	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2	3598.83		0.7866	0.04
Q03336	Regucalcin	3100.35		0.6505	0.04
P12928	Pyruvate kinase PKLR	230.15		0.4584	0.04
Q62669	Protein Hbb-b1	2945.66		4.0552	0.99
D3ZRN3	Protein Actbl2	1203.07		0.5220	0.02
P22791	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	3586		0.7189	0.02
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	2606.79		0.5655	0.01
P04904	Glutathione S-transferase alpha-3	5083.03		0.7634	0.05
P04903	Glutathione S-transferase alpha-2	5083.03		0.7334	0.03
P00502	Glutathione S-transferase alpha-1	5101.24		0.7483	0.05
D3ZD94	Glutathione S-transferase	2606.79		0.6250	0.04

F1LVC6	Glutathione S-transferase	2606.79	0.6771	0.04
Q4FZZ3	Glutathione S-transferase	5083.03	0.7334	0.03
F7F2H5	Glutathione S-transferase (Fragment)	5083.03	0.7788	0.05
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	16767.23	0.7047	0.04
O88752	Epsilon 1 globin	8167.94	0.8694	0.05
P28037	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1264.57	0.6250	0.04
P07756	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	4852.95	0.8353	0.00
O09171	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	7670.86	0.7118	0.00
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18	0.3906	0.00
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63	0.5945	0.00
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63	0.5886	0.00
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63	0.5945	0.00
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29	0.3985	0.00
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29	0.3946	0.00
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29	0.3867	0.00
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4191.22	0.7261	0.03
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	4191.22	0.7118	0.03
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	5931.83	0.6703	0.00
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	5906.37	0.6637	0.03
G3V9U2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4262.02	0.7047	0.03

P13437	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4495.19	0.7118	0.03
	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog			
Q5PQS3	1	66.3	Control_60	
P19488	UDP-glucuronosyltransferase 2B37	167	Control_60	
D3ZLR6	UDP-glucuronosyltransferase 2B17	292.04	Control_60	
Q6DG50	TANK-binding kinase 1-binding protein 1	75.78	Control_60	
P17988	Sulfotransferase 1A1	255.73	Control_60	
Q66H48	Protein Zfp219	69.29	Control_60	
B2RYG3	Protein Vps9d1	71.61	Control_60	
A0A096MJB5	Protein Unc45b	52.37	Control_60	
B0BMT9	Protein Sqrdl	532.65	Control_60	
F1LP26	Protein Shroom3	64.44	Control_60	
D4A2W9	Protein Samhd1	71.99	Control_60	
D3Z898	Protein Samhd1	74.1	Control_60	
D3ZSX9	Protein S100pbp	110.98	Control_60	
D4A306	Protein Rnf207	74.86	Control_60	
D4A0E2	Protein Napg	84.22	Control_60	
D3ZB33	Protein Mex3a	97.72	Control_60	
G3V614	Protein LOC606294	73.84	Control_60	
A0A096MKF2	Protein LOC100911797	63.6	Control_60	

M0RC68	Protein LOC100911797	63.6	Control_60
D3ZET2	Protein LOC100910851	64.03	Control_60
F1LME8	Protein LOC100364352	142.64	Control_60
D4A2Y3	Protein Immp2l	943.86	Control_60
F1M5Q2	Protein Gpr161 (Fragment)	74.34	Control_60
D3ZWF2	Protein Fbrs	62.32	Control_60
D3ZXM4	Protein Evi5l	87.46	Control_60
D3ZN21	Protein Ddx3y	158.57	Control_60
E9PT29	Protein Ddx17	151.59	Control_60
M0RB90	Protein Cyp2c6v1	143.54	Control_60
D4A9A3	Protein Cenpv	99.48	Control_60
D3ZG65	Protein 4930562C15Rik	60.73	Control_60
B1WCA0	MgF/L1d protein	100.24	Control_60
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	98.68	Control_60
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	157.1	Control_60
P25977	Nucleolar transcription factor 1	113.1	Control_60
C9DQJ9	Neuralized 2	70.27	Control_60
D4ACU5	NADPH oxidase organizer 1 (Predicted)	70.82	Control_60
Q5XIF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	173.04	Control_60

	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-		
Q5M876	forming)	116.36	Control_60
D3ZCQ9	Myeloid leukemia factor 1 (Predicted), isoform CRA_a	84.97	Control_60
Q00566	Methyl-CpG-binding protein 2	114.33	Control_60
F1LWH6	Methyl-CpG-binding protein 2 (Fragment)	86.57	Control_60
P70580	Membrane-associated progesterone receptor component 1	803.1	Control_60
F1LPD4	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
M0RBQ9	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
Q69CM7	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
	Loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 homolog		
B1H257	(Human)	152.01	Control_60
Q5RJR8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	80.19	Control_60
Q6QI43	LRRGT00165	114.74	Control_60
Q4G074	KIF1-binding protein	73.84	Control_60
P97697	Inositol monophosphatase 1	135.46	Control_60
Q63772	Growth arrest-specific protein 6	81.33	Control_60
P47819	Glial fibrillary acidic protein	87.71	Control_60
M0RAK4	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
A0A0A0MXX7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
D3ZYW7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60

Q9JMA8	Exostoses (Multiple)-like 3, isoform CRA_a	66.12	Control_60
D3ZYU0	Enolase	209.26	Control_60
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	75.22	Control_60
D3ZMM4	ERC protein 2	70.73	Control_60
Q8K3M6	ERC protein 2	89.53	Control_60
	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48		
F1LM69	kDa subunit	83.81	Control_60
	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48		
Q641Y0	kDa subunit	83.81	Control_60
Q8K4C0	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	82.13	Control_60
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	69.59	Control_60
F1M5T2	Diacylglycerol kinase (Fragment)	142.97	Control_60
Q6AYI1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	158.64	Control_60
A0A096MIX2	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	178.8	Control_60
Q4KLZ3	DAZ associated protein 1	106.97	Control_60
P05178	Cytochrome P450 2C6	154.23	Control_60
D4A519	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60
P20812	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60
	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5 (Predicted),		
F7FF20	isoform CRA_a	73.5	Control_60

A0A096MK76	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
G3V7M5	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
Q9QZC4	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
F1M835	Carbonyl reductase family member 4	138.39	Control_60
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	67.75	Control_60
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	80.11	Control_60
	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like		
Q3KR97	protein 1	83.34	Control_60
D3ZCC5	Ankyrin repeat domain 24 (Predicted), isoform CRA_d	111.4	Control_60
B1WC89	Ankrd58 protein	73.6	Control_60
O35460	Angiopoietin-1	92.76	Control_60
F1LSB2	Angiopoietin 1, isoform CRA_a	92.76	Control_60
Q4V7C7	Actin-related protein 3	66.37	Control_60
D3ZNZ8	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
Q71TY3	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	367.06	Control_60
Q4V8I7	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8A	75.04	15mgF/L_60
D4A4D7	Transcription factor E2F7	88.95	15mgF/L_60
Q68FQ0	T-complex protein 1 subunit epsilon	69.77	15mgF/L_60
O35913	Solute carrier organic anion transporter family member 1A4	89.92	15mgF/L_60

Q68FT9	Selenocysteine lyase	89.33	15mgF/L_60
P10362	Secretogranin-2	118.67	15mgF/L_60
G3V7X2	Secretogranin 2, isoform CRA_a	118.67	15mgF/L_60
M0RCD2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	82.43	15mgF/L_60
Q64578	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	140.49	15mgF/L_60
Q68H95	Replication initiator 1	73.14	15mgF/L_60
D4ADS8	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
P05714	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	201.29	15mgF/L_60
P05712	Ras-related protein Rab-2A	135.16	15mgF/L_60
F1LP82	Ras-related protein Rab-2A (Fragment)	126.1	15mgF/L_60
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	200.84	15mgF/L_60
E9PU16	Ras-related protein Rab-1A	195.3	15mgF/L_60
Q641Y6	Protein phosphatase 1J	84.46	15mgF/L_60
Q3KR94	Protein Vtn	71.8	15mgF/L_60
M0RCU5	Protein Urad	144.28	15mgF/L_60
A0A096MK54	Protein Synm	83.47	15mgF/L_60
G3V9G5	Protein Synm	76.36	15mgF/L_60
M0R8U7	Protein Spata17 (Fragment)	67.19	15mgF/L_60
Q5BK40	Protein RGD1304978	89.91	15mgF/L_60

MOR9S1	Protein Ppip5k2	87.43	15mgF/L_60
A0A096MK18	Protein Ppip5k2 (Fragment)	91.99	15mgF/L_60
D4A498	Protein Pcdhga12	102.22	15mgF/L_60
D4AAD0	Protein Nxpe5	60.89	15mgF/L_60
F1M111	Protein Myo5c	69.17	15mgF/L_60
D3ZFU9	Protein Mylk	62.44	15mgF/L_60
G3V6I4	Protein Marc1	111.94	15mgF/L_60
F1M031	Protein LOC685707	50.48	15mgF/L_60
F1LYK3	Protein LOC685707	52.78	15mgF/L_60
F1M6Y0	Protein LOC685590	81.19	15mgF/L_60
M0RAK2	Protein LOC684270	87.84	15mgF/L_60
F1M3E2	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCE0	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCG4	Protein LOC100910474	321.7	15mgF/L_60
D3ZZJ5	Protein LOC100910070	134.66	15mgF/L_60
D4A9D9	Protein LOC100361746	108.96	15mgF/L_60
M0RC85	Protein Cntrob	73.54	15mgF/L_60
D3ZE93	Protein Ceacam19	97.99	15mgF/L_60
D4A3J9	Protein Ccp110 (Fragment)	101.91	15mgF/L_60
F1M8E1	Protein Ccdc74a	252.06	15mgF/L_60

D3ZHH5	Protein Ccdc158	73.46	15mgF/L_60
D4A095	Protein Ccdc112	87.46	15mgF/L_60
F1M7M4	Protein Bmp2k (Fragment)	63.54	15mgF/L_60
D3ZCV0	Protein Actn2	211.98	15mgF/L_60
P83868	Prostaglandin E synthase 3	137.48	15mgF/L_60
R9PXR7	Prostaglandin E synthase 3 (Fragment)	137.48	15mgF/L_60
P10499	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	136.9	15mgF/L_60
O35263	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	81.91	15mgF/L_60
D3ZA44	Phospholipase A2, group IIE (Predicted), isoform CRA_a	97.94	15mgF/L_60
	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1		
D3ZVP6	(Predicted)	77.72	15mgF/L_60
	Nucleolar and spindle associated protein 1 (Predicted), isoform		
D4AAK2	CRA_a	83.42	15mgF/L_60
Q99P77	Nucleolar GTP-binding protein 1	64.57	15mgF/L_60
Q63083	Nucleobindin-1	185.66	15mgF/L_60
Q5RJQ4	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	80.7	15mgF/L_60
G3V9F3	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	77.86	15mgF/L_60
Q9ERE6	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	86.66	15mgF/L_60
Q64119	Myosin light polypeptide 6	321.7	15mgF/L_60
MOR4E1	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60

