



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

BRUNA PUTY SILVA GOMES

**ANÁLISE DO EFEITO TÓXICO E ALTERAÇÕES TRANSCRIPTOMICAS DE  
CÉLULAS NEURONAIS E GLIAIS APÓS EXPOSIÇÃO AO FLUORETO**

Belém

2019

BRUNA PUTY SILVA GOMES

**ANÁLISE DO EFEITO TÓXICO E ALTERAÇÕES TRANSCRIPTOMICAS DE  
CÉLULAS NEURONAIIS E GLIAIS APÓS EXPOSIÇÃO AO FLUORETO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociência e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Belém  
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

G633a Gomes, Bruna Puty Silva  
ANÁLISE DO EFEITO TÓXICO E ALTERAÇÕES  
TRANSCRIPTOMICAS DE CÉLULAS NEURONAIS E GLIAIS  
APÓS EXPOSIÇÃO AO FLUORETO / Bruna Puty Silva Gomes.  
— 2019.  
98 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima  
Coorientador(a): Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de  
Oliveira  
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Fluoreto. 2. SNC. 3. toxicidade. 4. transcriptoma. I.  
Título.

CDD 615.90072

---

BRUNA PUTY SILVA GOMES

**ANÁLISE DO EFEITO TÓXICO E ALTERAÇÕES TRANSCRIPTOMICAS DE  
CÉLULAS NEURONAIIS E GLIAIS APÓS EXPOSIÇÃO AO FLUORETO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociência e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Defesa dia: 23/05/2019

Banca Avaliadora:

---

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima - Orientador  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Prof. Dr. André Salim Khayat - Membro  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

---

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro - Membro  
Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

---

Profa. Dra. Maria Elena Crespo Lopez - Membro  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro - Membro  
Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

## Agradecimentos

Ao meu orientador, Rafael Lima, por acreditar no meu trabalho, confiar em mim e me permitir crescer cientificamente ao seu lado. Ao meu co-orientador, Edivaldo Oliveira, por abrir as portas do seu laboratório e por me fazer sentir em casa. Vocês dois foram peças importantes durante meu aprendizado, me ensinando diariamente a ser cientista e principalmente me mostrando o caminho para ser o que almejo no futuro. Meus sinceros agradecimentos à vocês.

Agradeço também a todos os alunos do LABEF, com quem dividi muito sábados de reuniões e seminários. Especialmente a Luana Leão, por estar nessa caminhada ao meu lado desde a iniciação científica. Pessoas como você são preciosidades na academia. Espero poder estar ao seu lado por muito outros projetos (pessoais e profissionais). Agradeço também a Lygia, por dividir os dias de experimentos e pelas conversas intermináveis sobre a vida. Ao Leonardo, pela ajuda sempre que necessária, pelas conversas e discussões agradáveis. Aos alunos e funcionários da SAMAM (IEC), especialmente à Michele e Carolina, por serem sempre solícitas a todo o momento e por estarem sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso. Ao Wallax, Francisco, Iago, Mírcia e Carol por tonarem os dias extremamente agradáveis. Pelas tardes de café, bolos e churrasco. Vocês são incríveis.

Nesse fim de ciclo acadêmico, agradeço também àqueles que fizeram parte da base da minha educação científica, sendo assim jamais poderia deixar de agradecer ao Prof. Anderson Herculano e Prof. Karen Oliveira por me ensinarem muito sobre ciência e por despertarem o amor que existe em mim pela pesquisa. Vocês me deram a primeira oportunidade como aluno de iniciação científica e construíram muito dos princípios que existem em mim. Meus sinceros agradecimentos à vocês. Também gostaria de agradecer ao Prof. Evander Batista, por todo ensinamento, carinho e por toda a confiança que demonstrava ter pelo meu trabalho. Nesses nove anos de UFPA além do conhecimento o que fica e marca são as amizades conquistadas. Por isso gostaria de agradecer por ter feito parte da vida de vocês e por vocês terem feito parte da minha vida: Nayara, Liz, Anna Paula, Maycow, Lucas, Tayana, Flávia, Macella, Anna Paula.

À Eunice, por sempre me apoiar e por estar sempre ao meu lado. Te amo!

Aos meus pais, Paulo e Tânia, pela compreensão necessária de muitos dias de ausência em nome deste trabalho. Por terem me ensinado sobre amor e respeito ao próximo. Tudo o que sou hoje é por vocês. Se dedico a conclusão desta etapa a alguém, dedico à vocês que foram, são e sempre serão minha fortaleza. A minha vó Antônia, por ter participado ativamente da minha criação e ter contribuído com o que sou hoje. Ao meu avô (*in memoriam*), saudades!

À minha família, tios, primos e primas, pelas reuniões incríveis e por todo apoio sempre. A minha segunda família (família do Bruno), por terem me recebido de braços tão abertos e cheios de amor. Amos vocês.

Ao Bruno, por ser essa pessoa incrível, sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos. Por toda ajuda, amor, compreensão, ensinamentos científicos, por tudo!!!! Reafirmo o que já disse sobre você ser meu melhor exemplo de força, humildade, inteligência e dedicação. Você me inspira. Quando penso na nossa trajetória tenho certeza que escolhi a pessoa certa para dividir a vida.

Ao Bernardo, por me ensinar sobre amor, saudade e resiliência.

## Resumo

Apesar de ser amplamente utilizado na Odontologia para o controle da cárie dentária, quando ingerido em grandes quantidades o fluoreto pode causar efeitos colaterais, dos quais o mais conhecido é a fluorose dentária. Além disso, estudos também sugerem que mesmo em baixas concentrações o flúor pode originar quadros de toxicidade, levando a prejuízos no SNC. A toxicogenômica funcional, que fornece análises de perfis gênicos após exposição a contaminantes tem sido utilizada como ferramenta para a identificação de biomarcadores da intoxicação, bem como para a identificação de vias de sinalização que possam ser utilizadas para o tratamento e/ou prevenção dos danos ocasionados pela toxicidade de determinados compostos. Sabendo-se que os mecanismos moleculares da toxicidade do flúor no SNC ainda permanecem desconhecidos, a análise da exposição prolongada a fluoretos sobre o perfil gênico de populações de células do SNC se faz necessário. Nessa tese nós buscamos avaliar os efeitos da exposição a concentrações comumente encontradas no plasma sanguíneo da população que ingere água fluoretada nas principais células do SNC. Para isso, nós utilizamos células humanas da linhagem IMR-32 (neurônio) e U87 (glia) e avaliamos parâmetros de viabilidade e morfologia celular, metabolismo, produção de ATP, estresse oxidativo, fragmentação do DNA e perfil global de expressão gênica após 10 dias de exposição. Nossos resultados demonstraram que o fluoreto não induz alterações fisiológicas nas células IMR-32. Por outro lado, induz morte celular por necrose, aumento do metabolismo, diminuição no ATP e GSH/GSSG e fragmentação do DNA nas células U87. O perfil de expressão gênica das células U87 foi diferencialmente alterado após exposição ao fluoreto, com diminuição de 1735 genes e aumento na expressão de 1047 genes após exposição a 0.095µg/mL e a diminuição da expressão de 1863 genes e aumento da expressão de 1023 após exposição a 0.22µg/mL. Nossos dados também sugerem uma significativa alteração na via TNF-alfa via NFK-B e em processos mitocondriais. Também evidenciamos genes com significativa importância biológica (genes hub) como os genes PTGES3, EP300, CYP1B1, RPS27A. Dessa forma, nossos dados sugerem que as células da glia são afetadas pela exposição ao flúor, sugerindo que a mitocôndria desempenha um importante papel no mecanismo toxicológico do flúor.

Palavras-chave: Fluoreto, toxicidade, transcriptoma, SNC

## Abstract

Despite being widely used in dentistry for dental carie control, in high amounts fluoride may be associated with side effects of which the best known is dental fluorosis. In addition, studies suggest that even at low concentrations fluoride may exerts toxicity leading to damage on CNS. Functional toxicogenomics analysis of gene profile after exposure to contaminants has been used as a tool for the identification of biomarkers of exposure, as well as for the identification of signaling pathways that may be used for treatment and / or prevention of damage caused by the toxicity of certain compounds. As the molecular mechanism of fluoride toxicity still unknow, analysis of F chronic exposure on gene expression profile of CNS cells are necessary. Here we aimed to show the effect of fluoride exposure of plasma concentration founded on population that used to be exposed to fluoridated drink water, on the main CNS cells. In this way, we have used human cell lineage IMR-32 (neurons) and U87 (glial cells) to analyze parameter of viability, morphology and cell metabolism, ATP-synthesis, oxidative stress, DNA damage and global gene expression profile after 10 days exposure. Our results have shown that fluoride does not induce changes in IMR-32 cells. On the other hand, it induces cell death by necrosis, increased metabolism, decrease in ATP and GSH / GSSG in U87 cells and DNA fragmentation. The U87 gene expression profile is differentially altered after fluoride exposure, decreasing 1735 genes and an increasing expression of 1047 genes after exposure to 0.095 $\mu$ g / mL and decreasing of 1863 gene expression and increasing of 1023 expression after exposure to 0.22 $\mu$ g / mL. We also highlighted the major molecular pathways altered after exposure, such as the signaling pathway TNF-alpha via NFK-B and mitochondrial process. We also showed genes with significant importance biology (hub genes) such as the genes PTGES3, EP300, CYP1B1, RPS27A. Our results suggests that glial cell are affected by fluorides exposure and mitochondria has a major role on the mechanism of fluoride toxicity.

Key-words: Fluoride, toxicity, transcriptome, CNS

## Lista de figuras

Figura 1: Classificação das Unidades Federativas brasileiras segundo a porcentagem de cobertura da fluoretação da água em municípios com mais de 50 mil habitantes entre os anos de 2011 e 2015. (Frazão e Narvai 2017). .....	5
Figura 2: Características gerais do metabolismo do fluoreto no corpo humano. (Modificado de Buzalaf e Whitford, 2011) .....	9
Figura 3: Principais mecanismos de genotoxicidade do flúor. (Adaptado de Ribeiro e col., 2017).....	14
Figura 4: Principais mecanismos de toxicidade do flúor no sistema nervoso central. (Adaptado de Blaylock, 2004).....	18
Figura 5: Desenho esquemático mostrando a metodologia utilizada para o cultivo e exposição das células U87.....	25
Figura.6: Desenho representativo da câmara de <i>Newbauer</i> , onde foi realizada a contagem de células viáveis (seta preta) e mortas (seta vermelha). .....	26
Figura 7: Desenho esquemático da metodologia utilizada no ensaio de mecanismos de morte celular através do kit Apotox triplex assay. ....	29
Figura 8: Desenho esquemático de metodologia utilizada no ensaio de níveis de EROS pelo kit ROS-Glo (Promega). .....	31
Figura 9: Desenho esquemático da metodologia utilizada para análise dos níveis de GSH/GSSG pelo kit GSH/GSSG-Glo (Promega). .....	32
Figura 10: Imagem representativa da análise do percentual de DNA presente na cauda e na cabeça de nucleóides, pelo programa ImageJ utilizando-se o plugin open comet. ...	34
Figura 11: Desenho esquemático da metodologia utilizada para ensaio de microarray de uma cor. ....	36
Figura 12: Viabilidade celular. Células da linhagem IMR-31 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor e depois avaliadas pelo método de exclusão por azul de tripan. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste <i>Tukey</i> (n=3). Os dados foram mostrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs controle.....	38
Fig 13: Análise morfológica das células IMR-32 após 10d de exposição ao fluoreto. As imagens foram obtidas em micropia de luz com aumento de 22x (A-C) e 40x (D-F). As imagens foram ajustadas e as células contadas com o programa ImageJ. G-I: análise morfométrica das células IMR-32 após a exposição ao flúor. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). .....	39
Fig 14: Análise morfológica das células U87 após 10d de exposição ao fluoreto. As imagens foram obtidas em micropia de luz com aumento de 22x (A-C) e 40x (D-F). As imagens foram ajustadas e as células contadas com o programa ImageJ. G-I: análise morfométrica das células IMR-32 após a exposição ao flúor. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). .....	40
Figura 15: Metabolismo celular. Células da linhagem IMR-32 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor e depois avaliadas pelo método de redução do MTT. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste <i>Tukey</i> (n=3). Os dados foram mostrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs controle.....	41
Figura 16: Síntese de ATP. Células da linhagem IMR-31 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor. A síntese de ATP foi avaliada pelo kit Mitocondrial Tox-Glo (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste <i>Tukey</i>	

(n=3). Os dados foram mostrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs 0.....	42
Figura 17: Mecanismos de morte celular. Após a exposição ao flúor nas células U87 foram avaliados parâmetros de morte celular como citotoxicidade (integridade de membrana), viabilidade e ativação de caspase 3/7 através do kit Apotox-triplex assay (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey (n=3). Os dados foram demonstrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs 0.....	43
Figura 18: Estresse oxidativo. Após a exposição ao flúor nas células U87 foram avaliados a produção de ROS (A) e peroxidação de lipídeos (B) através do kit ROS-Glo (Promega) e ensaio TBARS, respectivamente. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey (n=3). Os dados foram demonstrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ .....	44
Figura 19: Razão GSH/GSSG. Após a exposição ao flúor nas células U87 foi avaliada a razão de GSH/GSSG através do kit GSH/GSSG-Glo (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey (n=3). Os dados foram demonstrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs 0.....	45
Figura 20: Integridade do DNA pelo teste cometa. Após a exposição ao flúor nas células U87 foi avaliado a integridade do DNA pelo método cometa. A) Porcentagem de DNA presente na cabeça e cauda do cometa. B) Momento da cauda do cometa em porcentagem. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey (n=3). Os dados foram demonstrados como média $\pm$ desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$ . * vs 0.....	46
Figura 21: Perfil global de expressão gênica das células U87 expostas ou não ao flúor, avaliado pela técnica de microarray de uma cor (Agilent). Análise de cluster hierárquico por padrão de cores de expressão gênica onde cada linha representa um gene diferencialmente expresso, podendo estar down-regulado (vermelho) ou up-regulado (verde). Os dados foram expressos como Log <sub>2</sub> FC e avaliados por ANOVA de uma via com pos teste Tukey, após correção por FDR (n=3). .....	48
Figura 22: Perfil global de expressão gênica das células U87 expostas ou não ao flúor, avaliado pela técnica de microarray de uma cor (Agilent). Volcano plot demonstrando o padrão estatístico de genes diferencialmente expressos que apresentam $p < 0,05$ e $FC > 1,5$ após exposição a 0,095 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 0,22 $\mu\text{g/mL}$ (B). Genes down-regulados são mostrados em azul (escuro ou claro) enquanto que genes up-regulados são mostrados em vermelho/laranja. Os dados foram expressos como Log <sub>2</sub> FC e avaliados por ANOVA de uma via com pos teste Tukey, após correção por FDR (n=3). .....	49
Figura 23: Quantidade de genes diferencialmente expressos após exposição ao flúor. Genes UP-(A) e DOWN-regulados (B) após exposição a 0,095 (rosa) e 0,22 $\mu\text{g/mL}$ (cinza). .....	50
Figura. 24: Análises GO das três principais funções alteradas após a exposição ao fluoreto. ....	51
Figura.25: Principais termos GO alterados após a exposição ao fluoreto. Foram demonstrados termos que apresentaram $p < 0,05$ e $FC > 2$ . Os termos foram obtidos após análise de enriquecimento genico.....	52
Figura. 26: Principais vias moleculares alteradas após a exposição ao fluoreto de acordo com sua significancia biologica dentro da exposição. O sistema de cores indica valores o valor p em escala logaritimica. ....	53

Figura.27: Distribuição genica nas vias moleculares alteradas após a exposição ao fluoreto. O compartilhamento de genes entre as concentrações foi demonstrado através de linhas azul claro enquanto as vias moleculares foram demonstradas através de linhas azul escuro. .... 54

Figura 28: Rede de interação proteína-proteína diferencialmente expressas após a exposição ao fluoreto. A figura mostra as vias moleculares organizadas hierarquicamente (a legenda mostra apenas o grupo hierarquicamente mais alto) sob uma mesma cor. Também mostra quais grupos de pathways possuem relação entre si. As cores internas indicam os grupos a que cada via pertence e o gráfico interno indica em quais condições os genes podem ser encontrados (preto para 1x0 Down, branco para 1x0 Up, cinza escuro para 3x0 Down e cinza claro para 3x0 Up). .... 55

Figura. 29: Quantificação dos genes diferencialmente expressos por RT-qPCR. Foram quantificados os genes *CY1B1* e *PTGE* com expressão relativa ao gene constitutivo *TBP*. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs controle, # vs 0.095..... 60

## Lista de quadros

Quadro 1: Concentração de fluoreto em diferentes tipos de alimentos. (adaptado de Departamento de agricultura dos EUA, 2005) .....	3
Quadro 2. Sequência das sondas utilizadas para a validação gênica por RT-qPCR .....	37
Quadro 3: GenesHub identificados após 10 dias de exposição a 0,095µg/mL de fluoreto .....	56
Quadro 4: GenesHub identificados após 10 dias de exposição a 0,22µg/mL de fluoreto	58
Apendice 1. Genes diferencialmente expressos exclusivamente apos exposição a 0,095 µg/mL de fluoreto.....	84
Apendice 2. Genes diferencialmente expressos exclusivamente após a exposição a 0.22 µg/mL de fluoreto.....	90

### Lista de abreviaturas

ABO	Associação Brasileira de Odontologia
ADO	Associação Americana de Odontologia
ANOVA	Análise de variancia de uma via
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CFCs	Clorofluorcarbono
cRNA	RNA complementar
CY-3	Fluorocromo 3 cianina
DDA	Transtorno do deficit de atenção e hiperatividade
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxoribonucleico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GO	Gene Ontology
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
MDA	Malonaldeído
mRNA	RNA mensageiro
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFA	Paraformaldeído
PV	Porcentagem de células vivas
QI	Quociente de inteligência
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido desmutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante total

## SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2.	POTENCIAL TERAPÊUTICO DO FLÚOR	4
1.3.	FARMACOCINÉTICA DO FLÚOR	8
1.4.	FARMACODINÂMICA DO FLÚOR	10
1.5.	GENOTOXICIDADE DO FLÚOR	12
1.6.	EFEITOS DO FLÚOR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	15
1.7.	BIOMARCADORES E ANÁLISES ÔMICAS APLICADAS A TOXICOLOGIA	20
1.8.	MODELO DE ESTUDO E PROBLEMÁTICA DE INVESTIGAÇÃO	22
2.	OBJETIVOS	23
2.1.	OBJETIVO GERAL	23
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	CULTURA DE CÉLULAS	24
3.2.	ALÍQUOTAS DE FLUORETO	24
3.3.	GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.4.	CULTURA DE CÉLULAS E EXPOSIÇÃO AO FLÚOR	25
3.5.	MORTE CELULAR	26
3.6.	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	27
3.7.	METABOLISMO CELULAR	27
3.8.	MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP	28
3.9.	CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE	28
3.10.	ANÁLISE DA BIOQUÍMICA OXIDATIVA	30
3.10.1.	MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROS: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30
3.10.2.	MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH/GSSG	31
3.10.3.	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	33
3.11.	FRAGMENTAÇÃO DO DNA	33
3.12.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	34
3.12.1.	EXTRAÇÃO TOTAL DE RNA	34
3.12.2.	MICROARRAY DE EXPRESSÃO	35
3.12.3.	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	36
3.13.	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR	36
3.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.	RESULTADOS	38

4.1. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ MORTE CELULAR NAS CÉLULAS U87 SEM OCASIONAR ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS APARENTES-----	38
4.2. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO INDUZIDAS PELO FLÚOR EM IMR-32 E U87-----	41
4.3. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ MORTE CELULAR POR NECROSE EM CÉLULAS U87 -----	43
4.4. METABOLISMO OXIDATIVO OCACIONADO PELA EXPOSIÇÃO AO FLÚOR: PAPEL DA GSH -----	44
4.5. FRAGMENTAÇÃO DO DNA INDUZIDA PELO FLÚOR -----	46
4.6. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ ALTERAÇÕES NO PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO GENICA DAS CÉLULAS U87 -----	47
4.7. ANALISE DE ENRIQUECIMENTO GENE ONTOLOGY (GO) BASEADA NOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS-----	51
4.8. ANALISE DE VIAS MOLECULARES ALTERADAS APÓS A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR -----	53
4.9. INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA E ANALISE DE HUB GENES-----	55
4.10. AMPLIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POR RT-QPCR -----	60
5. DISCUSSÃO -----	61
6. CONCLUSÃO -----	69
7. REFERÊNCIAS-----	70
8. APENDICE -----	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O flúor é um elemento químico de número atômico 9 e massa atômica 19, pertencente à família dos halogênios. Na sua forma biatômica ( $F_2$ ) e em condições padrão de temperatura e pressão, pode ser encontrado sob a forma gasosa com coloração amarelada e odor característico, apresentando ponto de fusão e ebulição de -219,62 e -188,12°C, respectivamente. O flúor é capaz de se associar a diversos outros elementos, incluindo alguns gases nobres, devido a sua intensa eletronegatividade (é o elemento mais eletronegativo de acordo com a escala de Linus Pauling). Por este motivo raramente é encontrado na natureza em sua forma elementar. Vale ressaltar também que a ligação do flúor com outros elementos apresenta maior força de ligação quando comparado com o  $F_2$ .