P17209	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60
F6Q5K7	Mitochondrial ribosomal protein S18B, isoform CRA_a	119.05	15mgF/L_60
Q5XIT9	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	73.28	15mgF/L_60
Q5XI30	McKusick-Kaufman syndrome	98.26	15mgF/L_60
D3ZLJ9	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q63679	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q6MG45	Lymphotoxin B	73.27	15mgF/L_60
F1LRA5	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	88.43	15mgF/L_60
B2BKY8	LYST-interacting protein 8	75.16	15mgF/L_60
B5DF44	Kctd15 protein	95.54	15mgF/L_60
P12007	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	598.02	15mgF/L_60
D3ZSV1	Hypothetical LOC287541 (Predicted), isoform CRA_c	90.11	15mgF/L_60
G3V653	Homeobox protein unc-4 homolog	97.4	15mgF/L_60
P97830	Homeobox protein unc-4 homolog	97.4	15mgF/L_60
D4A6K4	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (Predicted)	89.48	15mgF/L_60
P09812	Glycogen phosphorylase, muscle form	145.82	15mgF/L_60
P00489	Glycogen phosphorylase, muscle form	128.21	15mgF/L_60
Q6RI88	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4	74.73	15mgF/L_60
A0A0A0MY02	E2F transcription factor 7 (Predicted), isoform CRA_a	83.25	15mgF/L_60
O08769	Cyclin dependent kinase inhibitor	93.19	15mgF/L_60

Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	109.93	15mgF/L_60
Q4V8G7	Centromere protein U	70.07	15mgF/L_60
P62161	Calmodulin	256.79	15mgF/L_60
P11275	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	62.47	15mgF/L_60
O88480	Calcineurin-binding protein cabin-1	98.44	15mgF/L_60
G3V650	Calcineurin binding protein 1, isoform CRA_a	91.11	15mgF/L_60
Q6AYB8	Basic leucine zipper nuclear factor 1	138.96	15mgF/L_60
Q9ER24	Ataxin-10	92.15	15mgF/L_60
A5GZY2	Arg3.1/Arc mRNA-binding zinc finger protein	100.52	15mgF/L_60
B5DF97	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	75.8	15mgF/L_60
G3V8V3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	159.26	15mgF/L_60
Q8R4I6	Actinin alpha 3, isoform CRA_a	162.67	15mgF/L_60

Tabela 5. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo controle 60 dias vs.50 mgF/L 60 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão	
				Control_60:50mgF/L_60_	Valor de P Control_60:50 mgF/L_60
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3638.55		0.6250	0.02
M3ZCQ3	Protein LOC100910765 O	2945.66		3.0957	0.99
Q62669	Protein Hbb-b1	2945.66		3.1268	0.99
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	3660.95		0.5945	0.04
O88752	Epsilon 1 globin O	8167.94		0.7945	0.02
P14141	Carbonic anhydrase 3	859.22		0.5655	0.00
P07756	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	4852.95		0.8781	0.00
Q5PQS3	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog 1	66.3	Control_60		
P19488	UDP-glucuronosyltransferase 2B37	167	Control_60		
D3ZLR6	UDP-glucuronosyltransferase 2B17	292.04	Control_60		
Q6DG50	TANK-binding kinase 1-binding protein 1	75.78	Control_60		
P17988	Sulfotransferase 1A1	255.73	Control_60		
Q66H48	Protein Zfp219	69.29	Control_60		
B2RYG3	Protein Vps9d1	71.61	Control_60		

A0A096MJB5	Protein Unc45b	52.37	Control_60
B0BMT9	Protein Sqrld	532.65	Control_60
F1LP26	Protein Shroom3	64.44	Control_60
D4A2W9	Protein Samhd1	71.99	Control_60
D3Z898	Protein Samhd1	74.1	Control_60
D3ZSX9	Protein S100pbp	110.98	Control_60
D4A306	Protein Rnf207	74.86	Control_60
D4A0E2	Protein Napg	84.22	Control_60
D3ZB33	Protein Mex3a	97.72	Control_60
G3V614	Protein LOC606294	73.84	Control_60
A0A096MKF2	Protein LOC100911797	63.6	Control_60
M0RC68	Protein LOC100911797	63.6	Control_60
D3ZET2	Protein LOC100910851	64.03	Control_60
F1LME8	Protein LOC100364352	142.64	Control_60
D4A2Y3	Protein Immp2l	943.86	Control_60
F1M5Q2	Protein Gpr161 (Fragment)	74.34	Control_60
D3ZWF2	Protein Fbrs	62.32	Control_60
D3ZXM4	Protein Evi5l	87.46	Control_60
D3ZN21	Protein Ddx3y	158.57	Control_60
E9PT29	Protein Ddx17	151.59	Control_60
M0RB90	Protein Cyp2c6v1	143.54	Control_60

D4A9A3	Protein Cenpv	99.48	Control_60
D3ZG65	Protein 4930562C15Rik	60.73	Control_60
B1WCA0	MgF/L1d protein	100.24	Control_60
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	98.68	Control_60
P24368	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	157.1	Control_60
P25977	Nucleolar transcription factor 1	113.1	Control_60
C9DQJ9	Neuralized 2	70.27	Control_60
D4ACU5	NADPH oxidase organizer 1 (Predicted)	70.82	Control_60
Q5XIF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	173.04	Control_60
Q5M876	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate- forming)	116.36	Control_60
D3ZCQ9	Myeloid leukemia factor 1 (Predicted), isoform CRA_a	84.97	Control_60
Q00566	Methyl-CpG-binding protein 2	114.33	Control_60
F1LWH6	Methyl-CpG-binding protein 2 (Fragment)	86.57	Control_60
P70580	Membrane-associated progesterone receptor component 1	803.1	Control_60
F1LPD4	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
M0RBQ9	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
Q69CM7	MYCBP-associated protein	78.22	Control_60
B1H257	Loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 homolog (Human)	152.01	Control_60

Q5RJR8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	80.19	Control_60
Q6QI43	LRRGT00165	114.74	Control_60
Q4G074	KIF1-binding protein	73.84	Control_60
P97697	Inositol monophosphatase 1	135.46	Control_60
Q63772	Growth arrest-specific protein 6	81.33	Control_60
P47819	Glial fibrillary acidic protein	87.71	Control_60
M0RAK4	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
A0A0A0MXX7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
D3ZYW7	Frataxin, mitochondrial	174.92	Control_60
Q9JMA8	Exostoses (Multiple)-like 3, isoform CRA_a	66.12	Control_60
D3ZYU0	Enolase	209.26	Control_60
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	75.22	Control_60
D3ZMM4	ERC protein 2	70.73	Control_60
Q8K3M6	ERC protein 2	89.53	Control_60
	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase		
F1LM69	48 kDa subunit	83.81	Control_60
	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase		
Q641Y0	48 kDa subunit	83.81	Control_60
Q8K4C0	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	82.13	Control_60
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	69.59	Control_60
F1M5T2	Diacylglycerol kinase (Fragment)	142.97	Control_60

Q6AYI1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	158.64	Control_60
A0A096MIX2	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	178.8	Control_60
Q4KLZ3	DAZ associated protein 1	106.97	Control_60
P05178	Cytochrome P450 2C6	154.23	Control_60
D4A519	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60
P20812	Cytochrome P450 2A3	83.18	Control_60
	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5 (Predicted),		
F7FF20	isoform CRA_a	73.5	Control_60
A0A096MK76	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
G3V7M5	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
Q9QZC4	Choline-phosphate cytidyltransferase B	60.93	Control_60
F1M835	Carbonyl reductase family member 4	138.39	Control_60
P47727	Carbonyl reductase [NADPH] 1	67.75	Control_60
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	80.11	Control_60
	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like		
Q3KR97	protein 1	83.34	Control_60
D3ZCC5	Ankyrin repeat domain 24 (Predicted), isoform CRA_d	111.4	Control_60
B1WC89	Ankrd58 protein	73.6	Control_60
O35460	Angiopoietin-1	92.76	Control_60
F1LSB2	Angiopoietin 1, isoform CRA_a	92.76	Control_60
Q4V7C7	Actin-related protein 3	66.37	Control_60

D3ZNZ8	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
Q71TY3	40S ribosomal protein S27	90.36	Control_60
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	367.06	Control_60
Q5U2Y0	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	95.92	50mgF/L_60
D3ZAH8	Unconventional myosin-IXb	59.24	50mgF/L_60
Q63358	Unconventional myosin-IXb	60.38	50mgF/L_60
Q5PQJ7	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	142.61	50mgF/L_60
Q5XIE2	Transcription termination factor 2, mitochondrial	146.18	50mgF/L_60
D3ZGJ6	Sulfotransferase	102.23	50mgF/L_60
B2RYN7	Spastin	76.48	50mgF/L_60
Q499P8	RUS1 family protein C16orf58 homolog	107.42	50mgF/L_60
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	93.62	50mgF/L_60
G3V9H8	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	97.84	50mgF/L_60
D3ZLD2	Protein Zmat5	108.83	50mgF/L_60
D3ZQ09	Protein Zcchc24	79.97	50mgF/L_60
D3Z844	Protein Wdr59	66.17	50mgF/L_60
D3ZGZ9	Protein Wdr59	70.08	50mgF/L_60
D3ZZE0	Protein Topors	85.5	50mgF/L_60
F1LU14	Protein Snx32	108.68	50mgF/L_60
F1LYA7	Protein Skint8	70.65	50mgF/L_60
G3V8P5	Protein RGD1310127	107.42	50mgF/L_60

A0A096MJT6	Protein RGD1307100	88.91	50mgF/L_60
D4A1I0	Protein RGD1307100	78.57	50mgF/L_60
F1LXJ9	Protein Ptppt	60.46	50mgF/L_60
A0A096MKF4	Protein Psme3	174.95	50mgF/L_60
G3V7S9	Protein Odf2l	59.74	50mgF/L_60
D3ZC87	Protein Maff	120.78	50mgF/L_60
M0RB42	Protein LOC687532 (Fragment)	82.6	50mgF/L_60
D3Z8A7	Protein LOC685081	87.04	50mgF/L_60
D3ZM54	Protein LOC679087	66.59	50mgF/L_60
M0R3K9	Protein LOC365828 (Fragment)	310.56	50mgF/L_60
D3ZQX9	Protein LOC102552796	72.55	50mgF/L_60
F1LVB0	Protein LOC100912642 (Fragment)	91.33	50mgF/L_60
M0R5K9	Protein LOC100912024 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
M0RCJ9	Protein LOC100911027	96.12	50mgF/L_60
D3ZM33	Protein LOC100362298 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
D4AAW0	Protein Kansl1	37.01	50mgF/L_60
F1LXF5	Protein Get4	86.29	50mgF/L_60
M0R3K5	Protein Gdf5	135.76	50mgF/L_60
M0RAY4	Protein Gdf5	137.71	50mgF/L_60
F1LYN0	Protein Fam47e (Fragment)	88.84	50mgF/L_60
D4ACA6	Protein Elmsan1	55.59	50mgF/L_60

F7F7H4	Protein Dock2	38.54	50mgF/L_60
O88767	Protein DJ-1	293.33	50mgF/L_60
M0R3U4	Protein Crtap	71.44	50mgF/L_60
M0R4S7	Protein Ccdc13	84.24	50mgF/L_60
F1LQ08	Protein Car6	57.14	50mgF/L_60
F1LMH8	Protein Btrc (Fragment)	78.83	50mgF/L_60
F1LPB4	Protein Akap9	57.83	50mgF/L_60
Q64240	Protein AMBP	78.63	50mgF/L_60
F7ESM5	Nitrilase 1, isoform CRA_a	115.41	50mgF/L_60
	Myosin, light polypeptide 7, regulatory (Predicted), isoform		
F1M7K3	CRA_a	128.95	50mgF/L_60
	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46		
E9PTS4	(S. cerevisiae) (Predicted)	166.34	50mgF/L_60
Q6IMY1	Microtubule-associated tumor suppressor 1 homolog	75.94	50mgF/L_60
P35400	Metabotropic glutamate receptor 7	76.94	50mgF/L_60
F1LZS5	Metabotropic glutamate receptor 7 (Fragment)	63.93	50mgF/L_60
D4A0L1	MON1 homolog b (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b	80.16	50mgF/L_60
Q7TPB7	MAL2A	96.12	50mgF/L_60
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	130.31	50mgF/L_60
D3ZHG2	Kinesin light chain 1	108.75	50mgF/L_60
P37285	Kinesin light chain 1	114.83	50mgF/L_60

D4ABK9	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	88.91	50mgF/L_60
Q80W66	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	157.37	50mgF/L_60
Q62867	Gamma-glutamyl hydrolase	93.77	50mgF/L_60
Q6XDA0	Erythroid spectrin beta	58.41	50mgF/L_60
Q4V8C2	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	69.51	50mgF/L_60
Q8VIP2	Carbohydrate-responsive element-binding protein	83.79	50mgF/L_60
	Amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (Glycogen debranching enzyme, glycogen storage disease type III)		
D4AEH9	(Predicted), isoform CRA_a	73.24	50mgF/L_60
Q499S2	ATP synthase F(0) complex subunit C3, mitochondrial	78.27	50mgF/L_60
P62271	40S ribosomal protein S18	162.85	50mgF/L_60
P62250	40S ribosomal protein S16	498.1	50mgF/L_60
P62282	40S ribosomal protein S11	100.13	50mgF/L_60

Tabela 6. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo 50mgF/L 20 dias vs.15 mgF/L 20 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão 50mgF/L_20:15mgF/L_20_	Valor de P 50mgF/L_20:15 mgF/L_20
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	17634.75		0.8694	0.03
P09811	Glycogen phosphorylase, liver form	86.83		0.1999	0.02
O88752	Epsilon 1 globin	8167.94		0.8437	0.03
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18		1.3499	0.99
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63		1.2712	1.00
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63		1.2969	0.98
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63		1.2712	1.00
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29		1.3364	0.98
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29		1.3499	0.99
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29		1.3499	0.98
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	158.39	50mgF/L_20		
F7FK40	Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c	167.39	50mgF/L_20		
Q6AZ25	Tropomyosin 1, alpha	167.39	50mgF/L_20		
P70541	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma	77.31	50mgF/L_20		
Q4FZT0	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	84.3	50mgF/L_20		
Q920G0	Src kinase-associated phosphoprotein 2	84.33	50mgF/L_20		

Q499U1	Solute carrier family 25 member 38	122.06	50mgF/L_20
P22006	Seminal vesicle secretory protein 2	67.83	50mgF/L_20
Q5U2T3	SPATS2-like protein	158.27	50mgF/L_20
Q6SA80	Rho-related GTP-binding protein RhoE	123.8	50mgF/L_20
P04785	Protein disulfide-isomerase	75.64	50mgF/L_20
Q99PJ6	Protein Zfp709	120.62	50mgF/L_20
F1M0H0	Protein Zfp318 (Fragment)	83.15	50mgF/L_20
M0RD44	Protein Zfp318 (Fragment)	66.03	50mgF/L_20
D3ZZ25	Protein Zfp280c	82.01	50mgF/L_20
Q5XI44	Protein Xrcc4	81.56	50mgF/L_20
F1LZ35	Protein Wdr88 (Fragment)	80.8	50mgF/L_20
D3ZZY2	Protein Utp14a	83.37	50mgF/L_20
D4A7S9	Protein Trim45	87.05	50mgF/L_20
Q6AXW2	Protein Tmod3	76.01	50mgF/L_20
G3V9T2	Protein Tmf1	86.82	50mgF/L_20
D3ZYF8	Protein Tm2d1	79.95	50mgF/L_20
F1LUQ3	Protein Tet1	73.15	50mgF/L_20
F6PUS4	Protein Sh3d21	92.79	50mgF/L_20
Q6P6X2	Protein Semg1	65.86	50mgF/L_20
D4AAU5	Protein Rassf8	92.07	50mgF/L_20
F1LYB7	Protein Rad54b	95.03	50mgF/L_20

D3ZD48	Protein Rab11fip2	79.04	50mgF/L_20
Q6AYH8	Protein RGD1359634	97.81	50mgF/L_20
M0R9L0	Protein Naca	66.17	50mgF/L_20
G3V810	Protein Mtmr10	80.83	50mgF/L_20
D3ZAA6	Protein Lcor	72.18	50mgF/L_20
M0R6S6	Protein LOC689679 (Fragment)	113.95	50mgF/L_20
F1M0Q4	Protein LOC679594 (Fragment)	229.05	50mgF/L_20
D3ZND8	Protein LOC100911271	135.25	50mgF/L_20
Q6IFU9	Protein Krt16	136.61	50mgF/L_20
M0R9K1	Protein Gm7964	78.1	50mgF/L_20
A0A096MJY6	Protein Gbe1	83.6	50mgF/L_20
D4ABF1	Protein Esco2	89.38	50mgF/L_20
A0A096MJS9	Protein Esco2	93.38	50mgF/L_20
F7F3M3	Protein Ces2a	92.02	50mgF/L_20
M0RC14	Protein Cchcr1 (Fragment)	65.84	50mgF/L_20
D4A317	Protein Ccdc18	157.88	50mgF/L_20
D3ZKA3	Protein Ccdc18	140.28	50mgF/L_20
D3ZU26	Protein Bhlhe23	117.59	50mgF/L_20
Q6AYD8	Protein Arhgap8	113.48	50mgF/L_20
D3ZK29	Protein Alkbh8	74.76	50mgF/L_20
P15387	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	89.38	50mgF/L_20

P29524	Plasminogen activator inhibitor 2 type A	151.58	50mgF/L_20
P52944	PDZ and LIM domain protein 1	129.72	50mgF/L_20
D3ZDB9	NmrA-like family domain-containing protein 1	120.2	50mgF/L_20
P86172	NmrA-like family domain-containing protein 1 (Fragments)	122.57	50mgF/L_20
W4VSR4	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20
B5DFC9	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20
Q80Z29	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	77.52	50mgF/L_20
P13697	NADP-dependent malic enzyme	73.87	50mgF/L_20
	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4		
F1M754	(Predicted)	83.49	50mgF/L_20
F1LNK0	Microtubule-associated protein	124.87	50mgF/L_20
Q78DZ1	Microtubule-associated protein	115.84	50mgF/L_20
P15146	Microtubule-associated protein 2	129.39	50mgF/L_20
F1LQQ1	Malic enzyme (Fragment)	69.2	50mgF/L_20
Q3KR86	MICOS complex subunit Mic60 (Fragment)	76.6	50mgF/L_20
Q8K1Q4	Leucine zipper putative tumor suppressor 3	82.54	50mgF/L_20
F1LMK6	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20
P09367	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20
P10867	L-gulonolactone oxidase	80.09	50mgF/L_20
D4A4V3	Kruppel-like factor 3 (Basic) (Mapped), isoform CRA_b	87.45	50mgF/L_20
Q6IG12	Keratin, type II cytoskeletal 7	102.85	50mgF/L_20

G3V712	Keratin complex 2, basic, gene 7, isoform CRA_a	77.46	50mgF/L_20
D3ZVV1	KH domain-containing protein 3	73.5	50mgF/L_20
Q5D059	Hnrpk protein	106.71	50mgF/L_20
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	106.71	50mgF/L_20
P48317	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha	93.04	50mgF/L_20
P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	87.46	50mgF/L_20
Q5M964	Fumarate hydratase 1	86.44	50mgF/L_20
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	213.27	50mgF/L_20
P31977	Ezrin	97.78	50mgF/L_20
Q6AYG2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	79.49	50mgF/L_20
F1M7X5	Dipeptidyl peptidase 4	100.36	50mgF/L_20
P14740	Dipeptidyl peptidase 4	100.61	50mgF/L_20
P11348	Dihydropteridine reductase	90.27	50mgF/L_20
D3ZH41	Cytoskeleton-associated protein 4 (Predicted)	117.08	50mgF/L_20
P11950	Cytochrome c oxidase subunit 6C-1	211.6	50mgF/L_20
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	196.2	50mgF/L_20
G3V802	Cyclin A2, isoform CRA_b	104.32	50mgF/L_20
F1LS40	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
P02466	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
Q66HA5	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	78.81	50mgF/L_20
B4F7A7	Centrosomal protein of 57 kDa	83.72	50mgF/L_20

Q8R2H3	Barttin	92.26	50mgF/L_20
	Bardet-Biedl syndrome 1 homolog (Human) (Predicted), isoform		
D4A4U2	CRA_a	98.14	50mgF/L_20
D3ZR43	Angiopoietin 4 (Predicted)	82.39	50mgF/L_20
Q6EV76	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	80.89	50mgF/L_20
D4IGX4	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	79.2	50mgF/L_20
G3V7I5	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
Q66HF8	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
P70470	Acyl-protein thioesterase 1	83.26	50mgF/L_20
F1M9A7	Acyl-coenzyme A oxidase	74.49	50mgF/L_20
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	84.28	50mgF/L_20
P24008	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	500.62	50mgF/L_20
G8JLS2	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1 (Fragment)	500.62	50mgF/L_20
P97532	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	106.16	50mgF/L_20
Q62904	3-keto-steroid reductase	93.81	50mgF/L_20
G3V9P0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20
Q9WTV5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	67.14	50mgF/L_20
Q91ZT1	Vascular endothelial growth factor receptor 3	154.16	15mgF/L_20
Q3T1I3	Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	113.86	15mgF/L_20
D3ZVQ0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	121.89	15mgF/L_20