Dentre as suas combinações mais relevantes, o flúor é capaz de fazer ligações com a água dando origem ao ácido fluorídrico e com íons metálicos dando origem aos fluoretos (Haynes e col., 2015). Naturalmente, o flúor se encontra vastamente distribuído pela crosta terrestre, com uma concentração aproximada de 950 ppm. Pode ser classificado como 13º elemento mais abundante na crosta terrestre, com um total de 0,03% de massa. Acredita-se que a fluorita ( $CaF_2$ ) representa seu mineral mais característico (contendo 49% de fluoreto), no entanto, o flúor ainda pode ser encontrado em outros minerais como a criolite ( $3NaFAIF_3$ , contendo 54% de fluoreto) e fluorapatita ( $CaF_2.3Ca_3.(PO_4)_2$ , contendo 3,4% de fluoreto) (Cruz e Peixoto, 1991; Agnelli, 2015).

A biodisponibilidade do flúor depende de inúmeros fatores, como por exemplo, a presença de outros minerais e água no solo. Além disso, acredita-se que regiões que contém a presença de pedras rochosas ou de depósitos marinhos possuem as melhores condições para o depósito de flúor, podendo atingir concentrações de até 10 ppm (Cruz e Peixoto, 1991). Nos solos sua concentração aumenta de acordo com a profundidade, no entanto, a superfície de algumas regiões podem possuir altas concentrações de flúor devido os efeitos da ação antropogênica. A ocorrência natural de flúor nas águas ocorre de maneira semelhante ao solo. No mar e em águas superficiais de rios e lagos, o flúor pode ser encontrado em baixas concentrações, não maiores que 1,5 ppm e 0,3 ppm respectivamente. Já em águas subterrâneas as concentrações de flúor podem atingir níveis superiores a 35 ppm (Kanduti e col., 2016).

Dados da literatura sugerem que a primeira utilização de flúor data do ano de 1530 onde era utilizado com o intuito de facilitar a fusão de metais. Acredita-se que por

este motivo os compostos formados a partir da interação do flúor com metais receberam o nome de “fluoretos”, denominação que provém do latim *fluere* que significa “deixar fluir” (Prystupa, 2011). Com o passar dos anos o flúor passou a ser produzido industrialmente através da eletrólise do fluoreto de hidrogênio (HF) e fluoreto de potássio (KF), utilizando eletrodos de platina (Pt) e irídio (Ir). Nesta reação o KF é convertido a bifluoreto de potássio (KHF<sub>2</sub>) ocasionando o aumento da condutividade elétrica da solução, ocasionando a formação de H<sub>2</sub> e F<sub>2</sub>. Este processo foi descrito pela primeira vez em 1886 por Henri Moissan garantindo assim o prêmio Nobel de química em 1906 (Downing e col., 1947; Prystupa, 2011).

Foi somente no ano de 1940 que houve uma intensa produção comercial de flúor, no que ficou conhecido como projeto Manhattan. Este projeto tinha como objetivo a produção de hexafluoreto de urânio (UF<sub>6</sub>), um composto de urânio mais estável, que seria utilizado para a separação de isótopos de urânio durante a fabricação de bombas atômicas (ATSDR, 2003). Dessa forma, a utilização de compostos contendo flúor em bombas atômicas proporcionou a produção de bombas como as de Hiroshima e Nagasaki durante a segunda guerra mundial. Nesse mesmo período, datam-se os primórdios das pesquisas relacionadas ao consumo de flúor por humanos. Nos campos de concentração nazista o flúor era utilizado na água em concentrações superiores a 1500ppm com o objetivo de acalmar prisioneiros para que realizassem o trabalho escravo. A partir dos resultados observados nos campos nazistas, diversos medicamentos psiquiátricos foram posteriormente produzidos, visto que a ingestão excessiva de flúor possui como uma das suas principais características o efeito tranquilizante em seres humanos (Narvai, 2000).

Foi então com o surgimento das indústrias que o flúor passou a ser utilizado em diversas aplicações como na produção de inseticidas, pesticidas, suplementação alimentar, cremes dentais, bem como nas indústrias de petróleo, vidro e alumínio. Na indústria de alimentos, o flúor pode ser encontrado na carne, peixes, cereais e chocolates (Kandunti e col., 2016). A tabela 1 mostra a concentração de flúor em diferentes tipos de alimentos. Outra fonte de exposição humana ao flúor é através da utilização de compostos orgânicos contendo flúor e cloro, que são denominados de clorofluorcarbono (CFCs). Os CFCs são amplamente utilizados como líquidos de refrigeração em aparelhos domésticos e industriais. Eles também podem ser encontrados como propelente em inseticidas na forma de aerossóis. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) após a década de 50 o flúor passou a ser

considerado o principal gás contaminante presente na atmosfera, sendo que mais de 155 mil toneladas de flúor foram liberadas durante a década de 60 (OMS, 2000). Esses dados apontam também para um importante papel dos compostos fluoretados na destruição da camada de ozônio.

Quadro 1: Concentração de fluoreto em diferentes tipos de alimentos. (adaptado de Departamento de agricultura dos EUA, 2005)

Alimento	Concentração de flúor (ppm)
Chá preto	3-5
Mariscos	2-3
Vinho	1-2
Chá verde	1.2
Batata frita	0.7
Cerveja	0.5
Porco	0.42
Arroz	0.41
Salame	0.4
Pão (branco ou integral)	0.39
Queijo cheddar	0.35
Carne	0.22
Atum	0.2
Frango	0.15
Iogurte	0.12

## 1.2. POTENCIAL TERAPÊUTICO DO FLÚOR

A utilização do flúor no tratamento de doenças surgiu pela primeira vez após observações feitas por McKay e Black no ano de 1916. Após avaliarem crianças na cidade de Colorado Spring – Estados Unidos (EUA) os autores perceberam que as crianças possuíam o esmalte dentário manchado e baixa prevalência de cárie, o que não acontecia em outras cidades do país. Buscando compreender estas diferenças, McKay passou a estudar as condições climáticas e os hábitos alimentares nas diferentes cidades do país até concluir que a única diferença era a concentração de flúor presente na água ingerida por cada população (McKay e Black., 1916; McKay, 1928). Assim, foi observado que crianças que possuíam sintomas de fluorose dentária (dentes manchados) e baixa incidência de cárie, ingeriam águas de abastecimento com concentrações de aproximadamente 14ppm, enquanto as que não possuíam os sintomas ingeriam água com concentrações inferiores a 2ppm. Esses achados levaram McKay e Black a questionar se o flúor poderia ser utilizado em condições terapêuticas para evitar o aparecimento de cáries na população em concentrações seguras e livres de efeitos colaterais.

Assim, no ano de 1950 após anos de estudos e confirmações científicas, a Associação Americana de odontologia (ADO) passou a recomendar oficialmente a fluoretação das águas de abastecimento público para o controle da cárie dentária em concentrações que não excedessem a 0,7ppm. Esta medida foi posteriormente oficializada por diversas associações nacionais e internacionais de odontologia além de ser aprovada pela OMS (Narvai, 2000; O'Mullane e col., 2016).

No Brasil, os primeiros registros de fluoretação da água datam de 1953 no município de Baixo Guandu – ES, onde ficou estabelecida a concentração de 0,8 ppm (Ministério da saúde, 2009). Seis anos depois esse procedimento passou a ser adotado nas cidades do estado de São Paulo, seguido de Rio Grande do Sul e na cidade de Curitiba. Foi somente na década de 70, por decisão do governo federal sob a lei de número 6.050 de 24/5/74, regulamentada pelo decreto 76.872, de 22/12/75, que se tornou obrigatória a fluoretação da água no Brasil em qualquer lugar que houvesse estações de tratamento (Narvai, 2000). A lei determina que a água de abastecimento público fosse suplementada com fluossilicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ ), ácido fluossilícico ( $\text{H}_2\text{SiF}_6$ ), fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) ou fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ) (Agnelli, 2015). No entanto, em estudo realizado por Frazão e Narvai (2017) foi possível constatar a desigualdade na cobertura de fluoretação das águas no Brasil, demonstrando que em

termos de estados o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Bahia e Tocantins lideram com a maior cobertura (85 a 100%) enquanto Acre, Amapá, Rio Grande do Norte e Paraíba possuem a pior cobertura (até 0,9%) (Figura 1).

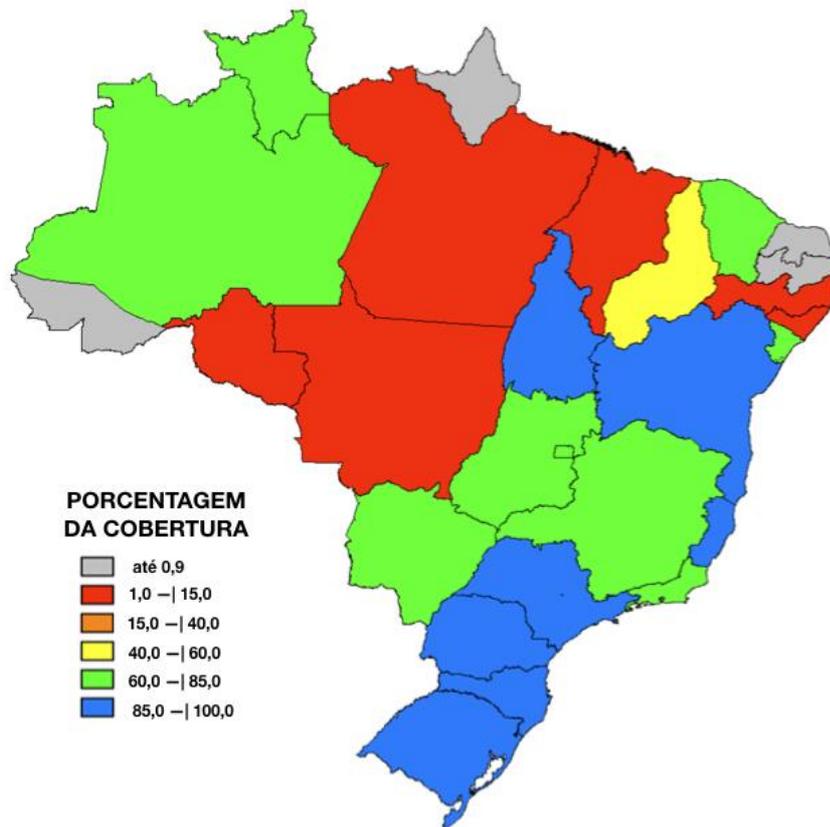


Figura 1: Classificação das Unidades Federativas brasileiras segundo a porcentagem de cobertura da florestação de água em municípios com mais de 50 mil habitantes entre os anos de 2011 e 2015. (Frazão e Narvai 2017).

Dados da literatura sugerem que após a fluoretação das águas de abastecimento público houve uma intensa melhoria na saúde bucal da população brasileira. O Ministério da saúde, juntamente com a Associação Brasileira de Odontologia (ABO) demonstraram que em 1986 o índice CPO-D (índice epidemiológico que mensura o número de dentes cariados perdidos e obturados por indivíduo adulto) encontrava-se extremamente elevado, com um valor de aproximadamente 7 (índice CPO-D). No entanto, 10 anos depois foi observada uma diminuição próxima a 53% nos níveis de cárie, levando o índice CPO-D para o valor de 3,1, próximo ao valor sugerido como satisfatório pela OMS (CPO-D  $\leq$  3). Já no ano de 2010, o Brasil entrou efetivamente no grupo de países que apresentam baixa prevalência de cárie bucal após atingir um índice CPO-D igual a 2,1 (Ramires e Buzalaf, 2007; Dos santos e Dos Santos 2011; Agnelli, 2015).

Apesar da relevante importância da fluoretação da água para a população brasileira, comunidades mais afastadas que não possuem o tratamento adequado nas centrais de abastecimento permanecem com a saúde bucal prejudicada (Narvai e col., 2006). Visando contornar esses problemas, outras estratégias foram assumidas, como por exemplo, a introdução dos dentifrícios fluoretados no mercado brasileiro no ano de 1988, o que ocasionou a entrada do flúor em 90% dos produtos que estavam disponíveis aos consumidores (Cury e Tabchoury, 2003).

No início da década de 90, os fluoretos também passaram a ser utilizados no tratamento de osteoporese em mulheres após o período de menopausa. Acredita-se que a suplementação com flúor pode estimular osteoblastos e aumentar a formação de massa óssea inclusive em pacientes que já apresentam quadro de osteoporose (Riggs e col., 1990; Pitt e Berry, 1991; Kleerekoper, 1998). Sendo assim, acredita-se que são muitos os benefícios gerados pela introdução do flúor no cotidiano da população, seja pela ingestão de água fluoretada ou pelo uso de produtos que o contenham em sua composição (Cury e col., 2005; Cury e Tenuta, 2008). No entanto, o uso indiscriminado de flúor em diversos compostos pode ocasionar a exposição indesejada de grande parte da população a concentrações capazes de ocasionar danos ao organismo. Um exemplo disso é o que acontece em cidades dos Estados Unidos que recebem 0.7 - 1.2mg/L de flúor nas águas de abastecimento público. Um estudo revelou que crianças e adultos que vivem nessas cidades recebem em média 0.9 a 3.6 e 0.6 a 6.6mg por dia respectivamente, quando considerado todas as fontes de ingestão de flúor, como água, alimentos e utilização de produtos de higiene bucal (Malin e Till, 2015). Vale lembrar

que o flúor pode ser classificado como um elemento traço, ou seja, originalmente ele é visto como um nutriente importante para o organismo, no entanto, a ingestão em excesso ( $>5\text{mg/Kg}$ ) pode se tornar prejudicial (Whitford, 2011).

Diversos estudos já demonstraram que quando em excesso, o flúor pode trazer diversos problemas tanto para a saúde oral quanto para o organismo como um todo (Mullenix e col., 1995; Maltz e Wannmacher, 1999). Foi observado que crianças em fase de crescimento, que ainda não possuíam controle adequado da deglutição durante o processo de escovação, poderiam ingerir altas concentrações de flúor por acidente. Dados sugerem que, em média, uma criança que escova os dentes 4x ao dia, é capaz de deglutir o valor aproximado de 1,2 mg de flúor sem considerar o flúor presente na água (Agnelli, 2015). Dessa forma, baseado nesses achados, sugeriu-se que as pastas de dentes infantis possuíssem concentrações de flúor inferiores das pastas comercializadas para adultos.

Ingle e colaboradores (2014) demonstraram que a problemática da utilização de pastas fluoretadas representa um problema um tanto maior, visto que seus dados sugeriram que a utilização de pastas contendo 500 ppm e 1000 ppm ocasionam o aumento da concentração de flúor na saliva de 0,2 a 3,6 ppm e de 0,2 a 7,7 ppm, respectivamente. Esses dados sugerem que dependendo da biodisponibilidade, o flúor pode rapidamente ser absorvido sem que haja a deglutição e elevar a concentração sistêmica a níveis prejudiciais à saúde humana.

A partir do exposto, fica clara a importância dos estudos visando a elucidar os mecanismos toxicológicos do flúor, a fim de compreender se mesmo em baixas concentrações este composto é seguro para utilização pela sociedade.

### 1.3. FARMACOCINÉTICA DO FLÚOR

A ingestão de flúor na sua forma solúvel possui uma absorção completa, enquanto que a utilização tópica ocasiona aproximadamente 84% podendo chegar a 100% de absorção (Drummond e col., 1990). Whitford (1997) sugeriu que a absorção do flúor ocorre de maneira rápida, aproximadamente 30 min após a ingestão, sendo altamente influenciada pelo pH da solução.

Acredita-se que a presença constante de flúor na cavidade oral facilita sua absorção. No entanto, dados da literatura sugerem que é no trato gastrointestinal onde ocorre a maior taxa de absorção devido à acidez estomacal. Vale lembrar que o fluoreto se liga de maneira irreversível ao hidrogênio formando o ácido fluorídrico (HF), um ácido fraco com  $pK_a$  3,4. Assim, a formação de HF no estômago facilita a entrada de flúor de maneira passiva por difusão através da membrana celular sem que ocorra a necessidade da presença de proteínas transportadoras (Whitford, 1990). Além disso, trabalhos sugerem que uma vez que a absorção não ocorra no trato gastrointestinal, o flúor ainda pode ser absorvido no intestino, através de canais presentes nas junções celulares, de maneira não dependente ao pH (Das e Susheela, 1993; Kanduti e col., 2016). Uma vez absorvido pelo organismo, os níveis de flúor no plasma sanguíneo aumentam rapidamente e o flúor é então carregado pela corrente sanguínea onde atinge diversos órgãos e tecidos (Fawell e col., 2006). O acúmulo de flúor ocorre preferencialmente no plasma sanguíneo, no tecido ósseo e em tecidos moles como fígado e rins (Figura 2). No entanto, estudos recentes sugerem que o flúor é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica podendo se acumular no sistema nervoso central (SNC) (Niu e col., 2008; Basha e Sujitha, 2012).

Dados da literatura demonstram que as concentrações de flúor nos diferentes tecidos segue um equilíbrio dinâmico com o conteúdo presente no plasma sanguíneo visto que o flúor não é capaz de se ligar a nenhum tipo de proteína plasmática (Spittle, 1994). Em indivíduos adultos, 50% do fluoreto absorvido se acumulam em tecidos calcificados como o dente e o osso. No entanto, é importante ressaltar que esse acúmulo não ocorre de maneira irreversível, visto que o flúor pode ser liberado de volta ao plasma quando as concentrações plasmáticas se tornam baixas (Buzalaf e Whitford, 2011). Por outro lado, o flúor presente nos tecidos moles apresenta um estado estacionário de distribuição entre os líquidos intra e extracelular, sendo que de maneira geral a concentração de fluoreto nos tecidos moles apresenta-se de maneira inferior a concentração presente no plasma sanguíneo.