Q64637	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	91.14	15mgF/L_20
A2RRU3	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	130.34	15mgF/L_20
P52847	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	737.42	15mgF/L_20
Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	83.45	15mgF/L_20
Q8K3K4	Serpin B10	107.33	15mgF/L_20
Q6TXG7	Serine hydroxymethyltransferase	79.97	15mgF/L_20
	Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (Ovalbumin),		
G3V6B2	member 10	107.33	15mgF/L_20
F1LYQ7	Ribosomal protein	250.55	15mgF/L_20
D4A7Y6	Ribosomal protein (Fragment)	250.55	15mgF/L_20
	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase		
Q4KLK9	SSU72	100.25	15mgF/L_20
D3ZUF8	Protein Vrk2	87.72	15mgF/L_20
B0BMY7	Protein Twf2	184.03	15mgF/L_20
D3ZW62	Protein Thsd1	94.03	15mgF/L_20
Q5XIE1	Protein THEM6	109.8	15mgF/L_20
Q6AYN5	Protein Stard6	120.05	15mgF/L_20
D4ABK0	Protein Sgcz (Fragment)	85.89	15mgF/L_20
D3ZKB6	Protein RGD1562948	117.14	15mgF/L_20
D3ZAU6	Protein RGD1561919	237.15	15mgF/L_20
D3ZLT7	Protein RGD1305350	137.33	15mgF/L_20

M0RDK4	Protein Pitpnm3 (Fragment)	81.39	15mgF/L_20
M0R9F7	Protein Marco	78.87	15mgF/L_20
D3ZIV3	Protein Mad11l	79.49	15mgF/L_20
F1M7B7	Protein LOC100911725 (Fragment)	185.27	15mgF/L_20
D3ZN87	Protein LOC100361637	139.82	15mgF/L_20
F1LML7	Protein Hip1r	90.6	15mgF/L_20
M0RDI0	Protein Cyp3a73 (Fragment)	94.26	15mgF/L_20
D3ZNU3	Protein Cramp1l	87.36	15mgF/L_20
D3ZX71	Protein Col9a3	96.82	15mgF/L_20
F1MAH8	Protein Clip1	82.1	15mgF/L_20
D4A9J6	Protein Ccdc88b	82.71	15mgF/L_20
D3ZTC4	Protein Ccdc88b	82.35	15mgF/L_20
M0R521	Protein Arrdc5	107.23	15mgF/L_20
F1M943	Protein Armc8	92.71	15mgF/L_20
D3ZHR4	Protein Ankrd35	80.79	15mgF/L_20
F1LM42	Protein Ank2	91.31	15mgF/L_20
D4A4Q9	Protein Ank2	76.69	15mgF/L_20
F1M5N3	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
F1LZM2	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20
F1M9N9	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
M0R511	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20

D3ZN23	Protein Adamts20	36.01	15mgF/L_20
Q510K1	Pipecolic acid oxidase	101.68	15mgF/L_20
Q2THW7	Palmitoyltransferase ZDHHC5	85.89	15mgF/L_20
Q4V9H5	PHD finger protein 20-like protein 1	86.45	15mgF/L_20
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	396.26	15mgF/L_20
G3V7F5	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	86.5	15mgF/L_20
P55094	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	87.79	15mgF/L_20
P69060	N-acylneuraminate cytidyltransferase	132.73	15mgF/L_20
G3V9B3	Myelin-associated glycoprotein	101.16	15mgF/L_20
P07722	Myelin-associated glycoprotein	103.62	15mgF/L_20
Q498R1	Methionine synthase reductase	164.67	15mgF/L_20
E9PTQ0	LIM domain binding 2 (Predicted)	93.33	15mgF/L_20
Q3SWU2	Interferon regulatory factor 7	261.91	15mgF/L_20
F1LSL3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.32	15mgF/L_20
Q63269	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.69	15mgF/L_20
P27605	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	113.89	15mgF/L_20
O35952	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	97.53	15mgF/L_20
D4A500	HD domain containing 3 (Predicted), isoform CRA_b	106.39	15mgF/L_20
Q6Q7Y5	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	85.14	15mgF/L_20
F1LNG7	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (Fragment)	85.14	15mgF/L_20
P14480	Fibrinogen beta chain	190.78	15mgF/L_20

F1LR10	Epithelial protein lost in neoplasm	105.43	15mgF/L_20
P0C0K7	Ephrin type-B receptor 6	81.87	15mgF/L_20
P52555	Endoplasmic reticulum resident protein 29	123.11	15mgF/L_20
Q68FR9	Elongation factor 1-delta	95.68	15mgF/L_20
P56571	ES1 protein homolog, mitochondrial	120.59	15mgF/L_20
G3V6U4	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q8CH84	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q64346	Dual specificity protein phosphatase 6	175.39	15mgF/L_20
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	139.7	15mgF/L_20
Q7M0E3	Dextrin	88.64	15mgF/L_20
O54747	DNA polymerase delta catalytic subunit	75.31	15mgF/L_20
F1LSD8	DNA mismatch repair protein Mlh1	104.19	15mgF/L_20
P97679	DNA mismatch repair protein Mlh1	107.16	15mgF/L_20
P05183	Cytochrome P450 3A2	153.26	15mgF/L_20
P04800	Cytochrome P450 3A1	185.05	15mgF/L_20
Q06884	Cytochrome P-450	169.71	15mgF/L_20
P01026	Complement C3	104.31	15mgF/L_20
B5DEY9	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	89.36	15mgF/L_20
G3V7N5	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	165.38	15mgF/L_20
P18886	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	177.31	15mgF/L_20

Q5XIJ7	Calcium binding protein 39-like	92.41	15mgF/L_20
Q810D1	Calcineurin B homologous protein 2	154.17	15mgF/L_20
Q9ES38	Bile acyl-CoA synthetase	85.49	15mgF/L_20
Q9JM53	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	127.99	15mgF/L_20
D3ZC34	Ankyrin repeat and MYND domain containing 2 (Predicted)	127.73	15mgF/L_20
D4A3E2	Aminopeptidase-like 1 (Predicted)	120.1	15mgF/L_20
M0R9I6	Aminomethyltransferase	88.88	15mgF/L_20
Q0D2L3	Agmatinase, mitochondrial	94.17	15mgF/L_20
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	128.18	15mgF/L_20
P85970	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	156.25	15mgF/L_20
	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase		
M0RAP9	complex	139.7	15mgF/L_20
F1LS48	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	117.14	15mgF/L_20
Q6QI09	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	113.49	15mgF/L_20
F7FFJ9	ATP synthase subunit gamma	89.38	15mgF/L_20
Q6P3V9	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P50878	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P62907	60S ribosomal protein L10a	250.55	15mgF/L_20
P25114	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	205.05	15mgF/L_20
Q9JJH5	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	139.16	15mgF/L_20
D4AAJ3	40S ribosomal protein S12	146.41	15mgF/L_20

Tabela 7. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo 50 mgF/L 60 dias vs.15 mgF/L 60 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão 50 mgF/L- 60:15mgF/L_60_	Valor de P 50mgF/L_60:15 mgF/L_60
D3ZRN3	Protein Actbl2	1203.07		0.5066	0.04
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	2606.79		0.7261	0.03
P04904	Glutathione S-transferase alpha-3	5083.03		0.7483	0.03
P04903	Glutathione S-transferase alpha-2	5083.03		0.7408	0.03
F1LVC6	Glutathione S-transferase	2606.79		0.7189	0.04
P14141	Carbonic anhydrase 3	859.22		1.3771	0.95
O09171	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	7670.86		0.8353	0.03
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18		0.4449	0.00
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63		0.6771	0.00
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63		0.6703	0.00
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63		0.6637	0.00
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29		0.4404	0.00
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29		0.4966	0.00
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29		0.4916	0.00
Q5U2Y0	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	95.92	50mgF/L_60		
D3ZAH8	Unconventional myosin-IXb	59.24	50mgF/L_60		

Q63358	Unconventional myosin-IXb	60.38	50mgF/L_60
Q5PQJ7	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	142.61	50mgF/L_60
Q5XIE2	Transcription termination factor 2, mitochondrial	146.18	50mgF/L_60
D3ZGJ6	Sulfotransferase	102.23	50mgF/L_60
B2RYN7	Spastin	76.48	50mgF/L_60
Q499P8	RUS1 family protein C16orf58 homolog	107.42	50mgF/L_60
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	93.62	50mgF/L_60
G3V9H8	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	97.84	50mgF/L_60
D3ZLD2	Protein Zmat5	108.83	50mgF/L_60
D3ZQ09	Protein Zcchc24	79.97	50mgF/L_60
D3Z844	Protein Wdr59	66.17	50mgF/L_60
D3ZGZ9	Protein Wdr59	70.08	50mgF/L_60
D3ZZE0	Protein Topors	85.5	50mgF/L_60
F1LU14	Protein Snx32	108.68	50mgF/L_60
F1LYA7	Protein Skint8	70.65	50mgF/L_60
G3V8P5	Protein RGD1310127	107.42	50mgF/L_60
A0A096MJT6	Protein RGD1307100	88.91	50mgF/L_60
D4A1I0	Protein RGD1307100	78.57	50mgF/L_60
F1LXJ9	Protein Ptptr	60.46	50mgF/L_60
A0A096MKF4	Protein Psme3	174.95	50mgF/L_60
G3V7S9	Protein Odf2l	59.74	50mgF/L_60

D3ZC87	Protein Maff	120.78	50mgF/L_60
M0RB42	Protein LOC687532 (Fragment)	82.6	50mgF/L_60
D3Z8A7	Protein LOC685081	87.04	50mgF/L_60
D3ZM54	Protein LOC679087	66.59	50mgF/L_60
M0R3K9	Protein LOC365828 (Fragment)	310.56	50mgF/L_60
D3ZQX9	Protein LOC102552796	72.55	50mgF/L_60
F1LVB0	Protein LOC100912642 (Fragment)	91.33	50mgF/L_60
M0R5K9	Protein LOC100912024 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
M0RCJ9	Protein LOC100911027	96.12	50mgF/L_60
D3ZM33	Protein LOC100362298 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
D4AAW0	Protein Kansl1	37.01	50mgF/L_60
F1LXF5	Protein Get4	86.29	50mgF/L_60
M0R3K5	Protein Gdf5	135.76	50mgF/L_60
M0RAY4	Protein Gdf5	137.71	50mgF/L_60
F1LYN0	Protein Fam47e (Fragment)	88.84	50mgF/L_60
D4ACA6	Protein Elmsan1	55.59	50mgF/L_60
F7F7H4	Protein Dock2	38.54	50mgF/L_60
O88767	Protein DJ-1	293.33	50mgF/L_60
M0R3U4	Protein Crtap	71.44	50mgF/L_60
M0R4S7	Protein Ccdc13	84.24	50mgF/L_60
F1LQ08	Protein Car6	57.14	50mgF/L_60