A excreção do flúor pode ocorrer pelo suor, fezes e leite materno, mas a excreção pela urina representa a principal via de eliminação do flúor. A figura 2 também sugere que parte do flúor que entra nos rins pode ser reabsorvida pelos túbulos renais (Figura 2) (Fawell e col., 2006; Kanduti e col., 2016). A reabsorção do flúor nos rins ocorre de maneira dependente do pH da urina, sendo que uma urina neutra facilita uma maior excreção do flúor, enquanto que urinas mais ácidas favorecem a formação de HF, que pode ser reabsorvido ao fluido intersticial também por difusão (Silva, 2003).

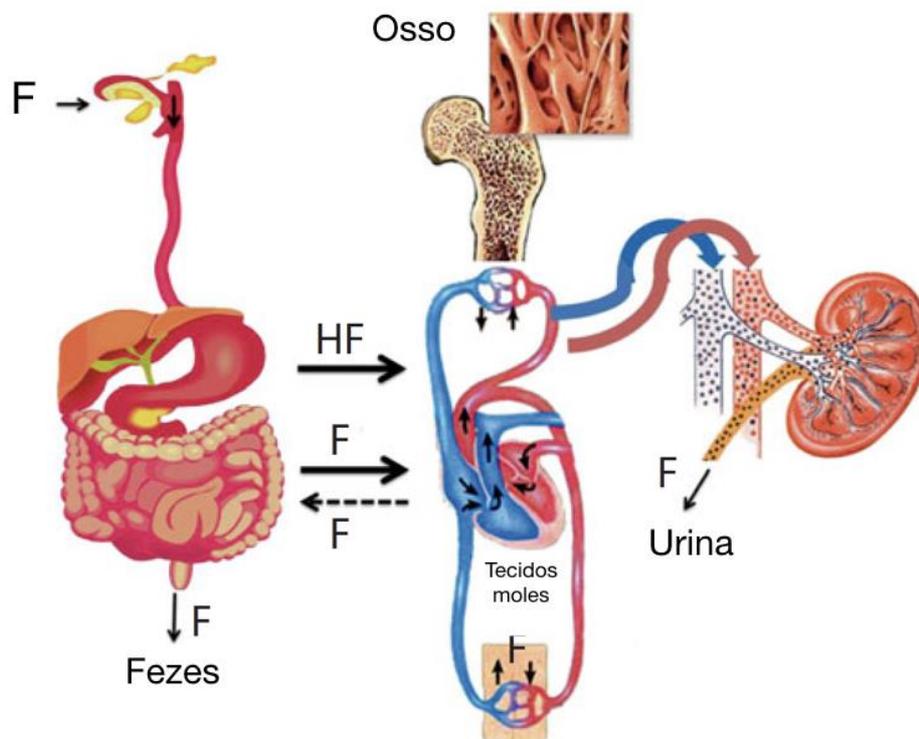


Figura 2: Características gerais do metabolismo do fluoreto no corpo humano. (Modificado de Buzalaf e Whitford, 2011)

#### 1.4. FARMACODINÂMICA DO FLÚOR

No que se refere a sua toxicidade, a literatura sugere que a ingestão de flúor pode ocasionar a formação de complexos insolúveis devido a sua ligação a compostos catiônicos como cálcio, magnésio e alumínio (Whitford, 1997). Sua ligação ao cálcio favorece a formação de pequenas ionosferas que possuem extrema facilidade em atravessar membranas celulares interferindo assim em importantes processos biológicos (Sireli e Bülbü, 2004). Além disso, sua ligação a compostos metálicos como alumínio ocasiona a formação de complexos inorgânicos que possuem relativo efeito toxicológico para a célula (Barbier e col., 2010).

Os efeitos tóxicos do flúor podem ser observados após exposição aguda através da administração de doses elevadas de maneira frequente, ou de maneira crônica, através da ingestão de baixas doses constantemente. Em 1942, um acidente envolvendo a ingestão de fluoreto no hospital estadual de Oregon, levou a toxicidade aguda e morte de pacientes na cidade de Salem (EUA). Análises forense revelaram posteriormente que o envenenamento dos pacientes aconteceu devido a utilização de fluoreto de sódio em pó no lugar de leite. Além disso, também foi relatado em 1992 por Whitford e colaboradores o consumo acidental de compostos fluoretados que levaram a morte de três pessoas nos estados unidos. No entanto, é importante ressaltar que estes eventos de toxicidade aguda podem ser considerados como quadros isolados e raros de acontecer.

Por outro lado, a intoxicação crônica representa uma realidade mais próxima ao enfrentado pela população em diversas regiões do mundo. Este tipo de exposição está frequentemente associado à fluorose dentária, que como mencionado anteriormente pode ocasionar o aparecimento de manchas nos dentes (Aoba e Fejerskov, 2002; Kanduti e col., 2016), com a fluorose esquelética (um quadro mais grave da exposição ao flúor), bem como a alterações renais. No que se refere a fluorose esquelética, Li e colaboradores (2001) demonstraram que quando ingerido em excesso, o flúor pode apresentar um efeito reverso ao inicialmente pretendido, sugerindo que a ingestão de água fluoretada com concentrações maiores que 4ppm ao invés de proteger contra os danos ocasionados pela osteoprose pode induzir fragilidade óssea e aumentar o risco de fraturas. Já as alterações renais foram descritas pela primeira vez na década de 60 após a utilização de anestésicos contendo metoxiflurano. É importante lembrar que os rins por ser a principal via de excreção de flúor, frequentemente estão expostos a alta concentrações do composto, sendo por isso mais facilmente observáveis efeitos adversos em situações de ingestão excessiva. Os altos níveis de flúor podem então

ocasionar diurese, baixa osmolaridade da urina, hemoconcentração e desbalanço de eletrólitos (Whitford e Taves, 1971).

A literatura sugere que a provável dose tóxica do flúor é em torno de 5mg/Kg (equivalente a 11mg/Kg de NaF) (Whitford, 2011) sendo assim, em situações onde a fluoretação das águas de abastecimento público ocorrem de maneira controlada, a ingestão dessa quantidade de flúor se torna impossível, no entanto, é necessário levar em consideração a ingestão concomitante através de outras fontes de obtenção do flúor (Whitford, 2008/2011). Vale lembrar que a via oral não representa a única via de exposição ao flúor. A literatura também sugere que a intoxicação também pode ocorrer após a inalação e absorção pela pele.

Dentre os principais mecanismos de toxicidade, sugere-se que o flúor possui um efeito dual dependente de concentração. Em altas concentrações, o flúor foi caracterizado como um potente inibidor enzimático enquanto que baixas concentrações podem estar relacionadas com efeitos durante o desenvolvimento do ciclo celular, envolvendo mecanismos de crescimento, proliferação, e morte celular (Adamek e col., 2005; Barbier e col., 2010). Acredita-se que a interferência no ciclo celular seja ocasionada pela ação do flúor em vias de sinalização como proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK), p53, proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Zhang e col., 2007; Zhang e col., 2008; Karube e col., 2009)

Diversos trabalhos vêm demonstrando que estes efeitos tóxicos ocasionados pela exposição ao flúor, podem estar relacionados com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), tanto em modelos (*in vivo* e *in vitro*) como em análises clínicas em populações com fluorose dentária (Shivarajashankara e col., 2001; Chen e col., 2009; Barbier e col., 2010; Miranda e col., 2018). Em 2001, Anuradha e colaboradores demonstraram que a exposição de células HL-60 ao flúor pode ocasionar uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial bem como de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, ocasionando a liberação de citocromo C e ativação de vias apoptóticas mediadas pela ação de caspases.

O papel do estresse oxidativo também já vem sendo amplamente discutido na literatura. Em 2018, Miranda e colaboradores demonstraram que a exposição de roedores a 10 e 50mg/L, pode mimetizar os níveis de flúor no sangue periférico de indivíduos que consomem água fluoretada ou que vivem em áreas de exposição

endêmica. Os autores demonstram que os níveis de flúor no sangue periférico podem ocasionar aumento de peroxidação de lipídeos de membrana (TBARS) e na capacidade antioxidante (TEAC) bem como a diminuição de óxido nítrico, catalase e glutatona, enquanto nenhum efeito foi observado nos níveis de SOD.

No entanto, é importante também ressaltar que outros estudos já demonstraram que flúor pode ocasionar a inibição de enzimas importantes para o controle redox da célula, como a superóxido desmutase (SOD), glutatona peroxidase (Gpx) e catalase (Nobes e Hall, 1995; Izquierdo-Veja e col., 2008; García-Montalvo e col., 2009). Por outro lado, também já foi demonstrado que a indução de morte celular após exposição ao flúor também pode acontecer independente da indução de ERO. Lee e colaboradores (2008) demonstraram que fibroblastos expostos ao flúor apresentam uma superexpressão do ligante Fas, que está relacionado com a indução de morte celular via receptores de morte presentes na membrana.

Outro possível mecanismo de ação do flúor seria através de sua capacidade em se ligar ao cálcio. Dessa forma, alguns autores acreditam que os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  possam estar direta ou indiretamente ligados a indução de morte celular por apoptose. Este mecanismo pode acontecer devido à ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem após intoxicação, no entanto estudos adicionais ainda são necessários para esclarecer o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  na toxicidade do flúor (Barbier e col., 2010).

### 1.5. GENOTOXICIDADE DO FLÚOR

De acordo com o programa nacional de toxicologia os fluoretos podem ser classificados como compostos mutagênicos devido sua capacidade de induzir alterações ao material genético em diversas espécies, como drosófila, roedores e humanos (Muherjee e Sobels, 1968; Podder e col., 2009; Zhang e col., 2008; Song, e col., 2015; Verma e col., 2016). Dentre as principais metodologias para se avaliar danos ao material genético, podemos citar as fragmentações de fita simple e de fita dupla do DNA, mutações, sítios incompletos de reparo, aberrações cromossômicas, micronucleos e troca de cromátides-irmãs (Bolognesi e Fenech, 2013).

A literatura sugere que a exposição ao fluoreto pode ocasionar danos ao material genético como a formação de micronúcleo, aberrações cromossômicas e quebras ao DNA. No entanto, outros trabalhos sugerem que concentrações semelhantes não são capazes de ocasionar danos ao conteúdo gênico tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Li e col.,

1988; Smith, 1990). Baseado na incongruência de resultados encontrados em relação a genotoxicidade do fluoreto é importante ressaltar que os danos ao material genético induzido pelo flúor dependem da concentração e tempo relativo de exposição, devendo ainda ser levado em consideração o tipo celular e o período de divisão de cada célula (Li e col., 1988; Buzalaf e col., 2006; Dharmshaktu, 2013).

Podder e colaboradores (2011a, 2011b) demonstraram que camundongos que consumiam 7,5 mg de NaF apresentavam baixa taxa de divisão celular na medula óssea além de apresentar aberrações cromossômicas. A formação de micronucleos também foi demonstrada em eritrócitos policromáticos após o consumo de água contendo fluoreto de sódio em concentrações superiores a 4mg/L (Manivannan e col., 2013). Por outro lado, quando avaliado o efeito genotóxico do flúor em células sanguíneas de ratos, nenhuma evidência de alterações gênicas foram encontradas (Ribeiro e col. 2004). Em 1987, Pati e colaboradores sugeriram que as análises genotóxicas possuem diferentes sensibilidades quando estudadas após exposição ao fluoreto, possuindo maior probabilidade de apontar danos ao material genético as análises de aberrações cromossômicas, seguidas de ensaio por micronúcleo. Por outro lado, um maior consenso é observado quando avaliado o efeito genotóxico do fluoreto *in vitro*. As alterações cromossômicas já foram demonstradas em diversos tipos de células de mamíferos bem como em células germinativas de drosófilas (Muherjee, 1968; Tsutsui e col., 1984; Aardema e Tsutsui, 1995; Dutta e col., 2017). Células HepG2 expostas por 24h ao fluoreto de sódio apresentaram significativa fragmentação de DNA em concentrações superiores a 10µg/mL (Verma e col., 2016).

Em humanos, poucos estudos relacionados com alterações ao material genético já foram realizados em populações que vivem em regiões de exposição endêmica ao fluoreto e indivíduos que sofrem por exposição ocupacional. Trabalhadores do norte da China que são expostos ao HF e SiF<sub>4</sub> apresentam um aumento na porcentagem de micronucleos, aberrações cromossômicas e troca de cromátides-irmãs em linfócitos de sangue periférico (Meng e col., 1995; Meng e Zhang, 1997).

Dentre os principais mecanismos que levam a genotoxicidade acredita-se que os danos genéticos induzidos pelo flúor são consequência da indução de danos à mitocôndria e ao desbalanço oxidativo. A figura 3 sugere que a exposição ao flúor pode ocasionar danos de mitocôndria com diminuição na síntese de ATP e liberação de citocromo C oxidase. Essas alterações podem levar a ativação das caspases 3 e 9, culminando com a indução de morte celular por apoptose. Outro possível mecanismo

seria a formação de espécie reativas de oxigênio e diminuição de enzimas oxidavas como a catalase, levando ao quadro de peroxidação lipídica. Estas alterações podem ocasionar interferências no ciclo celular durante as fases G1/S ou G2 do ciclo celular, que podem ser ocasionadas principalmente devido à formação de EROs. No entanto, este mecanismo ainda não se encontra completamente elucidado, sendo ainda necessário a elucidação dos mecanismos epigenéticos e nos sistemas de reparo do DNA (Orren e col., 1997, Podder e col., 2011, Ribeiro e col. 2017).

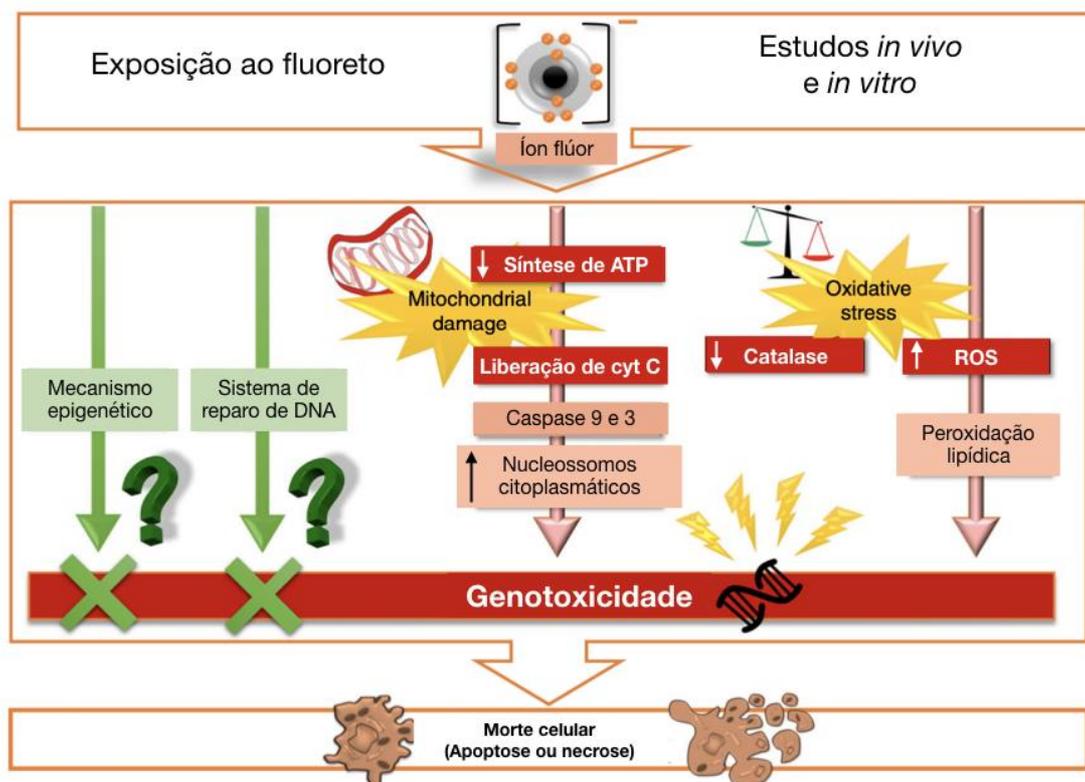


Figura 3: Principais mecanismos de genotoxicidade do flúor. (Adaptado de Ribeiro e col., 2017)

Baseado no exposto acima, diversos estudos procuram demonstrar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do fluoreto em diferentes modelos, no entanto, é importante ressaltar que a maior parte dos presentes estudos relacionados a toxicidade e genotoxicidade do flúor analisa os efeitos nos tecidos ossos, células do trato oral e sistemas glandulares, fibroblastos, linfócitos e tecidos moles como estômago, rins e fígado, sendo poucos os estudos que abordem este tema relacionado ao sistema nervoso central (SNC) (Li e col., 1987; Khalil e Da'dara, 1994; Podder, e col., 2009).

#### 1.6. EFEITOS DO FLÚOR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os primeiros trabalhos a respeito do envolvimento do flúor no SNC relataram que as concentrações de flúor encontradas no cérebro de diferentes modelos animais eram as menores quando comparadas com tecidos como fígado e rins (0.1, 4 e 1ppm, respectivamente) (Whitford e col., 1979; Buzalaf e col., 2011). Em seres humanos, Yu-Huan e Si-Shung (1988) demonstram que pessoas que ingeriam água contendo 1 e 10 ppm de flúor apresentavam níveis detectáveis de flúor no líquido cefalorraquidiano, embora menores que os níveis encontrados no plasma sanguíneo. Isso acontece devido a relativa impermeabilidade da barreira hematoencefálica ao flúor, no entanto estudos já comprovaram que quando disponível em altas concentrações pode facilmente transpor-la e se acumular nos diferentes tecidos cerebrais (Yu-Huan e Si-Shung, 1988; Buzalaf e Whitford, 2011).

Estudos posteriores demonstraram significativas alterações clínicas em pessoas expostas a altas concentrações de flúor. Em 1994, Spittle e colaboradores demonstraram que a ingestão contínua de 1mg de flúor pode ocasionar alterações visuais, enxaqueca e depressão. Nesse estudo também foi relatado um significativo declínio cognitivo, com diminuição na capacidade de armazenar informações e na habilidade de escrita. O mesmo quadro cognitivo já foi demonstrado em crianças em desenvolvimento que consumiam água contendo aproximadamente 4ppm de flúor. Os autores demonstraram uma significativa diminuição das habilidades cognitivas, como aprendizado e memória, quando comparadas com crianças que consumiam água contendo em média 0,4 ppm de flúor (Li e col., 1995; Lu e col., 2000). Além disso, em 2018, Duan e colaboradores demonstraram através de uma revisão sistemática da literatura seguida de meta-análise, que regiões que apresentam altas concentrações de flúor nas águas de abastecimento público possuem o menor índice de coeficiente de inteligência (QI) em crianças até 16 anos. Esses dados revelam um importante papel da toxicidade do flúor no

desenvolvimento do sistema nervoso central, podendo causar alterações principalmente na cognição (Choi e col., 2012; Bashash e col., 2017/2018). Outro importante efeito neurotóxico do flúor diz respeito a possível associação com o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (DDA), onde foi demonstrado que a partir de 1991 o aumento em 1% da fluoretação das águas de abastecimento público nos EUA poderia estar associado com 131mil novos casos de DDA diagnosticados entre 2003 e 2011 (Malin e Till, 2015).

É importante lembrar também que outras alterações neurológicas já foram descritas na literatura após a exposição ao fluoreto, como as alterações no sistema sensorial - com a indução de quadros de parestesia, alterações motoras como paresia e tetania, alterações músculo-esqueléticas e mielopatia (Heifetz e Horowitz, 1984; Haimanot e col., 1990; Saha e col., 2015). As alterações no sistema sensorial auditivo também já foram relatadas, no entanto, uma revisão sistemática da literatura apresentou em 2014, baixa evidência da capacidade do flúor em ocasionar diminuição na capacidade auditiva em pacientes adultos após o tratamento com fluoreto de sódio (Balle e Linthicum, 1984; Hentschel e col., 2014).

Buscando compreender como o flúor afeta o SNC estudos têm sido realizados em modelos animais e de cultivo celular. Mullenix e col. (1995) demonstraram que a exposição crônica ao NaF em ratos da linhagem Sprague-Dawley ocasiona depósito de flúor em diversas regiões cerebrais como hipotálamo, cerebelo, gânglio basal, mesencéfalo, córtex e hipocampo. Além disso, também foi demonstrado que as fêmeas são mais susceptíveis à exposição ao flúor, sendo necessário longas exposições e altas concentrações para que resultados semelhantes sejam observados em ratos machos (Gad e Chengelis, 1988; Mugford e Kedderis, 1998).

Sabendo-se que o flúor é capaz de ser secretado pelo leite materno e pode atravessar a placenta durante a gestação, estudos demonstraram que o flúor poderia ocasionar danos em diferentes momentos do desenvolvimento do SNC (Bhatnagar e col., 2002; Basha e col., 2011; Bartos e col., 2015). Ao avaliar a ação do flúor em ratos recém-nascidos, que sofreram exposição durante o período gestacional, foi observado que baixas concentrações não são capazes de ocasionar casos de teratogênese. No entanto, alterações comportamentais foram observadas quando foram avaliados a capacidade locomotora, comportamento do tipo ansiedade e resposta a reflexos (Bartos e col., 2015). Sinais de hiperatividade também já foram identificados em ratos jovens que foram expostos durante o período gestacional (Mullenix e col., 1995). Em ratos

adultos foi demonstrado que uma significativa diminuição na consolidação da memória e no processo de aprendizagem acontece após a ingestão de flúor (Niu e col., 2009; Pereira e col., 2011).

A literatura também sugere que o flúor pode ocasionar alterações histopatológicas no SNC, levando a danos nas principais células do SNC, os neurônios e células gliais (Balle e Linthicum, 1984; Shivarajashankara e col. 2002; Akinrinade e col., 2015). Shivarajashankara e colaboradores (2002) demonstraram que ratos expostos a 100ppm de flúor durante o período neo, pré e pós-natal, apresentavam significativa alteração no hipocampo, amígdala, cortex motor e cerebelo. Essas alterações relacionavam-se a diminuição no tamanho e número de neurônios em todas as regiões avaliadas, diminuição do número de neurônios de Purkinje no cerebelo, e aumento de cromatólise e gliose no cortex motor.

Dentre os possíveis mecanismos para compreender os danos que o flúor ocasiona no SNC, já foi demonstrado que o flúor pode inibir a síntese de polifosfoinositídeos prejudicando a comunicação neuronal mediada pela fosfolipase C (Sarri e Claro, 1999). Quando ratos Wistar foram expostos a 100ppm de NaF por 30 dias foi observado um significativo aumento nos níveis de noradrenalina e serotonina no estriatum, hipocampo e neocortex, enquanto o aumento de dopamina foi observado somente no estriatum (Pereira e col., 2009). Além disso, estudos recentes demonstraram que a exposição crônica ao flúor pode ocasionar alterações na plasticidade sináptica devido principalmente a alterações na liberação de neurotransmissores como glutamato e GABA (Niu e col., 2009; Qian e col., 2013).

As alterações nos sistemas de neurotransmissores podem estar intimamente ligadas a diminuição cognitiva observada tanto em modelos quanto em seres humanos. No entanto, também se deve atentar para alterações nos componentes de liberação e ligação de neurotransmissores no SNC. Han e colaboradores (2014) demonstraram que os déficits cognitivos ocasionados pela exposição crônica ao flúor podem estar relacionados com alterações no complexo de proteínas SNARE, sendo o componente VAMP-2 de extrema importância para a compreensão deste fenômeno. A literatura também sugere uma diminuição na expressão dos receptores nicotínicos bem como na expressão de proteínas das subunidades  $\alpha 4$  e  $\alpha 7$  (Long e col., 2002; Chen e col. 2003). Além disso, já foi demonstrado que os níveis de mRNA de receptores metabotrópicos de glutamato, como mGluR5 podem estar diminuídos em regiões hipocámpais, contribuindo para o aparecimento de alterações cognitivas (Jiang e col., 2014).

Sabendo-se que alterações no sistema glutamatérgico podem estar relacionadas com o aumento da excitotoxicidade, trabalhos recentes demonstraram que dentre os mecanismos moleculares de toxicidade do flúor no SNC, encontram-se a formação de espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA e indução de morte celular por apoptose (Blaylock, 2004; Zhang e col., 2007/2008). De fato, a excitotoxicidade ocasionada pelo glutamato tem sido apontada como o principal mecanismo de neurotoxicidade do flúor. A figura 4 sintetiza as principais alterações encontradas no SNC após a exposição ao flúor.

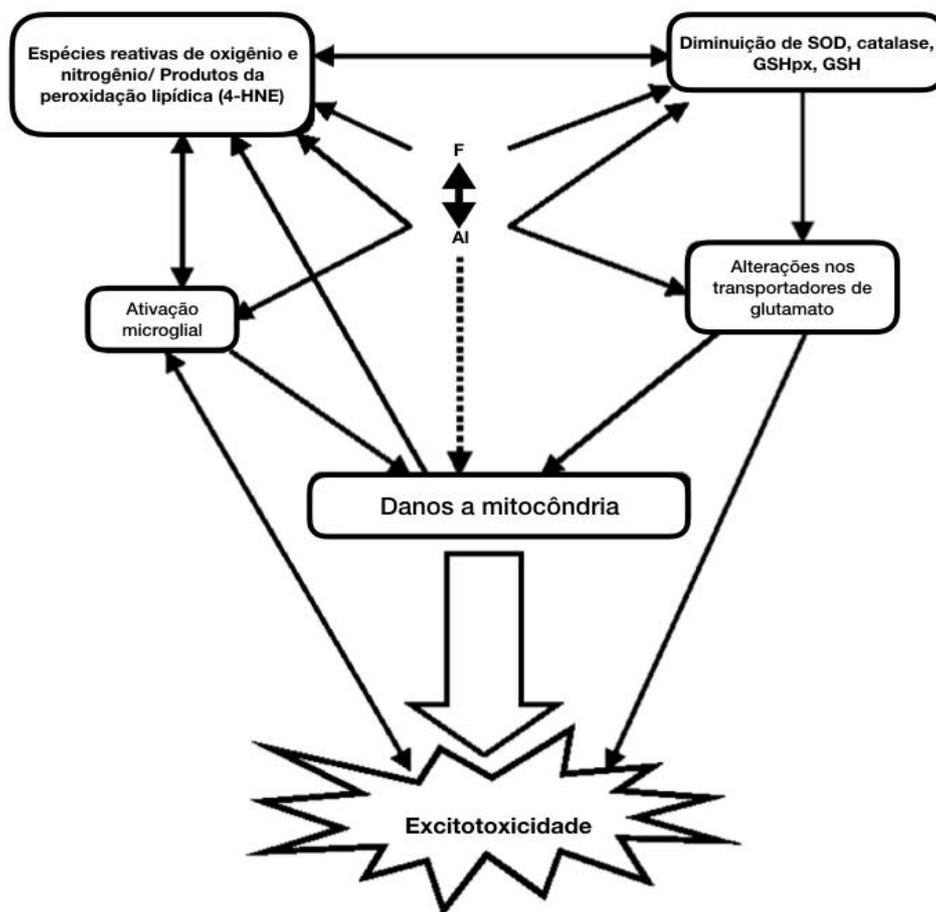


Figura 4: Principais mecanismos de toxicidade do flúor no sistema nervoso central. (Adaptado de Blaylock, 2004)

Sabe-se que o quadro de excitotoxicidade no SNC tem como principais características a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumento da peroxidação lipídica, diminuição nos níveis de glutathione (GSH) e superóxido desmutase (SOD), aumento dos níveis de ascorbato, ativação de proteínas G, injúria sináptica, problemas na recaptação de glutamato na fenda sináptica, ativação microglial e danos ao DNA (Blaylock, 2004; Shuhua e col., 2012). A literatura sugere que os mecanismos de toxicidade do flúor são similares quando comparado as características de excitotoxicidade no SNC (Blaylock, 2004). Por exemplo, já foi demonstrado que a exposição de células microglias da linhagem BV-2 podem ser ativadas após a exposição ao flúor. Os autores também demonstraram uma série de marcadores de estresse oxidativo, como SOD, ERO e óxido nítrico sintase (NOS) (Shuhua e col., 2012). Uma das principais alterações ocasionadas pelo aumento de NOS no SNC está relacionado com as alterações ocasionadas nas mitocôndrias celulares, bem como na produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (Ghasemi e col., 2018). Juntos, esse quadro pode ser responsável pelo aparecimento de doenças neurodegenerativas após a exposição ao fluoreto, visto que mesmo que o flúor não seja o causador primário do aparecimento da doença, a exposição contínua a esta neurotoxina pode levar a quadros que desencadeiam eventos capazes de ocasionar a indução de doenças como Alzheimer, Parkinson, entre outras.

Recentemente os compostos fluoretados foram classificados como uma das seis novas toxinas que afetam o desenvolvimento do SNC (Grandjean e Landrigan, 2014). Dessa forma, apesar de diversos trabalhos sugerirem possíveis mecanismos de ação tóxica do flúor, ainda são necessários estudos que elucidem como este íon pode ocasionar efeitos adversos no SNC, buscando-se identificar possíveis alvos da intoxicação além de elucidar os possíveis mecanismos de sinalização que podem ser utilizados tanto em situações preventivas como terapêuticas.

## 1.7. BIOMARCADORES E ANÁLISES ÔMICAS APLICADAS A TOXICOLOGIA

Os biomarcadores podem ser definidos como indicadores biológicos pré-clínicos, capazes de prever ou substituir qualquer efeito clínico final ou intermediário que seja mais difícil de ser observado (Aronson e Ferner, 2017). Eles podem ser utilizados para a identificação de doenças, prognósticos, para prever e guiar tratamentos, para auxiliar estudos de farmacodinâmica, demonstrar a relação entre a concentração/dose de drogas e efeito bem como para definir os efeitos adversos ocasionados por drogas e exposição a contaminantes.

A literatura sugere que os biomarcadores vêm sendo utilizados há muitos anos na medicina e na toxicologia, no entanto, somente nas últimas décadas eles foram associados a indicadores celulares e moleculares (Swenberg e col., 2008). Em 2017, Aronson e Ferner classificaram os biomarcadores em três tipos, baseados na patofisiologia da doença, onde podem estar associados a fatores de susceptibilidade que levam ao quadro patofisiológico, baseado no mecanismo de ação e na natureza da análise. Importante lembrar que os biomarcadores também podem ser classificados de acordo com o nível em que ocorrem nos sistemas celulares, sendo possível sua identificação a nível molecular, celular e tecidual. Dessa forma, todo indicador biológico e molecular que possa ser mensurado pode ser utilizado como ferramenta para a identificação precoce de doenças ou para o desenvolvimento de novas terapias e prevenção à toxicidade.

Na toxicologia, os biomarcadores têm sido amplamente utilizados para prever a toxicidade de diversos compostos bem como para auxiliar as análises de riscos, podendo então ser associados com mecanismo de resposta a exposição bem como na previsão de ocorrer uma doença como desfecho (WHO, 2000). Sendo assim, a utilização dos biomarcadores pode proporcionar a caracterização de alterações sub-clínicas e que podem ser contornadas antes mesmo que o efeito induzido pela exposição ou a doença em si possam ser observados (Basu, 2014).

Isso se torna de fundamental importância quando levado em consideração que no dia-a-dia, os seres humanos estão expostos a diversos tipos de compostos potencialmente perigosos para a saúde humana, seja pela dieta, exposição ocupacional ou pela exposição ambiental. Vale lembrar que grande parte desses compostos tóxicos

para seres humanos possuem efeito neurotóxico, podendo levar a alterações no sistema nervoso central, nervos periféricos e órgãos sensoriais, impactando assim diretamente na qualidade de vida da população (Arlien-Soborg e col., 2011).

Os biomarcadores podem ser avaliados através de diversas técnicas, como Northern blotting, PCR tempo-real (qPCR), análises seriadas de expressão gênica, Western blotting, eletroforese 2-D (Schrattenholz e col., 2012; Joseph, 2017). No entanto, as “ômicas” tem recebido maior atenção pela comunidade científica. Isso porque elas proporcionam análises de ampla escala em sistemas biológicos, sendo capazes de gerar grande quantidade de dados, de se inter-relacionar uma com as outras gerando resultados mais confiáveis e de melhor predição no contexto de doenças (Pennie e col., 2000; Waters e Foster, 2004; Wetmore e Merrick, 2004; Singh e col., 2010; North e Vulp, 2010). Nesse sentido, as “ômicas” têm surgido como uma ferramenta promissora na identificação de biomarcadores que podem ser utilizados para prever mecanismos de neurotoxicidade.

Os biomarcadores ômicos incluem as análises genômicas (genotipagem e epigenômica), transcriptômica (expressão gênica), proteômica (expressão protéica) e metabolômica (metabólitos). As análises de transcriptômica possibilitam a avaliação completa do perfil gênico podendo demonstrar como cada organismo responde a estímulos externos. No entanto, é importante lembrar que algumas informações não podem ser obtidas através da expressão gênica. Por exemplo, sabe-se que são as proteínas que de fato são responsáveis pelo fenótipo dos organismos, sendo através da análise proteica possível a compreensão das alterações no fenótipo do organismo (Hamadeh e col., 2002; Graves e Haystead, 2002; North e Vulp 2010). Além disso, através da análise de transcriptoma e proteoma, é possível verificar se ocorrem alterações pos-transcriptociniais que podem influenciar as vias de sinalização em resposta à toxicidade, além de ser possível identificar biomarcadores da exposição que podem posteriormente ser utilizados para estratégias de prevenção e tratamento (Hayes e Bradfield, 2005; North e Vulp, 2010).

## 1.8. MODELO DE ESTUDO E PROBLEMÁTICA DE INVESTIGAÇÃO

Nos últimos anos, as análises tradicionais de toxicologia vêm sendo revisadas devido a dificuldade em se extrapolar os resultados de toxicidade animal para o que é freqüentemente observado em humanos (Bracken e col., 2008; Shanks e col., 2009). Dentre as possíveis explicações para essa baixa correlação entre modelos animais e humanos estão a susceptibilidade a viés na literatura experimental e a dificuldade em se propor desenhos experimentais que representem adequadamente a fisiologia humana. Além disso, existe uma crescente necessidade em se reduzir, por questões éticas, os testes em modelos animais de acordo com a lei dos 3R's, que propõe a redução, reposição e refinamento na experimentação animal (North e Vulp, 2010).

Os teste *in vitro* associados a toxicologia tem representado uma boa alternativa para experimentos iniciais, onde é possível realizar análises aprofundadas de mecanismos de ação e sua relação com a toxicidade, bem como avaliar o potencial de um determinado composto em afetar vias moleculares específicas. Sendo assim a toxicogenômica funcional, que propõe o estudo da função de genes e proteínas e sua aplicação na compreensão dos mecanismos de ação de compostos tóxicos para os seres vivos pode se tornar uma alternativa quando aliada à utilização de cultivos de células humanas (Hamadeh e col., 2002; Andersen e Krewski D, 2009). Isso se torna de extrema importância quando se trata de estudos moleculares relacionados com alterações no SNC. A compreensão de como as principais células do SNC responde a estímulos externos pode representar a chave para propor estratégias de prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas comuns na população.

Em relação à exposição ao fluoreto, embora já estejam descritos os danos ocasionados no sistema nervoso central e periférico, tanto em modelos animais quanto em seres humanos, pouco se sabe sobre a resposta individualizada das principais linhagens celulares do SNC após a exposição. Além disso, é importante ressaltar que análises do perfil molecular através do transcriptoma não foram realizadas em cultura de células de neurônios e glia após longa exposição ao fluoreto. Dessa forma, neste trabalho a utilização de linhagem de células humanas de neurônio e glia foram utilizadas para se investigar os mecanismos toxicológicos da exposição crônica ao fluoreto, buscando identificar as principais alterações nas respostas celulares de neurônio e glia bem como alterações no perfil de expressão gênica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar o efeito tóxico do flúor em neurônio e glia e identificar as alterações de expressão gênica das células gliais após a intoxicação.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Avaliar a sensibilidade de células neuronais e gliais a intoxicação ao flúor

**2.2.2.** Analisar o papel da mitocôndria na intoxicação ao flúor em células neuronais e gliais

**2.2.3.** Avaliar a indução de estresse oxidativo nas células gliais induzidas pela intoxicação ao flúor

**2.2.4.** Avaliar danos ao DNA das células gliais após a intoxicação ao flúor

**2.2.5.** Avaliar as alterações no perfil de mRNA das células gliais

**2.2.6.** Buscar genes que possam atuar como biomarcadores da intoxicação por flúor

**2.2.7.** Buscar redes de interação gênica e proteica que possam servir como mecanismos moduladores na toxicidade do flúor

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. CULTURA DE CÉLULAS

Células humanas de glioblastoma da linhagem U87 e de neuroblastoma da linhagem IMR-32, armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e diluídas em 5mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), penicilina (10 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL) e fungizona (1%). As células foram armazenadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C até atingir confluência de 95%.

#### 3.2. ALÍQUOTAS DE FLUORETO

Alíquotas de NaF (Merk, CAS: 7681-49-4) foram diluídas em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e mantidas a 4°C. Durante os experimentos, diluições seriadas foram realizadas em meio de cultivo para atingir as concentrações de interesse.

#### 3.3. GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante os experimentos, foram utilizados os seguintes grupos experimentais, por linhagem celular:

- Grupo controle: as células foram incubadas com DMEM+10% FBS
- Grupos de exposição: as células foram incubadas com solução contendo diferentes concentrações de flúor em DMEM+10%FBS. Foram utilizadas as seguintes concentrações de flúor: 0, 0,095µg/mL, 0,19 µg/mL e 0,22µg/mL. As concentrações foram escolhidas de acordo com os valores de flúor encontrados no plasma sanguíneo de populações que consomem água de abastecimento público fluoretada.

### 3.4. CULTURA DE CÉLULAS E EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

As células foram semeadas em placas de 24 ( $10^4$  cels/poço) e 96 poços (1060 cels/poço). As células foram expostas ao flúor por 10 dias, sendo o meio contendo flúor sido trocado a cada dois dias, de acordo com a figura 5. O período de exposição foi determinado a partir de experimento piloto, onde foi observado o aparecimento dos primeiros efeitos tóxicos somente a partir do décimo dia de exposição.

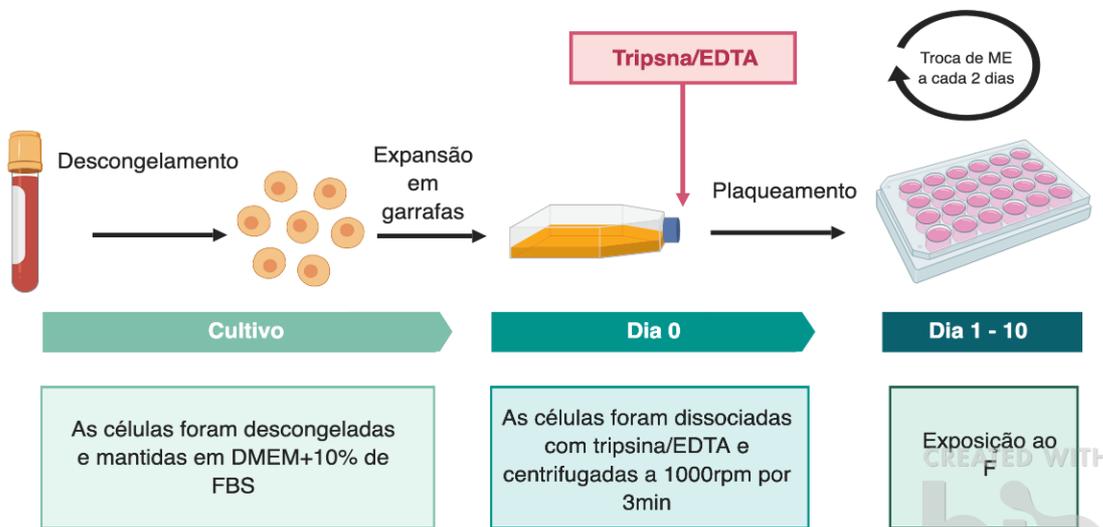


Figura 5: Desenho esquemático mostrando a metodologia utilizada para o cultivo e exposição das células U87.