F1LMH8	Protein Btrc (Fragment)	78.83	50mgF/L_60
F1LPB4	Protein Akap9	57.83	50mgF/L_60
Q64240	Protein AMBP	78.63	50mgF/L_60
F7ESM5	Nitrilase 1, isoform CRA_a	115.41	50mgF/L_60
F1M7K3	Myosin, light polypeptide 7, regulatory (Predicted), isoform CRA_a	128.95	50mgF/L_60
E9PTS4	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (Predicted)	166.34	50mgF/L_60
Q6IMY1	Microtubule-associated tumor suppressor 1 homolog	75.94	50mgF/L_60
P35400	Metabotropic glutamate receptor 7	76.94	50mgF/L_60
F1LZS5	Metabotropic glutamate receptor 7 (Fragment)	63.93	50mgF/L_60
D4A0L1	MON1 homolog b (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b	80.16	50mgF/L_60
Q7TPB7	MAL2A	96.12	50mgF/L_60
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	130.31	50mgF/L_60
D3ZHG2	Kinesin light chain 1	108.75	50mgF/L_60
P37285	Kinesin light chain 1	114.83	50mgF/L_60
D4ABK9	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	88.91	50mgF/L_60
Q80W66	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	157.37	50mgF/L_60
Q62867	Gamma-glutamyl hydrolase	93.77	50mgF/L_60
Q6XDA0	Erythroid spectrin beta	58.41	50mgF/L_60
Q4V8C2	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	69.51	50mgF/L_60
Q8VIP2	Carbohydrate-responsive element-binding protein	83.79	50mgF/L_60

Amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (Glycogen debranching enzyme, glycogen storage disease type III)			
D4AEH9	(Predicted), isoform CRA_a	73.24	50mgF/L_60
Q499S2	ATP synthase F(0) complex subunit C3, mitochondrial	78.27	50mgF/L_60
P62271	40S ribosomal protein S18	162.85	50mgF/L_60
P62250	40S ribosomal protein S16	498.1	50mgF/L_60
P62282	40S ribosomal protein S11	100.13	50mgF/L_60
Q4V8I7	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8A	75.04	15mgF/L_60
D4A4D7	Transcription factor E2F7	88.95	15mgF/L_60
Q68FQ0	T-complex protein 1 subunit epsilon	69.77	15mgF/L_60
O35913	Solute carrier organic anion transporter family member 1A4	89.92	15mgF/L_60
Q68FT9	Selenocysteine lyase	89.33	15mgF/L_60
P10362	Secretogranin-2	118.67	15mgF/L_60
G3V7X2	Secretogranin 2, isoform CRA_a	118.67	15mgF/L_60
M0RCD2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	82.43	15mgF/L_60
Q64578	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	140.49	15mgF/L_60
Q68H95	Replication initiator 1	73.14	15mgF/L_60
D4ADS8	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
P05714	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	201.29	15mgF/L_60
P05712	Ras-related protein Rab-2A	135.16	15mgF/L_60

F1LP82	Ras-related protein Rab-2A (Fragment)	126.1	15mgF/L_60
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	200.84	15mgF/L_60
E9PU16	Ras-related protein Rab-1A	195.3	15mgF/L_60
Q641Y6	Protein phosphatase 1J	84.46	15mgF/L_60
Q3KR94	Protein Vtn	71.8	15mgF/L_60
M0RCU5	Protein Urad	144.28	15mgF/L_60
A0A096MK54	Protein Synm	83.47	15mgF/L_60
G3V9G5	Protein Synm	76.36	15mgF/L_60
M0R8U7	Protein Spata17 (Fragment)	67.19	15mgF/L_60
Q5BK40	Protein RGD1304978	89.91	15mgF/L_60
M0R9S1	Protein Ppip5k2	87.43	15mgF/L_60
A0A096MK18	Protein Ppip5k2 (Fragment)	91.99	15mgF/L_60
D4A498	Protein Pcdhga12	102.22	15mgF/L_60
D4AAD0	Protein Nxpe5	60.89	15mgF/L_60
F1M111	Protein Myo5c	69.17	15mgF/L_60
D3ZFU9	Protein Mylk	62.44	15mgF/L_60
G3V6I4	Protein Marc1	111.94	15mgF/L_60
F1M031	Protein LOC685707	50.48	15mgF/L_60
F1LYK3	Protein LOC685707	52.78	15mgF/L_60
F1M6Y0	Protein LOC685590	81.19	15mgF/L_60
M0RAK2	Protein LOC684270	87.84	15mgF/L_60

F1M3E2	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCE0	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCG4	Protein LOC100910474	321.7	15mgF/L_60
D3ZZJ5	Protein LOC100910070	134.66	15mgF/L_60
D4A9D9	Protein LOC100361746	108.96	15mgF/L_60
M0RC85	Protein Cntrob	73.54	15mgF/L_60
D3ZE93	Protein Ceacam19	97.99	15mgF/L_60
D4A3J9	Protein Ccp110 (Fragment)	101.91	15mgF/L_60
F1M8E1	Protein Ccdc74a	252.06	15mgF/L_60
D3ZHH5	Protein Ccdc158	73.46	15mgF/L_60
D4A095	Protein Ccdc112	87.46	15mgF/L_60
F1M7M4	Protein Bmp2k (Fragment)	63.54	15mgF/L_60
D3ZCV0	Protein Actn2	211.98	15mgF/L_60
P83868	Prostaglandin E synthase 3	137.48	15mgF/L_60
R9PXR7	Prostaglandin E synthase 3 (Fragment)	137.48	15mgF/L_60
P10499	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	136.9	15mgF/L_60
O35263	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	81.91	15mgF/L_60
D3ZA44	Phospholipase A2, group IIE (Predicted), isoform CRA_a	97.94	15mgF/L_60
D3ZVP6	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1 (Predicted)	77.72	15mgF/L_60
D4AAK2	Nucleolar and spindle associated protein 1 (Predicted), isoform	83.42	15mgF/L_60

CRA_a			
Q99P77	Nucleolar GTP-binding protein 1	64.57	15mgF/L_60
Q63083	Nucleobindin-1	185.66	15mgF/L_60
Q5RJQ4	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	80.7	15mgF/L_60
G3V9F3	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	77.86	15mgF/L_60
Q9ERE6	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	86.66	15mgF/L_60
Q64119	Myosin light polypeptide 6	321.7	15mgF/L_60
M0R4E1	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60
P17209	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60
F6Q5K7	Mitochondrial ribosomal protein S18B, isoform CRA_a	119.05	15mgF/L_60
Q5XIT9	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	73.28	15mgF/L_60
Q5XI30	McKusick-Kaufman syndrome	98.26	15mgF/L_60
D3ZLJ9	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q63679	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q6MG45	Lymphotoxin B	73.27	15mgF/L_60
F1LRA5	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	88.43	15mgF/L_60
B2BKY8	LYST-interacting protein 8	75.16	15mgF/L_60
B5DF44	Kctd15 protein	95.54	15mgF/L_60
P12007	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	598.02	15mgF/L_60
D3ZSV1	Hypothetical LOC287541 (Predicted), isoform CRA_c	90.11	15mgF/L_60
G3V653	Homeobox protein unc-4 homolog	97.4	15mgF/L_60

P97830	Homeobox protein unc-4 homolog	97.4	15mgF/L_60
D4A6K4	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (Predicted)	89.48	15mgF/L_60
P09812	Glycogen phosphorylase, muscle form	145.82	15mgF/L_60
P00489	Glycogen phosphorylase, muscle form	128.21	15mgF/L_60
Q6RI88	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4	74.73	15mgF/L_60
A0A0A0MY02	E2F transcription factor 7 (Predicted), isoform CRA_a	83.25	15mgF/L_60
O08769	Cyclin dependent kinase inhibitor	93.19	15mgF/L_60
Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	109.93	15mgF/L_60
Q4V8G7	Centromere protein U	70.07	15mgF/L_60
P62161	Calmodulin	256.79	15mgF/L_60
P11275	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	62.47	15mgF/L_60
O88480	Calcineurin-binding protein cabin-1	98.44	15mgF/L_60
G3V650	Calcineurin binding protein 1, isoform CRA_a	91.11	15mgF/L_60
Q6AYB8	Basic leucine zipper nuclear factor 1	138.96	15mgF/L_60
Q9ER24	Ataxin-10	92.15	15mgF/L_60
A5GZY2	Arg3.1/Arc mRNA-binding zinc finger protein	100.52	15mgF/L_60
B5DF97	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	75.8	15mgF/L_60
G3V8V3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	159.26	15mgF/L_60
Q8R4I6	Actinin alpha 3, isoform CRA_a	162.67	15mgF/L_60

Tabela 8. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo 50mgF/L 60 dias vs.50 mgF/L 20 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão 50mgF/L_60:50mgF/L_20_	Valor de P 50mgF/L_60:50 mgF/L_20
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	683.18		0.5488	0.05
P24329	Thiosulfate sulfurtransferase	2687.57		0.6505	0.01
P48721	Stress-70 protein, mitochondrial	480.17		0.3642	0.05
P02770	Serum albumin	1952.14		0.5543	0.00
P12346	Serotransferrin	1540.25		0.6313	0.05
F1LMG2	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2	3598.83		0.8025	0.03
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	986.28		0.7189	0.05
F1LU12	Protein RGD1564865 (Fragment)	1035.33		0.3906	0.05
M0RCB1	Protein LOC102549957	2041.86		0.5543	0.05
M3ZCQ3	Protein LOC100910765	2945.66		0.4107	0.01
Q62669	Protein Hbb-b1	2945.66		0.4107	0.00
D3ZRN3	Protein Actbl2	1203.07		0.4724	0.01
Q63429	Polyubiquitin-C	683.18		0.5434	0.05
O35244	Peroxiredoxin-6	1510.58		0.4449	0.04
Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	1694.48		0.5488	0.02
P22791	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	3586		0.5655	0.00

D3ZJ08	Histone H3	743.36	0.5379	0.04
P0C0S7	Histone H2A.Z	3559.44	0.6250	0.03
A0A0A0MXW3	Histone H2A.Z (Fragment)	3559.44	0.6376	0.05
A9UMV8	Histone H2A.J	3559.44	0.6440	0.04
Q00728	Histone H2A type 4	3559.44	0.6126	0.03
Q4FZT6	Histone H2A type 3	3559.44	0.6126	0.02
P0CC09	Histone H2A type 2-A	3559.44	0.6188	0.03
Q64598	Histone H2A type 1-F	3559.44	0.6065	0.05
P0C169	Histone H2A type 1-C	3559.44	0.6250	0.04
P02262	Histone H2A type 1	3559.44	0.5769	0.02
M0RDM4	Histone H2A	3559.44	0.6250	0.03
M0RCL5	Histone H2A	3559.44	0.6065	0.03
D4ACV3	Histone H2A	3559.44	0.6250	0.04
Q6I8Q6	Histone H2A	3559.44	0.6250	0.05
G3V9C0	Histone H2A	3559.44	0.6188	0.04
D3ZXP3	Histone H2A	3559.44	0.5886	0.03
D4AEC0	Histone H2A	3559.44	0.6250	0.02
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	17634.75	1.1972	0.97
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2	577.27	0.4916	0.02
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	2041.86	0.5827	0.04
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	415.42	0.4916	0.02