### 3.5. MORTE CELULAR

A morte celular foi analisada através do ensaio de exclusão por azul de tripan. Após 10 dias o meio contendo flúor foi retirado, as células lavadas com HBSS e em seguida dissociadas com tripsina/EDTA. As células foram centrifugadas por 3min a 1000rpm e ressuspensas em DMEM. Dez microlitros de solução de células foram diluídas em 10 $\mu$ L de azul de tripan, e as células foram contadas e classificadas como mortas (coradas em azul) e vivas (não coradas) em microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer (Fig. 6). A porcentagem de células vivas (PV) foi obtida através do seguinte cálculo:

$$PV(\%) = 100 \times \frac{cel.viáveis}{cel.totais}$$

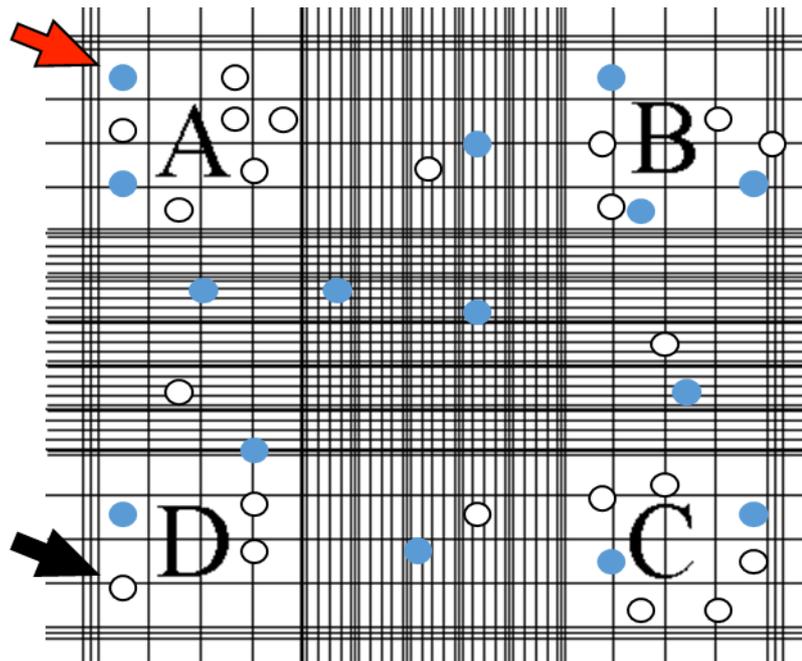


Figura.6: Desenho representativo da câmara de *Newbauer*, onde foi realizada a contagem de células viáveis (seta preta) e mortas (seta vermelha).

### 3.6. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia das células foi analisada após a exposição por 10 dias. Para essa análise as células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas previamente tratadas com poly-l-lisina overnight em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a exposição o meio contendo flúor foi desprezado e as células foram lavadas 1x com HBSS e posteriormente fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) gelado por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução fosfato salina (PBS) mais glicina por 5 minutos para inativar o PFA. As células foram lavadas uma vez com PBS e coradas com Giemsa (10%) por 10min. As fotomicrografias foram obtidas através do sistema de fotomicroscopia Nikon Eclipse E500 com uma câmera Moticam 2500 acoplada; foram selecionados 30 campos aleatórios no aumento de 40x para captura de imagens e posterior análises morfométricas. As fotomicrografias foram importadas para o software ImageJ e através das ferramentas de medidas e calibração de escala, avaliou-se os parâmetros: área do núcleo, perímetro nuclear e índice de redondeza, sendo este último utilizado para determinar o quão circunferencial os núcleos apresentavam-se (quanto mais próximo de 1, mais circulares os núcleos apresentavam-se). As células que apresentavam sinais de ciclo celular que pudessem comprometer a análise como citocinese, fuso mitótico e binucleação, foram eliminadas das análises, utilizando somente aquelas que apresentassem núcleos e delimitações da membrana bem evidentes.

### 3.7. METABOLISMO CELULAR

Para análise do metabolismo celular foi utilizado o método do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. A redução do MTT ocorre pela enzima NADPH presente no citoplasma e mitocôndrias de células metabolicamente ativas, dando origem a um composto com coloração roxa denominada formazan que pode ser lido por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, após o período de exposição, o ME foi desprezado e foi adicionado 100µL de solução de MTT (5 mg/mL) por 2h a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e foi adicionado 100µL de DMSO para eluir os cristais de formazan. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada com o auxílio do equipamento Glomax (Promega) a 570nm. Para a análise dos dados, os resultados de absorbância obtidos foram normalizados pelo número de células viáveis e expressos em porcentagem do controle.

### 3.8. MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP

Os níveis de ATP foram analisados através do kit Mitochondrial Tox-Glo (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A análise permite a identificação de dois biomarcadores, um associado aos níveis celulares de ATP e outro associado a integridade de membrana celular. A integridade de membrana é avaliada através da identificação da presença ou ausência de atividade de uma protease associada a necrose., capaz de clivar o substrato fluorogênico bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina110 (bis-AAF-R110). Esse substrato não é capaz de atravessar a membrana de células viáveis, sendo assim não ocorre a formação de sinal quando na presença de células vivas. Para a análise de ATP, é fornecido para as amostras solução de detecção de ATP contendo luciferina, que emite sinal luminescente proporcional a quantidade de ATP presente na amostra. Sendo assim, a análise pelo kit mitochondria tox-Glo fornece um indicativo de integridade de membrana/necrose celular e disfunção mitocondrial. Após a exposição ao flúor, 20µl de “5X Cytotoxicity Reagent” foi adicionado em cada poço e deixado sob agitação por 1 minute a 700rpm, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi mensurada a 485nmEx/520–530nmEm. A placa de análise foi então equilibrada a temperatura ambiente (10 minutes) para em seguida adicionar-se 100µl de reagente de detecção de ATP em cada poço. A placa foi então agitada a 700rpm por 5 minutos. O sinal de luminescencia foi lido no sistema de multidetecção Glomax (Promega).

### 3.9. CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE

Para a análise de morte celular por apoptose e necrose foi utilizado o kit Apotox-Glo triplex assay (Promega). Este ensaio permite a análise combinada, na mesma amostra de três parâmetros: viabilidade, citotoxicidade (necrose) e apoptose através da atividade das caspases 3 e 7. A primeira parte do ensaio consiste na avaliação da atividade de duas proteases que são utilizadas como marcadores de viabilidade celular e morte celular por necrose (citotoxicidade). Para isso, utilizam-se dois peptídeos fluorogênicos, o glicil-phenilalanil-aminofluorocoumarina (GF-AFC), que penetra a membrana de células viáveis e é clivado gerando um sinal fluorescente proporcional ao número de células vivas. Importante ressaltar que essa protease se torna inativa uma vez que as células perdem sua integridade de membrana. Também foi utilizado um peptídeo fluorogênico impermeável (bis-AAF-R110), para medir a atividade de proteases de células mortas por necrose. Visto que bis-AAF-R110 é impermeável, não ocorre a

formação de sinal proveniente do substrato em contato com as células vivas. Dessa forma, dois produtos diferentes são formados, AFC e R110 pelas células vivas e mortas respectivamente. AFC e R110 possuem diferentes espectros de emissão e excitação, permitindo que sejam medidos simultaneamente. Numa segunda parte do ensaio, foi utilizado na mesma amostra solução de Caspase-Glo (Promega) que fornece um substrato fluorescente para as caspases 3 e 7. A adição do reagente nas células ocasiona lise celular seguida da clivagem do substrato pela ação das caspases gerando assim um sinal fluorescente (protocolo fornecido pelo fabricante). A quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de caspases ativadas presentes nas amostras (Figura 6). Dessa forma, após os períodos de exposição foi adicionado 20  $\mu\text{L}$ /poço de reagente contendo GF-AFC e bis-AAF-R110. Em seguida as células foram incubadas por 30 min a 37°C. As amostras foram lidas com o auxílio do equipamento Glomax (Promega) com um comprimento de onda de 400  $\text{nm}_{\text{ex}}$ /505 $\text{nm}_{\text{em}}$  (viabilidade) e 485  $\text{nm}_{\text{ex}}$ /520 $\text{nm}_{\text{em}}$  (necrose). Após a primeira leitura foi adicionado 100 $\mu\text{L}$  de reativo de Caspase-Glo 3/7 em cada poço e incubados por 30min a temperatura ambiente para posterior leitura. A leitura foi realizada com protocolo de luminescência do equipamento Glomax (Promega).

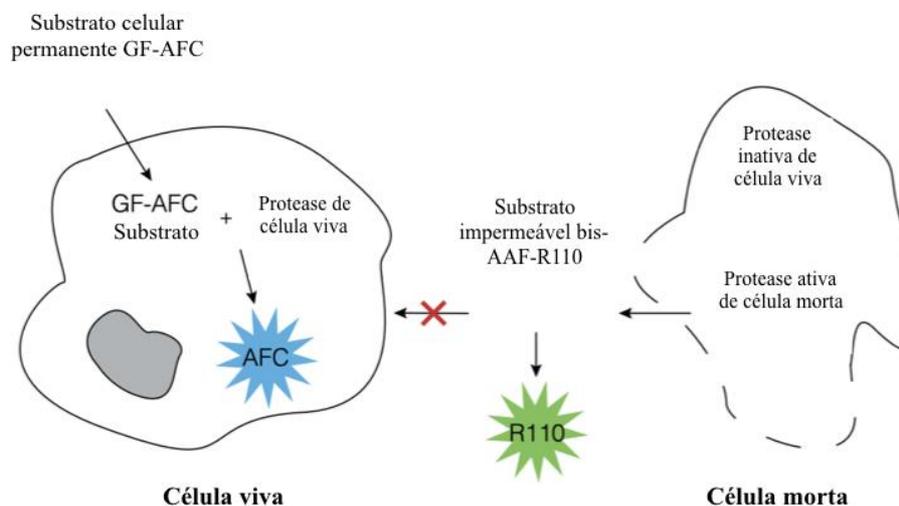


Figura 7: Desenho esquemático da metodologia utilizada no ensaio de mecanismos de morte celular através do kit Apotox triplex assay.

### 3.10. ANÁLISE DA BIOQUÍMICA OXIDATIVA

#### 3.10.1. MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROS: $H_2O_2$

Os níveis de  $H_2O_2$  foram mensurados através do kit ROS-Glo  $H_2O_2$  (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Nós avaliamos os níveis de  $H_2O_2$  devido ser a espécie reativa de oxigênio (EROS) com maior meia vida em cultura de células e também pelo fato que diversas outras EROS podem ser convertidas para  $H_2O_2$ . Resumidamente, seis horas antes do fim da exposição ao flúor, as células foram expostas ao substrato de  $H_2O_2$  ( $25\mu M$ ). Este substrato reage diretamente com o  $H_2O_2$  presente na amostra dando origem ao precursor de luciferina. Em seguida, solução de detecção de ROS-Glo contendo D-cisteína foi adicionada em cada poço e as amostras foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. A D-cisteína converte o precursor em luciferina gerando então um sinal de luminescência proporcional a quantidade de  $H_2O_2$  na amostra (Figura 7). A luminescência foi lida no sistema de multidetecção Glomax (Promega).

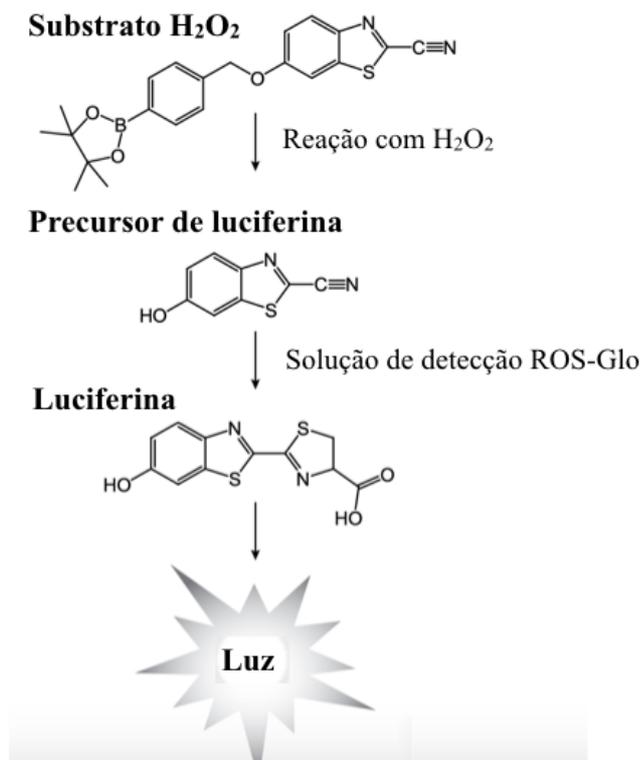


Figura 8: Desenho esquemático de metodologia utilizada no ensaio de níveis de EROS pelo kit ROS-Glo (Promega).

### 3.10.2. MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH/GSSG

Os níveis de GSH/GSSG foram mensurados como indicativo de estresse oxidativo através do kit GSH/GSSG-Glo (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Nesse teste é possível a quantificação de glutathiona total e GSSG baseado na reação de conversão da luciferase. Dessa forma, o sinal de luminescência é proporcional à quantidade de GSH presente na amostra. Para a detecção de glutathiona total usa-se um agente redutor que converte toda a glutathiona, GSH e GSSG em um lisado celular para a forma reduzida, GSH. Para a leitura de GSSG toda GSH presente na amostra é bloqueada enquanto a GSSG permanece intacta. O bloqueio de GSH é seguido pela redução de GSSG em GSH para quantificação na reação luminescente (Figura 8). Dessa forma, após a exposição, o meio foi desprezado e foi adicionado solução de lise de GSH ou GSSG. As amostras foram agitadas a 700rpm por 5 minutos. Em seguida, 50µL de luciferina foi adicionada em cada poço e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois disso, 100µL de reagente de detecção de luciferina foi adicionado, as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente por 15 minutos e o sinal de

luminescência lido no sistema de multideteção Glomax (Promega). Para a conversão do sinal luminescente (RLU) para concentração em micromolar de GSH ou GSSG foi realizada uma curva padrão de glutathiona. A curva de padrão foi realizada a partir de solução a 16 $\mu$ M de glutathiona seguida de diluições seriadas (1:2) em água. Foi adicionado 5 $\mu$ L de cada concentração em 50 $\mu$ L de solução de lise de glutathiona total. Em seguida, 50 $\mu$ L de reagente de luciferina foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30min a temperatura ambiente. Com microlitros de reagente de detecção de luciferina foram adicionados em cada poço, e após 5min em temperatura ambiente a luminescência foi lida no sistema de multideteção Glomax (Promega). A porção linear da curva padrão foi então utilizada para calcular a concentração de glutathiona ( $\mu$ M) em cada amostra

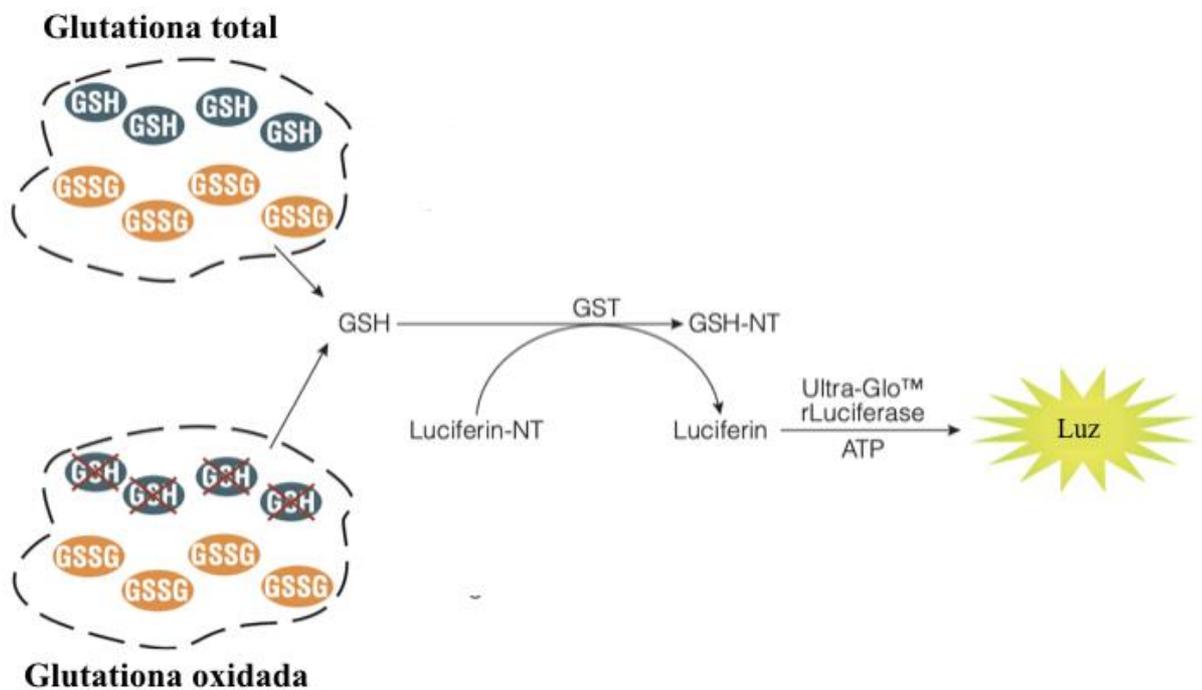


Figura 9: Desenho esquemático da metodologia utilizada para análise dos níveis de GSH/GSSG pelo kit GSH/GSSG-Glo (Promega).

### 3.10.3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para a análise de degradação oxidativa de lipídeos de membrana foi realizado o ensaio de peroxidação lipídica através do método de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os lipídeos peroxidados são compostos intáteis e se decompõem em uma série de compostos complexos como o malondialdeído (MDA). A reação de MDA e TBAR produz uma solução com coloração que pode ser lida a 535nm. Dessa forma, após a exposição o meio foi desprezado, as células foram lavadas 1x com HSBB e centrifugadas por 3min a 1000rpm. O pellet de células foi ressuscitado em 20µl de HBSS e 2µL de amostra foram adicionados a em 100µL de solução de TBARS. A absorvância das amostras foram comparadas com uma curva padrão de MDA e corrigidas por proteína. A concentração total de proteínas foi obtida através do método de Bradford.

### 3.11. FRAGMENTAÇÃO DO DNA

Para mostrar a fragmentação do DNA nós realizamos o ensaio cometa. Após a exposição ao flúor as células foram lavadas três vezes com HSBB, dissociadas com tripsina/EDTA e centrifugadas por 10min a 1000rpm. O pellet de células foi ressuscitado em 500µL de DMEM. Vinte microlitros de solução de célula foram adicionados a 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0.5%) e transferidas para lâminas pré-tratadas com agarose. As lâminas foram incubadas a 4°C por 20min seguida de incubação em solução de lise (1% Triton X-100, 10% DMSO, 2.5MNaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 10) por 12h. A eletroforese foi realizada em tampão de eletroforese (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13) por 20min seguindo a configuração de 300mA e 30V. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com solução neutralizadora (19.5mM Tris-HCl, pH 7.5) por 5 minutos cada. Por fim, as células foram marcadas com DAPI (15µL; 10µg/ml). Cem nucleóides foram avaliados de maneira aleatória em cada grupo experimental. A análise de porcentagem de DNA na cabeça (DNA não fragmentado) e na cauda (DNA fragmentado) foram realizadas com o plugin OpenComet no programa ImageJ (Figura 9).