M0R590	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	493.54	0.4819	0.01
B1WBQ8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	415.42	0.4630	0.02
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	493.54	0.4724	0.01
P46418	Glutathione S-transferase alpha-5	2606.79	0.6250	0.01
P14942	Glutathione S-transferase alpha-4	2606.79	0.6250	0.00
P04904	Glutathione S-transferase alpha-3	5083.03	0.6065	0.00
P04903	Glutathione S-transferase alpha-2	5083.03	0.6065	0.00
P00502	Glutathione S-transferase alpha-1	5101.24	0.6065	0.00
D3ZD94	Glutathione S-transferase	2606.79	0.6188	0.01
M0RDI1	Glutathione S-transferase	2476.24	0.6250	0.05
F1LVC6	Glutathione S-transferase	2606.79	0.6376	0.01
Q4FZZ3	Glutathione S-transferase	5083.03	0.6126	0.00
G3V983	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.2	0.5886	0.00
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.2	0.6065	0.01
Q6AXY0	Glutathione S-transferase A6	2606.79	0.6126	0.01
F7F2H5	Glutathione S-transferase (Fragment)	5083.03	0.6126	0.00
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	16767.23	0.5945	0.00
M0RCH2	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	12860.62	0.6188	0.04
O88752	Epsilon 1 globin	8167.94	1.3364	1.00
P28037	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1264.57	0.5379	0.00
P04762	Catalase	4739.2	0.7711	0.01

P14141	Carbonic anhydrase 3	859.22	2.8577	1.00
P07756	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	4852.95	0.8781	0.00
O09171	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	7670.86	0.8437	0.03
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18	0.5117	0.00
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4446.63	0.6065	0.00
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	4446.63	0.5945	0.00
P60711	Actin, cytoplasmic 1	4446.63	0.6005	0.00
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29	0.5220	0.00
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29	0.6126	0.00
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29	0.6313	0.00
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4191.22	0.6703	0.02
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	4191.22	0.6839	0.01
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	5931.83	0.7261	0.02
F1LP05	ATP synthase subunit alpha	5906.37	0.7261	0.05
F1LML3	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	1231.7	0.4190	0.00
P31210	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	1231.7	0.4449	0.00
P13437	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4495.19	0.7261	0.01
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2			
Q68G44	(Mitochondrial)	3586	0.5712	0.00
M0R8T2	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1155.12	0.6126	0.04
Q5U1Y4	1,5-anhydro-D-fructose reductase	97.4	0.5066	0.04

Q5U2Y0	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	95.92	50mgF/L_60
D3ZAH8	Unconventional myosin-IXb	59.24	50mgF/L_60
Q63358	Unconventional myosin-IXb	60.38	50mgF/L_60
Q5PQJ7	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	142.61	50mgF/L_60
Q5XIE2	Transcription termination factor 2, mitochondrial	146.18	50mgF/L_60
D3ZGJ6	Sulfotransferase	102.23	50mgF/L_60
B2RYN7	Spastin	76.48	50mgF/L_60
Q499P8	RUS1 family protein C16orf58 homolog	107.42	50mgF/L_60
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	93.62	50mgF/L_60
G3V9H8	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	97.84	50mgF/L_60
D3ZLD2	Protein Zmat5	108.83	50mgF/L_60
D3ZQ09	Protein Zcchc24	79.97	50mgF/L_60
D3Z844	Protein Wdr59	66.17	50mgF/L_60
D3ZGZ9	Protein Wdr59	70.08	50mgF/L_60
D3ZZE0	Protein Topors	85.5	50mgF/L_60
F1LU14	Protein Snx32	108.68	50mgF/L_60
F1LYA7	Protein Skint8	70.65	50mgF/L_60
G3V8P5	Protein RGD1310127	107.42	50mgF/L_60
A0A096MJT6	Protein RGD1307100	88.91	50mgF/L_60
D4A1I0	Protein RGD1307100	78.57	50mgF/L_60
F1LXJ9	Protein Ptprt	60.46	50mgF/L_60

A0A096MKF4	Protein Psme3	174.95	50mgF/L_60
G3V7S9	Protein Odf2l	59.74	50mgF/L_60
D3ZC87	Protein Maff	120.78	50mgF/L_60
M0RB42	Protein LOC687532 (Fragment)	82.6	50mgF/L_60
D3Z8A7	Protein LOC685081	87.04	50mgF/L_60
D3ZM54	Protein LOC679087	66.59	50mgF/L_60
M0R3K9	Protein LOC365828 (Fragment)	310.56	50mgF/L_60
D3ZQX9	Protein LOC102552796	72.55	50mgF/L_60
F1LVB0	Protein LOC100912642 (Fragment)	91.33	50mgF/L_60
M0R5K9	Protein LOC100912024 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
M0RCJ9	Protein LOC100911027	96.12	50mgF/L_60
D3ZM33	Protein LOC100362298 (Fragment)	162.85	50mgF/L_60
D4AAW0	Protein Kansl1	37.01	50mgF/L_60
F1LXF5	Protein Get4	86.29	50mgF/L_60
M0R3K5	Protein Gdf5	135.76	50mgF/L_60
M0RAY4	Protein Gdf5	137.71	50mgF/L_60
F1LYN0	Protein Fam47e (Fragment)	88.84	50mgF/L_60
D4ACA6	Protein Elmsan1	55.59	50mgF/L_60
F7F7H4	Protein Dock2	38.54	50mgF/L_60
O88767	Protein DJ-1	293.33	50mgF/L_60
M0R3U4	Protein Crtap	71.44	50mgF/L_60

M0R4S7	Protein Ccdc13	84.24	50mgF/L_60
F1LQ08	Protein Car6	57.14	50mgF/L_60
F1LMH8	Protein Btrc (Fragment)	78.83	50mgF/L_60
F1LPB4	Protein Akap9	57.83	50mgF/L_60
Q64240	Protein AMBP	78.63	50mgF/L_60
F7ESM5	Nitrilase 1, isoform CRA_a	115.41	50mgF/L_60
F1M7K3	Myosin, light polypeptide 7, regulatory (Predicted), isoform CRA_a	128.95	50mgF/L_60
E9PTS4	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (Predicted)	166.34	50mgF/L_60
Q6IMY1	Microtubule-associated tumor suppressor 1 homolog	75.94	50mgF/L_60
P35400	Metabotropic glutamate receptor 7	76.94	50mgF/L_60
F1LZS5	Metabotropic glutamate receptor 7 (Fragment)	63.93	50mgF/L_60
D4A0L1	MON1 homolog b (Yeast) (Predicted), isoform CRA_b	80.16	50mgF/L_60
Q7TPB7	MAL2A	96.12	50mgF/L_60
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	130.31	50mgF/L_60
D3ZHG2	Kinesin light chain 1	108.75	50mgF/L_60
P37285	Kinesin light chain 1	114.83	50mgF/L_60
D4ABK9	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	88.91	50mgF/L_60
Q80W66	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2	157.37	50mgF/L_60
Q62867	Gamma-glutamyl hydrolase	93.77	50mgF/L_60
Q6XDA0	Erythroid spectrin beta	58.41	50mgF/L_60

Q4V8C2	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	69.51	50mgF/L_60
Q8VIP2	Carbohydrate-responsive element-binding protein	83.79	50mgF/L_60
	Amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (Glycogen debranching enzyme, glycogen storage disease type III)		
D4AEH9	(Predicted), isoform CRA_a	73.24	50mgF/L_60
Q499S2	ATP synthase F(0) complex subunit C3, mitochondrial	78.27	50mgF/L_60
P62271	40S ribosomal protein S18	162.85	50mgF/L_60
P62250	40S ribosomal protein S16	498.1	50mgF/L_60
P62282	40S ribosomal protein S11	100.13	50mgF/L_60
Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	158.39	50mgF/L_20
F7FK40	Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_c	167.39	50mgF/L_20
Q6AZ25	Tropomyosin 1, alpha	167.39	50mgF/L_20
P70541	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma	77.31	50mgF/L_20
Q4FZT0	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	84.3	50mgF/L_20
Q920G0	Src kinase-associated phosphoprotein 2	84.33	50mgF/L_20
Q499U1	Solute carrier family 25 member 38	122.06	50mgF/L_20
P22006	Seminal vesicle secretory protein 2	67.83	50mgF/L_20
Q5U2T3	SPATS2-like protein	158.27	50mgF/L_20
Q6SA80	Rho-related GTP-binding protein RhoE	123.8	50mgF/L_20
P04785	Protein disulfide-isomerase	75.64	50mgF/L_20
Q99PJ6	Protein Zfp709	120.62	50mgF/L_20

F1M0H0	Protein Zfp318 (Fragment)	83.15	50mgF/L_20
M0RD44	Protein Zfp318 (Fragment)	66.03	50mgF/L_20
D3ZZ25	Protein Zfp280c	82.01	50mgF/L_20
Q5XI44	Protein Xrcc4	81.56	50mgF/L_20
F1LZ35	Protein Wdr88 (Fragment)	80.8	50mgF/L_20
D3ZZY2	Protein Utp14a	83.37	50mgF/L_20
D4A7S9	Protein Trim45	87.05	50mgF/L_20
Q6AXW2	Protein Tmod3	76.01	50mgF/L_20
G3V9T2	Protein Tmf1	86.82	50mgF/L_20
D3ZYF8	Protein Tm2d1	79.95	50mgF/L_20
F1LUQ3	Protein Tet1	73.15	50mgF/L_20
F6PUS4	Protein Sh3d21	92.79	50mgF/L_20
Q6P6X2	Protein Semg1	65.86	50mgF/L_20
D4AAU5	Protein Rassf8	92.07	50mgF/L_20
F1LYB7	Protein Rad54b	95.03	50mgF/L_20
D3ZD48	Protein Rab11fip2	79.04	50mgF/L_20
Q6AYH8	Protein RGD1359634	97.81	50mgF/L_20
M0R9L0	Protein Naca	66.17	50mgF/L_20
G3V810	Protein Mtmr10	80.83	50mgF/L_20
D3ZAA6	Protein Lcor	72.18	50mgF/L_20
M0R6S6	Protein LOC689679 (Fragment)	113.95	50mgF/L_20

F1M0Q4	Protein LOC679594 (Fragment)	229.05	50mgF/L_20
D3ZND8	Protein LOC100911271	135.25	50mgF/L_20
Q6IFU9	Protein Krt16	136.61	50mgF/L_20
M0R9K1	Protein Gm7964	78.1	50mgF/L_20
A0A096MJY6	Protein Gbe1	83.6	50mgF/L_20
D4ABF1	Protein Esco2	89.38	50mgF/L_20
A0A096MJS9	Protein Esco2	93.38	50mgF/L_20
F7F3M3	Protein Ces2a	92.02	50mgF/L_20
M0RC14	Protein Cchcr1 (Fragment)	65.84	50mgF/L_20
D4A317	Protein Ccdc18	157.88	50mgF/L_20
D3ZKA3	Protein Ccdc18	140.28	50mgF/L_20
D3ZU26	Protein Bhlhe23	117.59	50mgF/L_20
Q6AYD8	Protein Arhgap8	113.48	50mgF/L_20
D3ZK29	Protein Alkbh8	74.76	50mgF/L_20
P15387	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	89.38	50mgF/L_20
P29524	Plasminogen activator inhibitor 2 type A	151.58	50mgF/L_20
P52944	PDZ and LIM domain protein 1	129.72	50mgF/L_20
D3ZDB9	NmrA-like family domain-containing protein 1	120.2	50mgF/L_20
P86172	NmrA-like family domain-containing protein 1 (Fragments)	122.57	50mgF/L_20
W4VSR4	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20
B5DFC9	Nidogen-2	69.33	50mgF/L_20

Q80Z29	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	77.52	50mgF/L_20
P13697	NADP-dependent malic enzyme	73.87	50mgF/L_20
	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4		
F1M754	(Predicted)	83.49	50mgF/L_20
F1LNK0	Microtubule-associated protein	124.87	50mgF/L_20
Q78DZ1	Microtubule-associated protein	115.84	50mgF/L_20
P15146	Microtubule-associated protein 2	129.39	50mgF/L_20
F1LQQ1	Malic enzyme (Fragment)	69.2	50mgF/L_20
Q3KR86	MICOS complex subunit Mic60 (Fragment)	76.6	50mgF/L_20
Q8K1Q4	Leucine zipper putative tumor suppressor 3	82.54	50mgF/L_20
F1LMK6	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20
P09367	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	188.55	50mgF/L_20
P10867	L-gulonolactone oxidase	80.09	50mgF/L_20
D4A4V3	Kruppel-like factor 3 (Basic) (Mapped), isoform CRA_b	87.45	50mgF/L_20
Q6IG12	Keratin, type II cytoskeletal 7	102.85	50mgF/L_20
G3V712	Keratin complex 2, basic, gene 7, isoform CRA_a	77.46	50mgF/L_20
D3ZVV1	KH domain-containing protein 3	73.5	50mgF/L_20
Q5D059	Hnrpk protein	106.71	50mgF/L_20
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	106.71	50mgF/L_20
P48317	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha	93.04	50mgF/L_20
P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	87.46	50mgF/L_20

Q5M964	Fumarate hydratase 1	86.44	50mgF/L_20
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	213.27	50mgF/L_20
P31977	Ezrin	97.78	50mgF/L_20
Q6AYG2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	79.49	50mgF/L_20
F1M7X5	Dipeptidyl peptidase 4	100.36	50mgF/L_20
P14740	Dipeptidyl peptidase 4	100.61	50mgF/L_20
P11348	Dihydropteridine reductase	90.27	50mgF/L_20
D3ZH41	Cytoskeleton-associated protein 4 (Predicted)	117.08	50mgF/L_20
P11950	Cytochrome c oxidase subunit 6C-1	211.6	50mgF/L_20
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	196.2	50mgF/L_20
G3V802	Cyclin A2, isoform CRA_b	104.32	50mgF/L_20
F1LS40	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
P02466	Collagen alpha-2(I) chain	70.37	50mgF/L_20
Q66HA5	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	78.81	50mgF/L_20
B4F7A7	Centrosomal protein of 57 kDa	83.72	50mgF/L_20
Q8R2H3	Barttin	92.26	50mgF/L_20
	Bardet-Biedl syndrome 1 homolog (Human) (Predicted), isoform		
D4A4U2	CRA_a	98.14	50mgF/L_20
D3ZR43	Angiopoietin 4 (Predicted)	82.39	50mgF/L_20
Q6EV76	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	80.89	50mgF/L_20
D4IGX4	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	79.2	50mgF/L_20

G3V7I5	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
Q66HF8	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	84.84	50mgF/L_20
P70470	Acyl-protein thioesterase 1	83.26	50mgF/L_20
F1M9A7	Acyl-coenzyme A oxidase	74.49	50mgF/L_20
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	84.28	50mgF/L_20
P24008	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	500.62	50mgF/L_20
G8JLS2	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1 (Fragment)	500.62	50mgF/L_20
P97532	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	106.16	50mgF/L_20
Q62904	3-keto-steroid reductase	93.81	50mgF/L_20
G3V9P0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20
Q9WTV5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	81.22	50mgF/L_20
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	67.14	50mgF/L_20

Tabela 9. Proteínas identificadas com alteração de expressão significativa no fígado de ratos do grupo 15mgF/L 60 dias vs.15 mgF/L 20 dias

número de acesso do uniprot	Descrição da proteína	Score	exclusivas	Razão C 15mgF/L_60:15mgF/L_20_	Valor de P 15mgF/L_60:15 mgF/L_20
P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	693.38		0.432	0.04
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	683.18		0.395	0.03
P02770	Serum albumin	1952.14		0.549	0.00
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	986.28		0.670	0.05
D3ZIN5	Protein Vwa8 (Fragment)	90.82		0.477	0.04
F1LU69	Protein Rps27l3	683.18		0.454	0.05
M3ZCQ3	Protein LOC100910765	2945.66		0.298	0.00
G3V9Z2	Protein LOC100360645 (Fragment)	683.18		0.458	0.03
Q62669	Protein Hbb-b1	2945.66		0.330	0.00
Q63429	Polyubiquitin-C	683.18		0.458	0.03
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	3660.95		0.657	0.01
P22791	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	3586.00		0.560	0.00
Q6LED0	Histone H3.1	743.36		0.415	0.04
M0RBX6	Histone H3	743.36		0.399	0.04

D3ZQN4	Histone H3	743.36	0.407	0.04
D3ZJ08	Histone H3	743.36	0.391	0.05
POC0S7	Histone H2A.Z	3559.44	0.577	0.01
A9UMV8	Histone H2A.J	3559.44	0.595	0.03
Q00728	Histone H2A type 4	3559.44	0.600	0.04
Q4FZT6	Histone H2A type 3	3559.44	0.625	0.04
POCC09	Histone H2A type 2-A	3559.44	0.607	0.02
Q64598	Histone H2A type 1-F	3559.44	0.613	0.03
POC169	Histone H2A type 1-C	3559.44	0.589	0.04
P02262	Histone H2A type 1	3559.44	0.595	0.02
MORDM4	Histone H2A	3559.44	0.619	0.05
MORCL5	Histone H2A	3559.44	0.583	0.02
D4ACV3	Histone H2A	3559.44	0.589	0.02
D3ZWE0	Histone H2A	2865.03	0.589	0.03
D3ZVK7	Histone H2A	3559.44	0.619	0.03
Q6I8Q6	Histone H2A	3559.44	0.613	0.03
G3V9C0	Histone H2A	3559.44	0.625	0.05
D4AEC0	Histone H2A	3559.44	0.600	0.03
P09811	Glycogen phosphorylase, liver form	86.83	0.141	0.00
G3V983	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.20	0.691	0.01

P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	6431.20	0.712	0.01
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	16767.23	0.625	0.00
M0RCH2	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (Fragment)	12860.62	0.613	0.04
P14141	Carbonic anhydrase 3	859.22	2.203	1.00
Q63276	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	2276.22	1.600	0.95
P09034	Argininosuccinate synthase	1491.29	1.363	0.95
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	2705.18	1.553	0.97
P62738	Actin, aortic smooth muscle	2740.29	1.600	0.99
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	2740.29	1.665	1.00
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	2740.29	1.733	1.00
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4191.22	0.664	0.01
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	4191.22	0.719	0.01
F1LML3	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	1231.70	0.664	0.04
P13437	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	4495.19	0.771	0.02
Q68G44	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Mitochondrial)	3586.00	0.554	0.00
Q91ZT1	Vascular endothelial growth factor receptor 3	154.16	15mgF/L_20	
Q3T113	Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	113.86	15mgF/L_20	
D3ZVQ0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	121.89	15mgF/L_20	
Q64637	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	91.14	15mgF/L_20	
A2RRU3	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	130.34	15mgF/L_20	

P52847	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	737.42	15mgF/L_20
Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	83.45	15mgF/L_20
Q8K3K4	Serpin B10	107.33	15mgF/L_20
Q6TXG7	Serine hydroxymethyltransferase	79.97	15mgF/L_20
G3V6B2	Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (Ovalbumin), member 10	107.33	15mgF/L_20
F1LYQ7	Ribosomal protein	250.55	15mgF/L_20
D4A7Y6	Ribosomal protein (Fragment)	250.55	15mgF/L_20
Q4KLK9	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72	100.25	15mgF/L_20
D3ZUF8	Protein Vrk2	87.72	15mgF/L_20
B0BMY7	Protein Twf2	184.03	15mgF/L_20
D3ZW62	Protein Thsd1	94.03	15mgF/L_20
Q5XIE1	Protein THEM6	109.80	15mgF/L_20
Q6AYN5	Protein Stard6	120.05	15mgF/L_20
D4ABK0	Protein Sgcz (Fragment)	85.89	15mgF/L_20
D3ZKB6	Protein RGD1562948	117.14	15mgF/L_20
D3ZAU6	Protein RGD1561919	237.15	15mgF/L_20
D3ZLT7	Protein RGD1305350	137.33	15mgF/L_20
M0RDK4	Protein Pitpnm3 (Fragment)	81.39	15mgF/L_20
M0R9F7	Protein Marco	78.87	15mgF/L_20
D3ZIV3	Protein Mad1l1	79.49	15mgF/L_20

F1M7B7	Protein LOC100911725 (Fragment)	185.27	15mgF/L_20
D3ZN87	Protein LOC100361637	139.82	15mgF/L_20
F1LML7	Protein Hip1r	90.60	15mgF/L_20
M0RDI0	Protein Cyp3a73 (Fragment)	94.26	15mgF/L_20
D3ZNU3	Protein Cramp1l	87.36	15mgF/L_20
D3ZX71	Protein Col9a3	96.82	15mgF/L_20
F1MAH8	Protein Clip1	82.10	15mgF/L_20
D4A9J6	Protein Ccdc88b	82.71	15mgF/L_20
D3ZTC4	Protein Ccdc88b	82.35	15mgF/L_20
M0R521	Protein Arrdc5	107.23	15mgF/L_20
F1M943	Protein Armc8	92.71	15mgF/L_20
D3ZHR4	Protein Ankrd35	80.79	15mgF/L_20
F1LM42	Protein Ank2	91.31	15mgF/L_20
D4A4Q9	Protein Ank2	76.69	15mgF/L_20
F1M5N3	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
F1LZM2	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20
F1M9N9	Protein Ank2 (Fragment)	91.31	15mgF/L_20
M0R511	Protein Ank2 (Fragment)	76.69	15mgF/L_20
D3ZN23	Protein Adamts20	36.01	15mgF/L_20
Q5I0K1	Pipecolic acid oxidase	101.68	15mgF/L_20