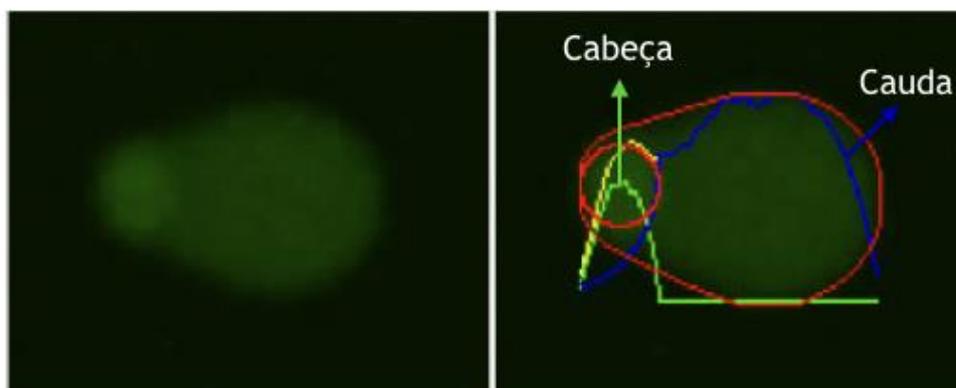


Figura 10: Imagem representativa da análise do percentual de DNA presente na cauda e na cabeça de nucleóides, pelo programa ImageJ utilizando-se o plugin open comet.

### 3.12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

#### 3.12.1. EXTRAÇÃO TOTAL DE RNA

A extração de mRNA foi realizada através da utilização do Kit “*SV total RNA isolation system*” da Promega de acordo com as especificações do fabricante. Após o período de exposição, células do grupo controle e expostas ao flúor foram preparadas para a extração de mRNA. As amostras foram lisadas com tampão de lise contendo beta-mercaptoetanol e em seguida diluídas em tampão de diluição de RNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14mil rpm. Foi adicionado etanol 95% para garantir condições adequadas de ligação à membrana, para que então as amostras fossem repassadas para colunas de centrifugação onde o RNA pode se ligar a membrana da coluna facilitando a lavagem para eliminação de possíveis contaminantes além de favorecer a extração de alta qualidade de RNA total. Ao final do procedimento, o RNA foi diluído em 15µL de água livre de nuclease. A quantificação do RNA total foi realizada com o auxílio de fluorômetro Qubit 2.0. A qualidade do RNA foi demonstrada através da análise do número equivalente a integridade de RNA (RIN - do inglês RNA Integrity Number equivalent) utilizando o equipamento “2200 TapeStation RNA ScreenTape” (Agilente). Um microlitro de amostra foi diluído em 5µL de tampão de RNA seguido de agitação em vórtex IKA a 2000rpm por 1min. Após isso, as amostras foram aquecidas a 72°C por 3min seguido de incubação em gelo por 2min. Por fim as amostras foram levadas ao TapeStation para análise de integridade do RNA. O RNA

purificado e quantificado foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior ensaio de microarray de expressão.

### 3.12.2. MICROARRAY DE EXPRESSÃO

Para a leitura de *microarray*, foi utilizando o kit “*One-color microarrays-based gene expression. Analysis*” (Agilent technologies, EUA) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. O perfil da expressão gênica foi avaliado nas células expostas ou não ao flúor. O RNA total obtido durante a fase de extração foi utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, que ocorre através de transcrição reversa com o auxílio da enzima T7 RNA polimerase. A síntese da segunda fita de cDNA serve de molde para a reação da transcrição *in vitro* para a produção de cRNA. O cRNA foi então incorporado ao fluorocromo 3-cianina (Cy-3) utilizando o kit “*Low Input Quick Amp Labeling*” (Agilent Technologies) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, foi realizada a purificação do cRNA. Para isso 84 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura foi adicionada a 350 $\mu\text{L}$  de *buffer RLT* e 250 $\mu\text{L}$  de etanol 100%. A solução foi transferida para a coluna de purificação do kit *RNeasy mini spin*. À cada amostra foi adicionado 500 $\mu\text{L}$  de tampão *RPE* e as amostras foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 60s. Em seguida, as amostras foram diluídas em 30 $\mu\text{L}$  de água livre de nucleasse para eluição do RNA purificado. O cRNA foi então quantificado por espectrofotometria (em pmol/uL), onde foi analisado a relação de absorbância (260 nm/280 nm) e a concentração de cRNA (ng/ $\mu\text{L}$ ) em cada amostra. Para a reação de hibridização, o RNA marcado foi adicionado ao mix de fragmentação (300ng de *Cyanine 3-labeled*, cRNA amplificado, 5 $\mu\text{L}$  de 10 $\times$ *Gene Expression Blocking Agent*, 1 $\mu\text{L}$  de 25 $\times$ *Fragmentation Buffer* e água ultra-pura) e incubado a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 min para fragmentar as amostras antes da hidridização. Em seguida, em cada amostra foi adicionado 25 $\mu\text{L}$  de 2 $\times$  *Hi-RPM Hybridization Buffer* a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para a hibridização, 40 $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionadas a lâmina de hibridização e em seguida deixados em câmara de hibridização por 17h a  $65^{\circ}\text{C}$  com rotação de 10 rpm. Após esse período, a lâmina foi lavada e imediatamente lida no Scanner de microarray da Agilent (G4900DA) (Figura 10). A seguinte configuração foi utilizada para escanear as lâminas de microarray de uma cor: área de escâner: 61  $\times$  21.6 mm; resolução de 5 $\mu\text{m}$ ; canal de marcação: verde. Em seguida, as imagens foram obtidas com auxílio do programa *Feature Extraction v10.10* e os dados analisado com o auxílio dos programas GeneSpring GX 9.0 e *IPathwayguide* (ADVAITA Bioinformatics Company). A identificação dos genes seguiu um critério de restrição com um *fold change*  $> 2$ , ou seja, foram considerados somente os genes que

foram encontrados por estar duas vezes mais ou menos expressos quando comparados com o grupo controle.

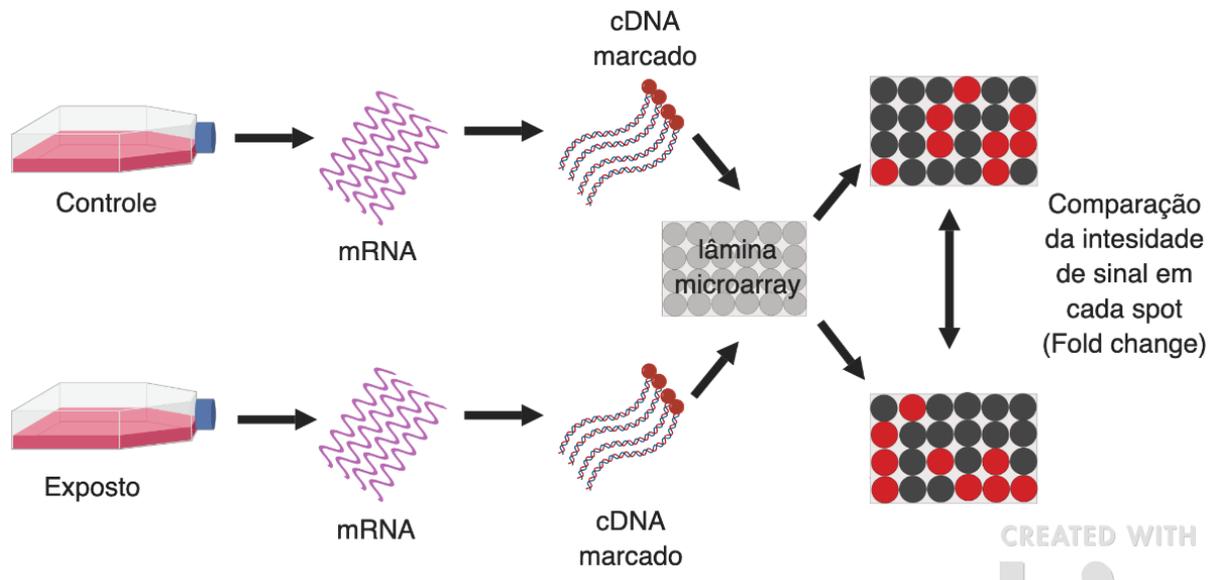


Figura 11: Desenho esquemático da metodologia utilizada para ensaio de microarray de uma cor.

### 3.12.3. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para realizar as análises funcionais e para as buscas de vias de sinalização diferencialmente expressas após a exposição ao flúor, foi utilizado o programa DAVID e a base de busca do Gene Ontology (GO). Foram consideradas apenas as vias que apresentaram um valor de  $p < 0,05$ . Para as análises foi realizado cluster hierárquico para agrupar vias individuais. Também foi realizado uma rede de interação proteína-proteína no Cytoscape, utilizando o aplicativo String para identificar genes que possuem grande significância biológica (HubGenes) no contexto da intoxicação ao flúor. Para o cálculo dos índices “Degree”, “Stress” e “Betweenness” foi utilizado o aplicativo Centiscape de acordo com Brhama e colaboradores (2018).

### 3.13. VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

A validação dos genes diferencialmente expressos após a exposição ao flúor foi validada através da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real. Para isso, o mRNA de cada amostra foi utilizado para o processo de transcrição reversa através do kit *GoScript Reverse Transcription System* (Promega). Resumidamente, 100ng de mRNA

foi adicionado a 0.5µg/reacção de Random Primer e incubados a 70°C por 5 minutos. Em seguida, 15µL de *reverse transcription master mix* (GoScript buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, inibidor de ribonuclease e transcriptase reversa) foram adicionados a solução contendo mRNA e primer e incubados a 25°C por 5 minutos para anelamento, 42°C por 1h para extensão e 70°C por 15min para inativação da transcriptase reversa. Para a etapa de qPCR foi utilizado o kit *GoTaq probe qPCR Master Mix* (Promega). Para isso, 1µL de cDNA foi adicionado a 19µL de *qPCR Master Mix* e 1µL de sonda Taqman (Thermofisher) acoplada com o fluoróforo FAM (Quadro 2). As amostras foram adicionadas em placas de leitura, seladas e lidas no equipamento *Bio-Rad CFX96 Real Time PCR detection system*. As configurações de ciclagem utilizadas foram: 1 ciclo a 95°C por 2min, 40 ciclos a 95°C por 3s e 40 ciclos a 60°C por 30s. As sequências das sondas utilizadas encontram-se na tabela 2. Os dados foram avaliados no programa CFX Maestro.

Quadro 2. Sequência das sondas utilizadas para a validação gênica por RT-qPCR

Simbolo do gene	Número de catalogo thermofisher
CYP1B1	Hs00164383_m1
PTGE	Hs04187819_g1
TBP	Hs00427620_m1

### 3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises não paramétricas foi utilizado o software Graphpad 5.0. A diferença estatística entre os grupos para cada linhagem foi testada usando análise de variância de um critério (ANOVA) seguido de pós teste *Tukey*. Para a análise dos dados de transcriptoma foi utilizado o programa GeneSpring Gx (Agilent). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo considerado como significativos os dados que possuíram um  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ MORTE CELULAR NAS CÉLULAS U87 SEM OCASIONAR ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS APARENTES

Células neuronais e gliais humana das linhagens IMR-32 e U87 foram expostas a concentrações crescentes de fluoreto por 10 dias. Para demonstrar o efeito citotóxico do fluoreto nós primeiramente avaliamos a viabilidade celular e alterações na morfologia das células após a exposição. Nossos resultados mostram que o flúor não é capaz de induzir morte celular nas células IMR-32 em nenhuma das concentrações testadas (Fig.12A). No entanto, quando avaliado o efeito do flúor nas células U87, nossos resultados mostram que a exposição a 0.22 $\mu$ g/mL é capaz de induzir diminuição no percentual de células vivas (Fig.12B).

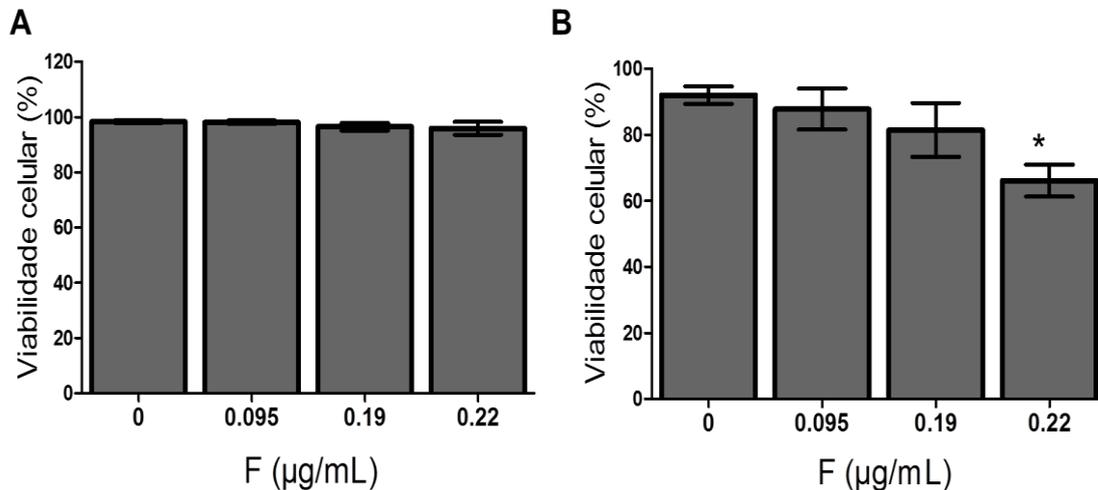


Figura 12: Viabilidade celular. Células da linhagem IMR-31 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor e depois avaliadas pelo método de exclusão por azul de tripan. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste *Tukey* (n=3). Os dados foram mostrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs controle.

A análise morfométrica das células após a exposição não revelou nenhuma alteração quando avaliados área do núcleo, perímetro nuclear e índice de redondeza tanto nas células IMR-32 (Fig. 13G-I) quanto nas células U87 (Fig. 14G- I). A análise qualitativa não revelou nenhuma característica citopatológica evidente nas células IMR-32 bem como nenhuma redução aparente na densidade celular (número de células/campo) (Fig. 13A-F). Por outro lado um significativo efeito citopático, de maneira concentração dependente, foi observado nas células U87, como a redução da densidade celular, maior espaçamento entre as células e estreitamento de projeções citoplasmáticas ao longo da célula (Fig. 14A-F).

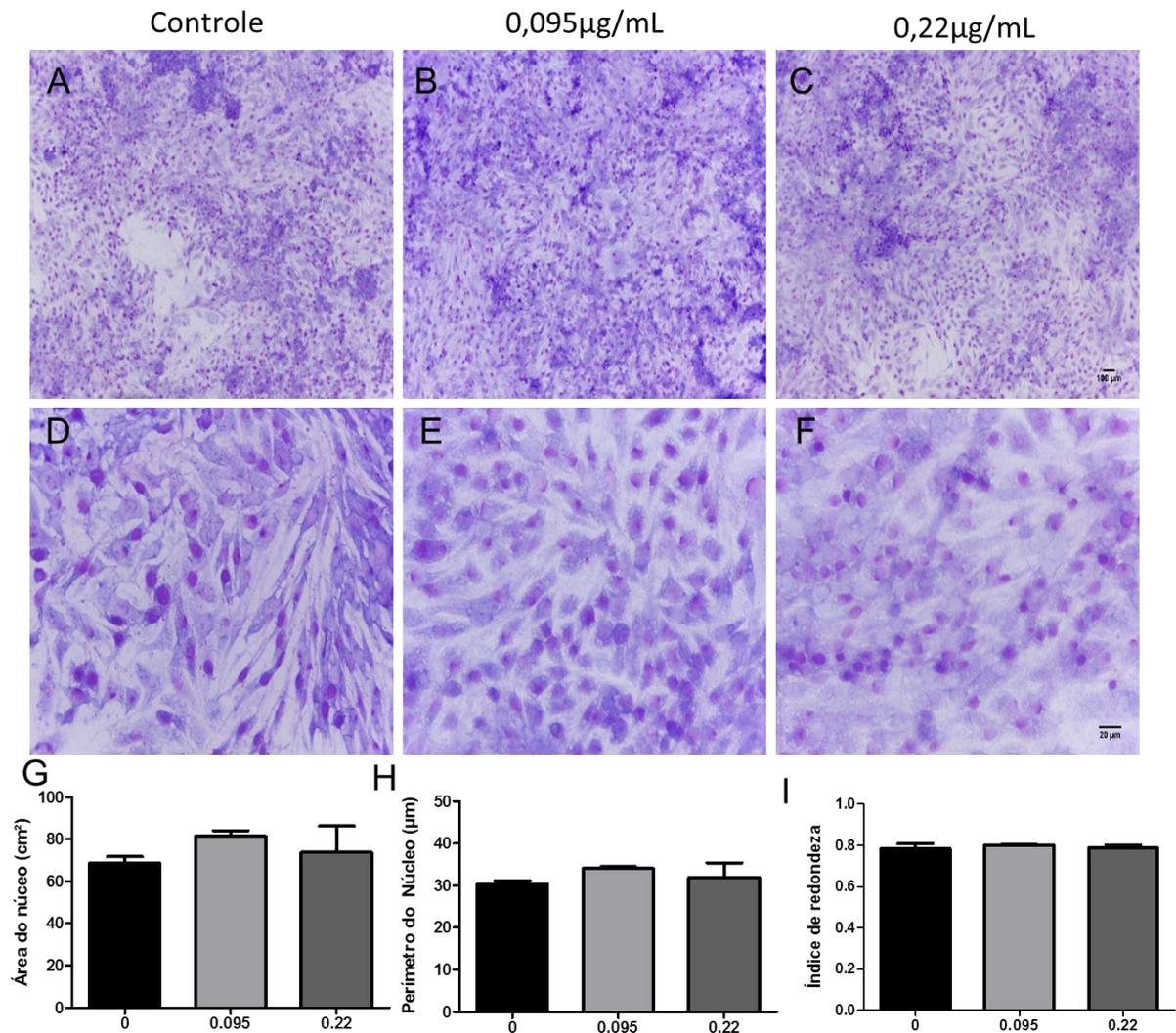


Fig 13: Análise morfológica das células IMR-32 após 10d de exposição ao fluoreto. As imagens foram obtidas em micropia de luz com aumento de 22x (A-C) e 40x (D-F). As imagens foram ajustadas e as células contadas com o programa ImageJ. G-I: análise morfométrica das células IMR-32 após a exposição ao flúor. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

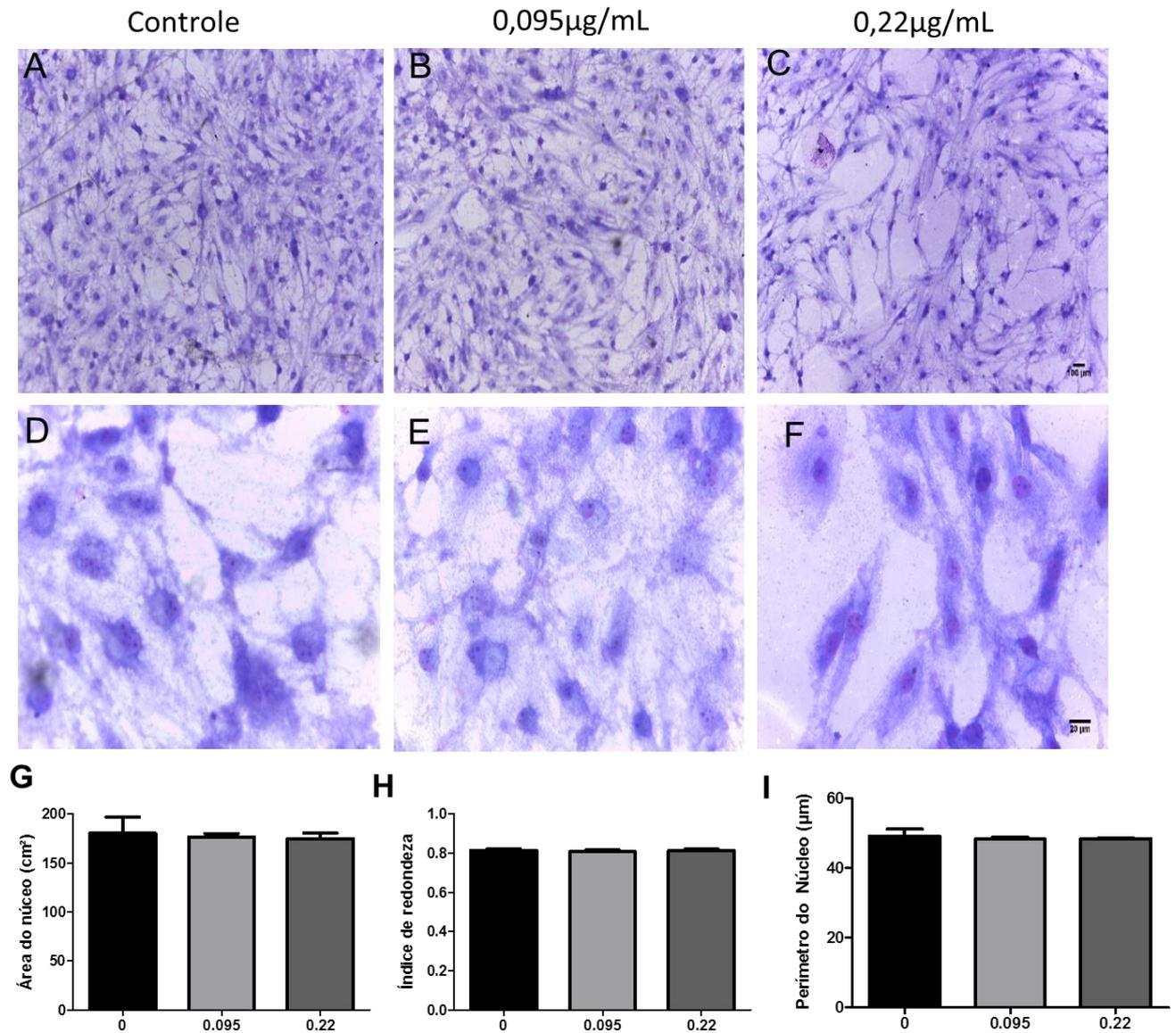


Fig 14: Análise morfológica das células U87 após 10d de exposição ao fluoreto. As imagens foram obtidas em micropia de luz com aumento de 22x (A-C) e 40x (D-F). As imagens foram ajustadas e as células contadas com o programa ImageJ. G-I: análise morfométrica das células IMR-32 após a exposição ao flúor. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

#### 4.2. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO INDUZIDAS PELO FLÚOR EM IMR-32 E U87

Nós também avaliamos o efeito do flúor no metabolismo das células neuronais e gliais. Nossos resultados demonstram que uma pequena diminuição no metabolismo foi ocasionada nas células IMR-32 após exposição a 0.095 e 0.19 $\mu\text{g/mL}$ , enquanto nenhuma alteração foi observada após a exposição a 0.22 $\mu\text{g/mL}$  (Fig.15A). Por outro lado, a exposição ao flúor ocasionou um aumento metabólico nas células gliais quando comparado com o grupo controle. Esse efeito foi observado somente após a exposição a 0.22 $\mu\text{g/mL}$  sem nenhuma alteração evidente nas demais concentrações (Fig.15B).

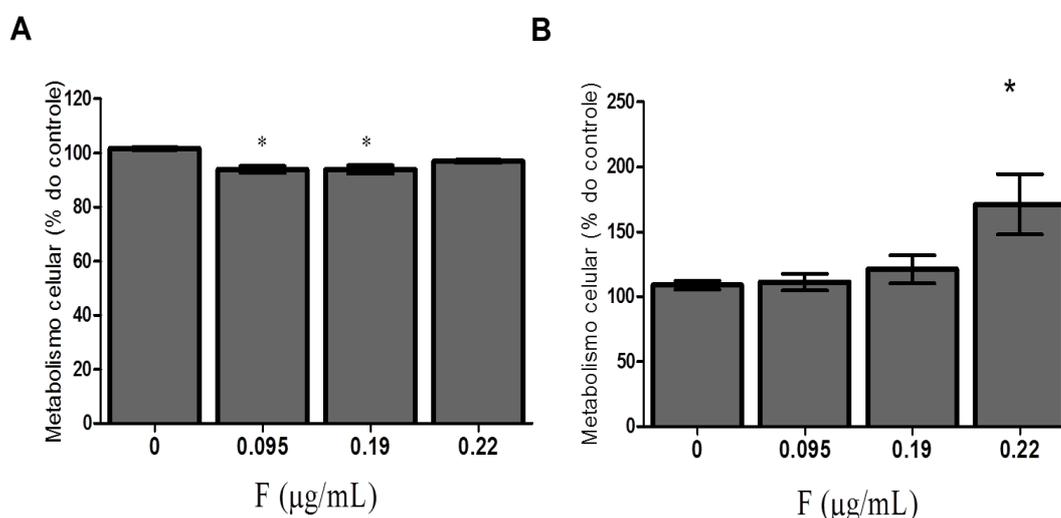


Figura 15: Metabolismo celular. Células da linhagem IMR-32 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor e depois avaliadas pelo método de redução do MTT. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste *Tukey* (n=3). Os dados foram mostrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs controle.

Buscando melhor compreender essas alterações metabólicas encontradas nas células IMR-32 e U87, nós avaliamos os níveis de ATP produzido pelas células após a exposição (Fig.16). Nossos dados sugerem que o flúor não é capaz de influenciar na síntese de ATP nas células IMR-32 (Fig.16A). Por outro lado, nas células da glia foi possível observar que o flúor pode levar a diminuição da síntese de ATP tanto na menor concentração (0.095 $\mu$ g/mL) quanto na maior concentração (0.22 $\mu$ g/mL) utilizada (Fig.16B).

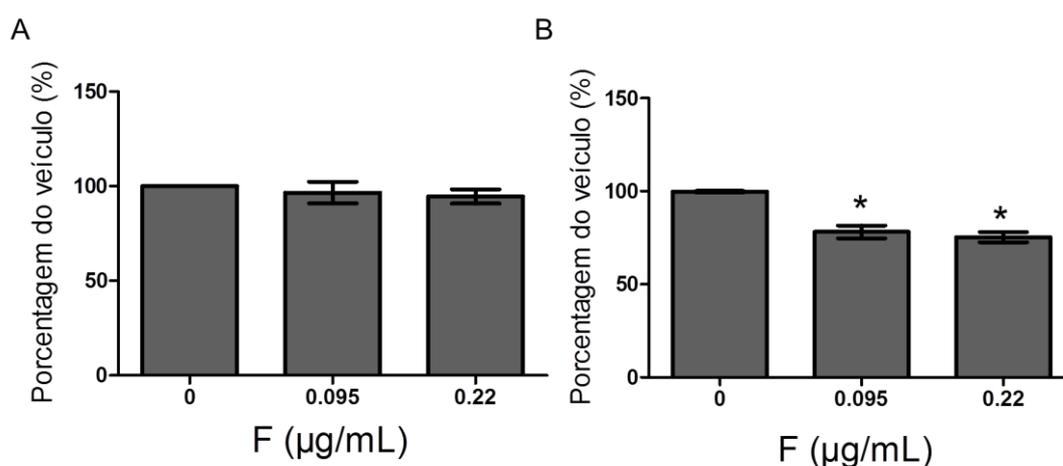


Figura 16: Síntese de ATP. Células da linhagem IMR-31 (A) e U87 (B) foram expostas por 10 dias ao flúor. A síntese de ATP foi avaliada pelo kit Mitocondrial Tox-Glo (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via com pós teste *Tukey* (n=3). Os dados foram mostrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs 0

Visto que nenhuma alteração significativa foi encontrada em neurônios após exposição ao flúor, nossos dados sugerem que as células U87 da glia humana são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do fluoreto, quando comparadas com neurônios da linhagem IMR-32. Dessa forma, para entender melhor como o flúor exerce toxicidade nas células U87 as demais análises foram realizadas somente nas células da glia após 10 dias de exposição.

#### 4.3. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ MORTE CELULAR POR NECROSE EM CÉLULAS U87

Para compreender os mecanismos de morte celular nas células U87 após exposição ao flúor, nós avaliamos biomarcadores associados a morte por apoptose (caspase 3 e 7) e citotoxicidade como indicativo de necrose (bis-AAF-R110). Como mencionado anteriormente, nesse teste é possível a identificação na mesma amostra dos parâmetros de viabilidade, citotoxicidade (necrose) e ativação de caspase. A figura 17 corrobora nossos resultados de viabilidade obtidos pelo método de exclusão por azul de tripan, demonstrando que somente na concentração de 0.22 $\mu$ g/mL ocorre uma significativa diminuição na viabilidade celular, quando comparada com o grupo controle. Quando avaliado a presença da atividade de protease de células mortas, que perderam a integridade de membrana, nossos resultados corroboram com o observado nas análises de síntese de ATP e integridade, sugerindo um aumento na citotoxicidade induzida por 0.22 $\mu$ g/mL de flúor. No entanto, quando avaliado a ativação das caspase 3 e 7 nossos resultados demonstram que em nenhuma das concentrações testadas foi possível observar a ativação de caspases.

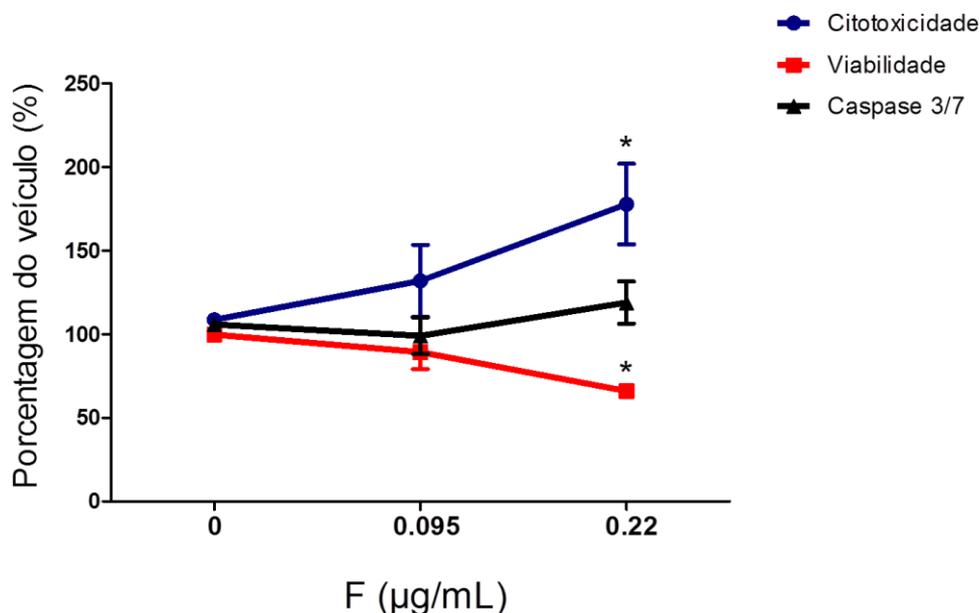


Figura 17: Mecanismos de morte celular. Após a exposição ao flúor nas células U87 foram avaliados parâmetros de morte celular como citotoxicidade (integridade de membrana), viabilidade e ativação de caspase 3/7 através do kit Apotox-triplex assay (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey (n=3). Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs 0.

#### 4.4. METABOLISMO OXIDATIVO OCACIONADO PELA EXPOSIÇÃO AO FLÚOR: PAPEL DA GSH

Para compreender o efeito citotóxico do flúor nas células U87, nós avaliamos biomarcadores de estresse oxidativo após os 10 dias de exposição. Para a análise de formação de espécies reativas de oxigênio, nós avaliamos a formação de  $H_2O_2$ . Nós optamos pela análise de  $H_2O_2$  visto que em cultivo celular o peróxido é a espécie reativa de oxigênio que possui a maior meia vida, além de ser o produto final de outras ERO'S. Nossos resultados demonstraram que a exposição ao flúor não foi capaz de induzir aumento na formação de  $H_2O_2$  (Fig. 18A). Além disso, nenhuma alteração na peroxidação de lipídeos de membrana foi observada após a exposição ao flúor (Fig. 18B).

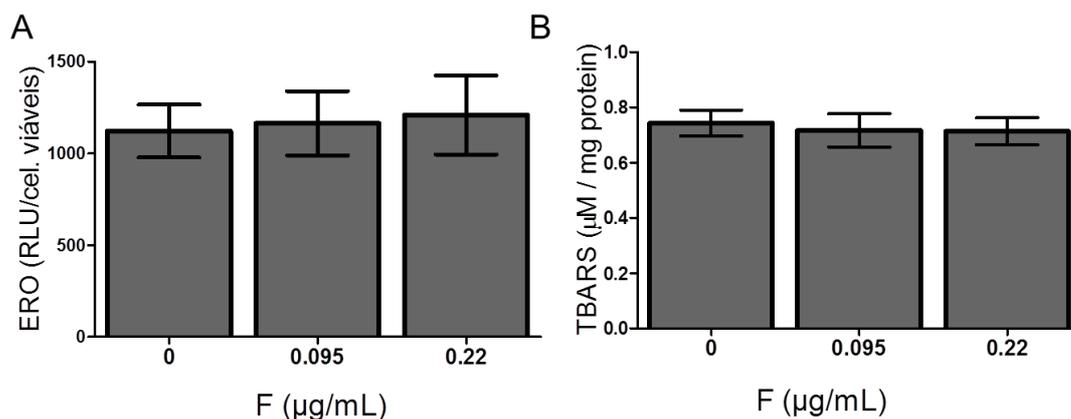


Figura 18: Estresse oxidativo. Após a exposição ao flúor nas células U87 foram avaliados a produção de ROS (A) e peroxidação de lipídeos (B) através do kit ROS-Glo (Promega) e ensaio TBARS, respectivamente. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste *Tukey* (n=3). Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ .

Quando avaliamos os níveis de GSH/GSSG nossos resultados demonstram que a exposição a 0.22 $\mu$ g/mL de flúor pode ocasionar uma significativa diminuição de GSH/GSSG quando comparado com o grupo controle (Fig. 19).

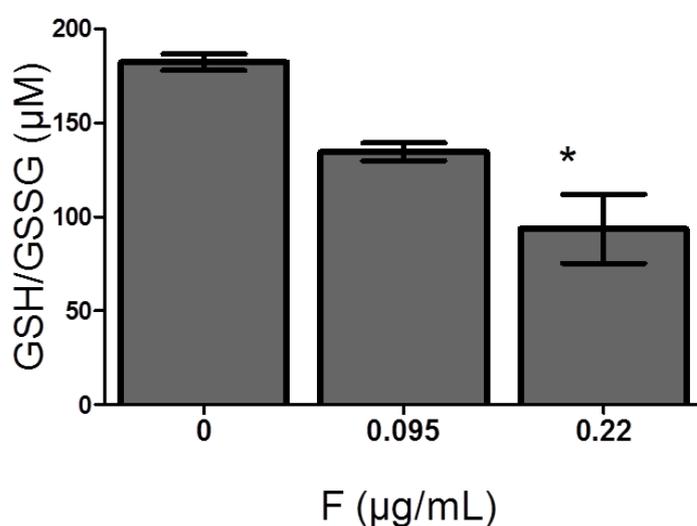


Figura 19: Razão GSH/GSSG. Após a exposição ao flúor nas células U87 foi avaliada a razão de GSH/GSSG através do kit GSH/GSSG-Glo (Promega). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste *Tukey* ( $n=3$ ). Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p<0,05$ . \* vs 0.

#### 4.5. FRAGMENTAÇÃO DO DNA INDUZIDA PELO FLÚOR

Para compreender se as alterações observadas nas células U87 após a exposição ao flúor seriam capazes de induzir danos ao material genético das células, nós também buscamos avaliar o efeito do flúor na integridade do DNA. Nossos resultados demonstram que somente após exposição a 0.22 $\mu$ g/mL foi possível observar aumento da porcentagem de DNA na cauda do cometa, como um indicativo de fragmentação do material genético (Fig. 20A). Para compreender como essa fragmentação ocorre entre os grupos, nós avaliamos a porcentagem do momento da cauda do cometa. Essa avaliação funciona como um indicativo do padrão de fragmentação, podendo ser utilizado para diferenciar a fragmentação de DNA ocasiona em morte celular induzida por apoptose (padrão homogêneo dentro grupo avaliado) e morte celular por necrose (padrão heterogêneo dentro do grupo). Nossos resultados demonstram que a avaliação do momento da cauda demonstra um padrão heterogêneo dentro de um mesmo grupo (observar barra de erro) podendo ser um indicativo de fragmentação comum a células necróticas (Fig. 20B).

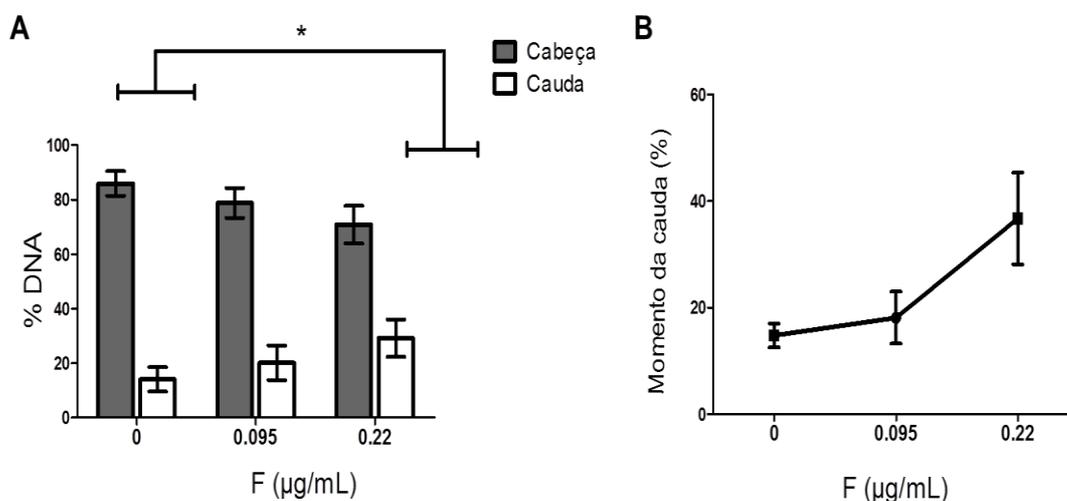


Figura 20: Integridade do DNA pelo teste cometa. Após a exposição ao flúor nas células U87 foi avaliado a integridade do DNA pelo método cometa. A) Porcentagem de DNA presente na cabeça e cauda do cometa. B) Momento da cauda do cometa em porcentagem. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via seguido de pós teste *Tukey* (n=3). Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs 0.