Q2THW7	Palmitoyltransferase ZDHHCS	85.89	15mgF/L_20
Q4V9H5	PHD finger protein 20-like protein 1	86.45	15mgF/L_20
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	396.26	15mgF/L_20
G3V7F5	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	86.50	15mgF/L_20
P55094	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	87.79	15mgF/L_20
P69060	N-acylneuraminate cytidyltransferase	132.73	15mgF/L_20
G3V9B3	Myelin-associated glycoprotein	101.16	15mgF/L_20
P07722	Myelin-associated glycoprotein	103.62	15mgF/L_20
Q498R1	Methionine synthase reductase	164.67	15mgF/L_20
E9PTQ0	LIM domain binding 2 (Predicted)	93.33	15mgF/L_20
Q3SWU2	Interferon regulatory factor 7	261.91	15mgF/L_20
F1LSL3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.32	15mgF/L_20
Q63269	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	233.69	15mgF/L_20
P27605	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	113.89	15mgF/L_20
O35952	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	97.53	15mgF/L_20
D4A500	HD domain containing 3 (Predicted), isoform CRA_b	106.39	15mgF/L_20
Q6Q7Y5	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	85.14	15mgF/L_20
F1LNG7	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (Fragment)	85.14	15mgF/L_20
P14480	Fibrinogen beta chain	190.78	15mgF/L_20
F1LR10	Epithelial protein lost in neoplasm	105.43	15mgF/L_20

P0C0K7	Ephrin type-B receptor 6	81.87	15mgF/L_20
P52555	Endoplasmic reticulum resident protein 29	123.11	15mgF/L_20
Q68FR9	Elongation factor 1-delta	95.68	15mgF/L_20
P56571	ES1 protein homolog, mitochondrial	120.59	15mgF/L_20
G3V6U4	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q8CH84	ELAV-like protein 2	115.05	15mgF/L_20
Q64346	Dual specificity protein phosphatase 6	175.39	15mgF/L_20
	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate		
P08461	dehydrogenase complex, mitochondrial	139.70	15mgF/L_20
Q7M0E3	Dextrin	88.64	15mgF/L_20
O54747	DNA polymerase delta catalytic subunit	75.31	15mgF/L_20
F1LSD8	DNA mismatch repair protein Mlh1	104.19	15mgF/L_20
P97679	DNA mismatch repair protein Mlh1	107.16	15mgF/L_20
P05183	Cytochrome P450 3A2	153.26	15mgF/L_20
P04800	Cytochrome P450 3A1	185.05	15mgF/L_20
Q06884	Cytochrome P-450	169.71	15mgF/L_20
P01026	Complement C3	104.31	15mgF/L_20
B5DEY9	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	89.36	15mgF/L_20
G3V7N5	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	165.38	15mgF/L_20
P18886	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	177.31	15mgF/L_20

Q5XIJ7	Calcium binding protein 39-like	92.41	15mgF/L_20
Q810D1	Calcineurin B homologous protein 2	154.17	15mgF/L_20
Q9ES38	Bile acyl-CoA synthetase	85.49	15mgF/L_20
Q9JM53	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	127.99	15mgF/L_20
D3ZC34	Ankyrin repeat and MYND domain containing 2 (Predicted)	127.73	15mgF/L_20
D4A3E2	Aminopeptidase-like 1 (Predicted)	120.10	15mgF/L_20
M0R9I6	Aminomethyltransferase	88.88	15mgF/L_20
Q0D2L3	Agmatinase, mitochondrial	94.17	15mgF/L_20
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	128.18	15mgF/L_20
P85970	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	156.25	15mgF/L_20
M0RAP9	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	139.70	15mgF/L_20
F1LS48	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	117.14	15mgF/L_20
Q6QI09	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	113.49	15mgF/L_20
F7FFJ9	ATP synthase subunit gamma	89.38	15mgF/L_20
Q6P3V9	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P50878	60S ribosomal protein L4	78.55	15mgF/L_20
P62907	60S ribosomal protein L10a	250.55	15mgF/L_20
P25114	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	205.05	15mgF/L_20
Q9JJH5	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	139.16	15mgF/L_20
D4AAJ3	40S ribosomal protein S12	146.41	15mgF/L_20

Q4V8I7	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8A	75.04	15mgF/L_60
D4A4D7	Transcription factor E2F7	88.95	15mgF/L_60
Q68FQ0	T-complex protein 1 subunit epsilon	69.77	15mgF/L_60
O359I3	Solute carrier organic anion transporter family member 1A4	89.92	15mgF/L_60
Q68FT9	Selenocysteine lyase	89.33	15mgF/L_60
P10362	Secretogranin-2	118.67	15mgF/L_60
G3V7X2	Secretogranin 2, isoform CRA_a	118.67	15mgF/L_60
M0RCD2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	82.43	15mgF/L_60
Q64578	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	140.49	15mgF/L_60
Q68H95	Replication initiator 1	73.14	15mgF/L_60
D4ADS8	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
P05714	Ras-related protein Rab-4A	136.64	15mgF/L_60
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	201.29	15mgF/L_60
P05712	Ras-related protein Rab-2A	135.16	15mgF/L_60
F1LP82	Ras-related protein Rab-2A (Fragment)	126.10	15mgF/L_60
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	200.84	15mgF/L_60
E9PU16	Ras-related protein Rab-1A	195.30	15mgF/L_60
Q641Y6	Protein phosphatase 1J	84.46	15mgF/L_60
Q3KR94	Protein Vtn	71.80	15mgF/L_60
M0RCU5	Protein Urad	144.28	15mgF/L_60

A0A096MK54	Protein Synm	83.47	15mgF/L_60
G3V9G5	Protein Synm	76.36	15mgF/L_60
M0R8U7	Protein Spata17 (Fragment)	67.19	15mgF/L_60
Q5BK40	Protein RGD1304978	89.91	15mgF/L_60
M0R9S1	Protein Ppip5k2	87.43	15mgF/L_60
A0A096MK18	Protein Ppip5k2 (Fragment)	91.99	15mgF/L_60
D4A498	Protein Pcdhga12	102.22	15mgF/L_60
D4AAD0	Protein Nxpe5	60.89	15mgF/L_60
F1M111	Protein Myo5c	69.17	15mgF/L_60
D3ZFU9	Protein Mylk	62.44	15mgF/L_60
G3V6I4	Protein Marc1	111.94	15mgF/L_60
F1M031	Protein LOC685707	50.48	15mgF/L_60
F1LYK3	Protein LOC685707	52.78	15mgF/L_60
F1M6Y0	Protein LOC685590	81.19	15mgF/L_60
M0RAK2	Protein LOC684270	87.84	15mgF/L_60
F1M3E2	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCE0	Protein LOC681341 (Fragment)	138.21	15mgF/L_60
M0RCG4	Protein LOC100910474	321.70	15mgF/L_60
D3ZZJ5	Protein LOC100910070	134.66	15mgF/L_60
D4A9D9	Protein LOC100361746	108.96	15mgF/L_60

M0RC85	Protein Cntrob	73.54	15mgF/L_60
D3ZE93	Protein Ceacam19	97.99	15mgF/L_60
D4A3J9	Protein Ccp110 (Fragment)	101.91	15mgF/L_60
F1M8E1	Protein Ccdc74a	252.06	15mgF/L_60
D3ZHH5	Protein Ccdc158	73.46	15mgF/L_60
D4A095	Protein Ccdc112	87.46	15mgF/L_60
F1M7M4	Protein Bmp2k (Fragment)	63.54	15mgF/L_60
D3ZCV0	Protein Actn2	211.98	15mgF/L_60
P83868	Prostaglandin E synthase 3	137.48	15mgF/L_60
R9PXR7	Prostaglandin E synthase 3 (Fragment)	137.48	15mgF/L_60
P10499	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	136.90	15mgF/L_60
O35263	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	81.91	15mgF/L_60
D3ZA44	Phospholipase A2, group IIE (Predicted), isoform CRA_a	97.94	15mgF/L_60
D3ZVP6	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1 (Predicted)	77.72	15mgF/L_60
D4AAK2	Nucleolar and spindle associated protein 1 (Predicted), isoform CRA_a	83.42	15mgF/L_60
Q99P77	Nucleolar GTP-binding protein 1	64.57	15mgF/L_60
Q63083	Nucleobindin-1	185.66	15mgF/L_60
Q5RJQ4	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	80.70	15mgF/L_60
G3V9F3	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	77.86	15mgF/L_60
Q9ERE6	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	86.66	15mgF/L_60

Q64119	Myosin light polypeptide 6	321.70	15mgF/L_60
M0R4E1	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60
P17209	Myosin light chain 4	71.79	15mgF/L_60
F6Q5K7	Mitochondrial ribosomal protein S18B, isoform CRA_a	119.05	15mgF/L_60
Q5XIT9	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	73.28	15mgF/L_60
Q5XI30	McKusick-Kaufman syndrome	98.26	15mgF/L_60
D3ZLJ9	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q63679	Lysine-specific demethylase 3A	64.46	15mgF/L_60
Q6MG45	Lymphotoxin B	73.27	15mgF/L_60
F1LRA5	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	88.43	15mgF/L_60
B2BKY8	LYST-interacting protein 8	75.16	15mgF/L_60
B5DF44	Kctd15 protein	95.54	15mgF/L_60
P12007	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	598.02	15mgF/L_60
D3ZSV1	Hypothetical LOC287541 (Predicted), isoform CRA_c	90.11	15mgF/L_60
G3V653	Homeobox protein unc-4 homolog	97.40	15mgF/L_60
P97830	Homeobox protein unc-4 homolog	97.40	15mgF/L_60
D4A6K4	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (Predicted)	89.48	15mgF/L_60
P09812	Glycogen phosphorylase, muscle form	145.82	15mgF/L_60
P00489	Glycogen phosphorylase, muscle form	128.21	15mgF/L_60
Q6RI88	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4	74.73	15mgF/L_60

A0A0A0MY02	E2F transcription factor 7 (Predicted), isoform CRA_a	83.25	15mgF/L_60
O08769	Cyclin dependent kinase inhibitor	93.19	15mgF/L_60
Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	109.93	15mgF/L_60
Q4V8G7	Centromere protein U	70.07	15mgF/L_60
P62161	Calmodulin	256.79	15mgF/L_60
P11275	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	62.47	15mgF/L_60
O88480	Calcineurin-binding protein cabin-1	98.44	15mgF/L_60
G3V650	Calcineurin binding protein 1, isoform CRA_a	91.11	15mgF/L_60
Q6AYB8	Basic leucine zipper nuclear factor 1	138.96	15mgF/L_60
Q9ER24	Ataxin-10	92.15	15mgF/L_60
A5GZY2	Arg3.1/Arc mRNA-binding zinc finger protein	100.52	15mgF/L_60
B5DF97	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	75.80	15mgF/L_60
G3V8V3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	159.26	15mgF/L_60
Q8R4I6	Actinin alpha 3, isoform CRA_a	162.67	15mgF/L_60