#### 4.6. A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR INDUZ ALTERAÇÕES NO PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO GENICA DAS CÉLULAS U87

Após a caracterização dos danos citotóxicos e genotóxicos observados pela exposição ao flúor, nós avaliamos o perfil global do transcriptoma das células U87 expostas ou não ao flúor. A análise de expressão gênica foi realizada após exposição a 0.095 $\mu\text{g/mL}$  e 0.22 $\mu\text{g/mL}$  com o intuito de compreender quais genes seriam diferencialmente expressos em situações onde o flúor pode ou não exercer efeitos citotóxicos significativos, como os avaliados anteriormente. Nossos resultados mostram uma significativa alteração no perfil global de expressão em ambas as concentrações utilizadas (Fig. 21 e 22). A figura 21 mostra como através da análise de cluster hierárquico como o perfil global de expressão gênica das células expostas são mais similares entre si quando comparadas com o grupo controle. Já a figura 22A-B mostram que esses genes possuem significância estatística quando aplicado um corte de fold change maior que 1.5 (pontos em azul e vermelho), para genes que tiveram sua expressão suprimida (esquerda) ou superexpressa (direita).

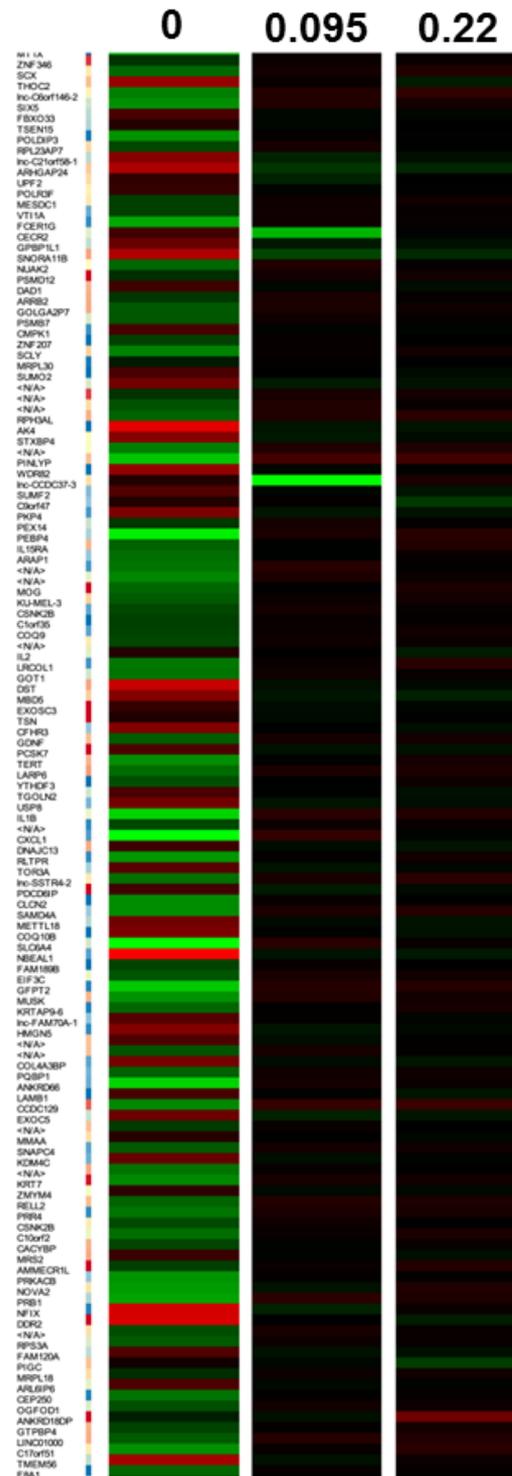


Figura 21: Perfil global de expressão gênica das células U87 expostas ou não ao flúor, avaliado pela técnica de microarray de uma cor (Agilent). Análise de cluster hierárquico por padrão de cores de expressão gênica onde cada linha representa um gene diferencialmente expresso, podendo estar down-regulado (vermelho) ou up-regulado (verde). Os dados foram expressos como  $\text{Log}_2\text{FC}$  e avaliados por ANOVA de uma via com pos teste Tukey, após correção por FDR ( $n=3$ ).

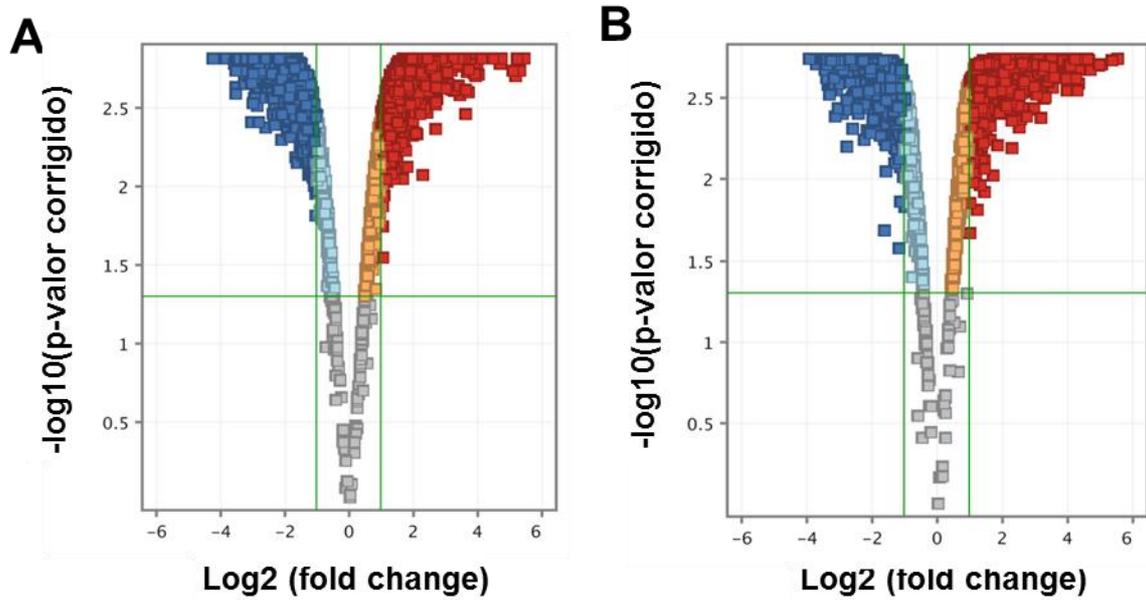


Figura 22: Perfil global de expressão gênica das células U87 expostas ou não ao flúor, avaliado pela técnica de microarray de uma cor (Agilent). Volcano plot demonstrando o padrão estatístico de genes diferencialmente expressos que apresentam  $p < 0.05$  e  $FC > 1.5$  após exposição a  $0,095 \mu\text{g/mL}$  (A) e  $0,22 \mu\text{g/mL}$  (B). Genes down-regulados são mostrados em azul (escuro ou claro) enquanto que genes up-regulados são mostrados em vermelho/laranja. Os dados foram expressos como  $\text{Log}_2\text{FC}$  e avaliados por ANOVA de uma via com teste Tukey, após correção por FDR ( $n=3$ ).

Após a exposição a 0.095 $\mu$ g/mL houve uma diminuição na expressão de 1735 genes e aumento na expressão de 1047 genes. Já após a exposição a 0.22 $\mu$ g/mL foi observada a diminuição da expressão de 1863 genes e aumento da expressão de 1023 genes. Dentre esses genes, foi observado que 131 genes aparecem diferencialmente expressos exclusivamente após a exposição a 0.095 $\mu$ g/mL enquanto 235 genes aparecem exclusivamente após a exposição a 0.22 $\mu$ g/mL quando comparados com o grupo controle (Fig. 23A-B e tabelas 3 e 4). A análise genica entre as concentrações revelou uma maior interferência da exposição a 0,22 $\mu$ g/mL em genes responsáveis pelo sistema mitocondrial quando comparado com a exposição a menor concentração. Esses genes foram identificados em negrito nas tabelas 3 e 4.

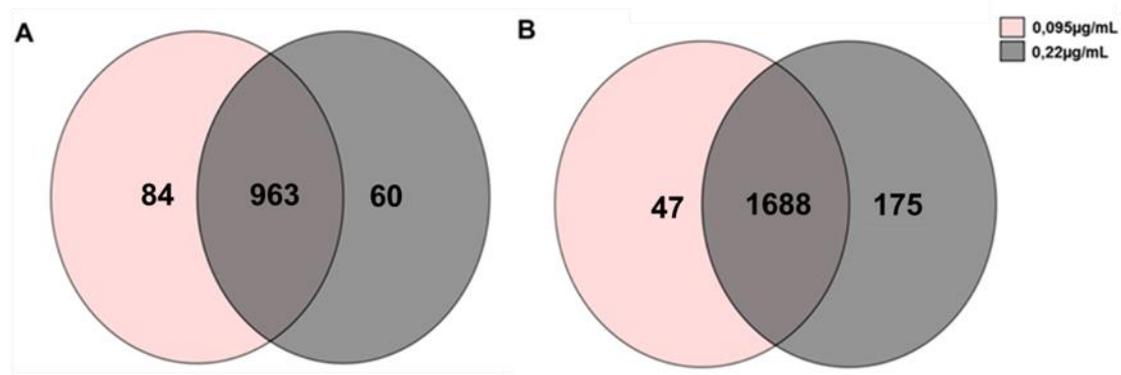


Figura 23: Quantidade de genes diferencialmente expressos após exposição ao flúor. Genes UP- (A) e DOWN-regulados (B) após exposição a 0,095 (rosa) e 0,22 $\mu$ g/mL (cinza).

#### 4.7. ANALISE DE ENRIQUECIMENTO GENE ONTOLOGY (GO) BASEADA NOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para entender como o grupo de genes diferencialmente expresso após a exposição ao flúor impacta no fenótipo celular, foi realizada a análise de enriquecimento gênico através do programa DAVID. Essa análise permite a identificação de termos GO mais relevantes em um determinado *gene set* quando comparado com um grupo 0de referência (controle). A análise de GO revelou que o flúor pode interferir nos três principais grupos, como componentes celulares (local onde o produto gênico atua), funções moleculares (produto gênico a nível bioquímico) e processos biológicos (eventos celulares em que o produto gênico contribui). (Fig. 24). Dentre os principais termos GO associados a exposição ao flúor independente de concentração nós podemos citar: polimorfismo, *splicing* alternativo, fosfoproteínas, ligação a proteínas, *splice variant*, núcleo, citoplasma, acetilação, citosol, *coiled coil*, nucleoplasma, exossomo extracelular, doenças mutagênicas, membrana, ligação ao DNA, ligação ao nucleotideo, tranferase, ligação a poly-RNA, ligação ao ATP, metilação, região de composição parcial-Pro rich, transdução de sinal, nucléolos, região de ligação fosfato nucleotideo - ATP (Fig. 25A e B)

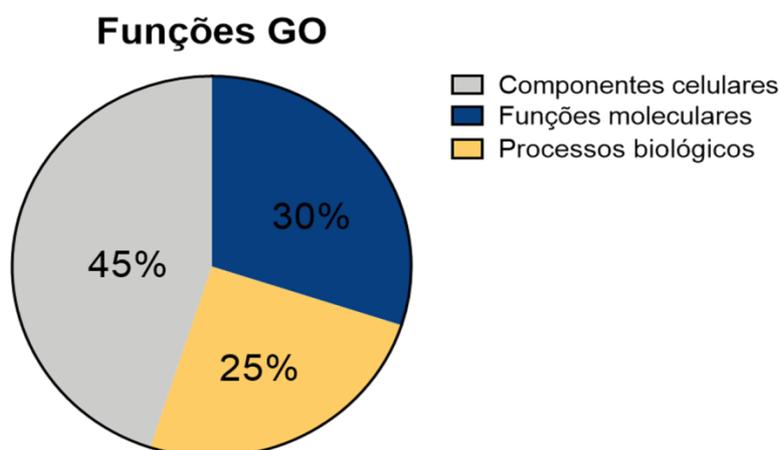


Figura. 24: Análises GO das três principais funções alteradas após a exposição ao fluoreto.

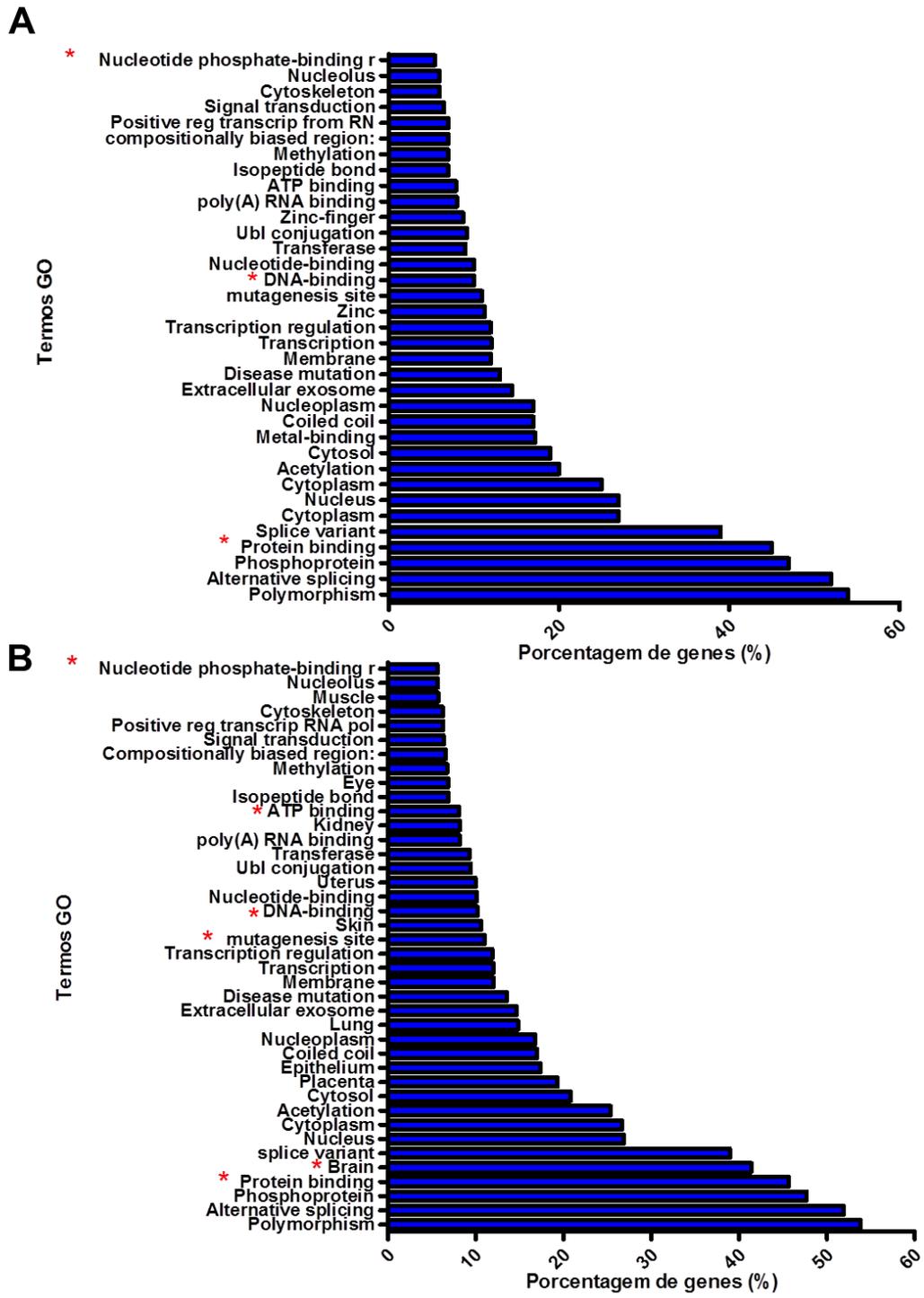


Figura.25: Principais termos GO alterados após a exposição ao fluoreto. Foram demonstrados termos que apresentaram  $p < 0.05$  e  $FC > 2$ . Os termos foram obtidos após análise de enriquecimento genico.

#### 4.8. ANALISE DE VIAS MOLECULARES ALTERADAS APÓS A EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

As principais vias moleculares alteradas após a exposição ao flúor encontram-se na Fig.26. Essa análise indica se uma determinada via molecular possui p-valor maior (laranja) ou menor (cinza) dentro de uma determinada condição experimental. Nossos dados corroboram com as alterações fisiológicas encontradas nas células U87, sugerindo uma importante participação da mitocôndria na toxicidade do flúor através de uma regulação negativa das vias de organização mitocondrial. Também é possível observar que a exposição ao flúor possui grande impacto nas vias que controlar a divisão e ciclo celular, pontos de checagem em G2/M, organização de cromatina e proteínas de membrana. Nossos dados também sugerem alterações na via de sinalização NFkB mediada pelo TNF-alfa. A figura 27 mostra como os genes e vias diferencialmente expressos são compartilhados entre as diferentes condições

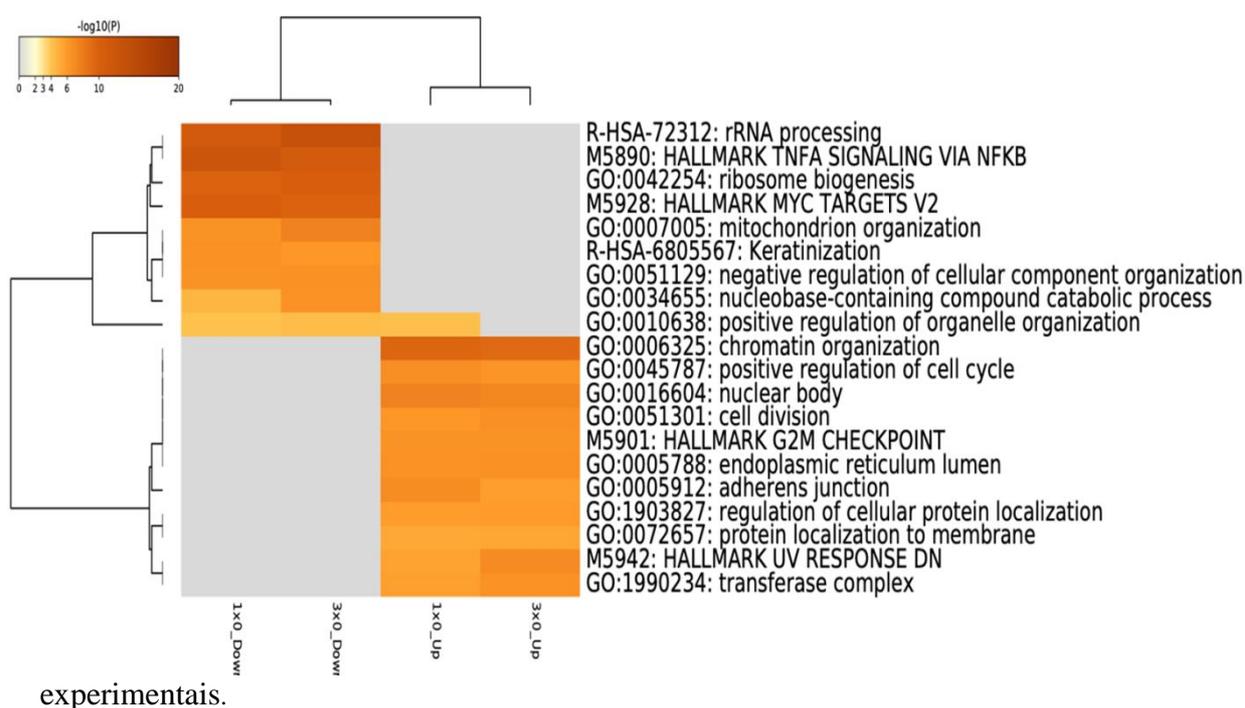


Figura. 26: Principais vias moleculares alteradas após a exposição ao fluoreto de acordo com sua significancia biologica dentro da exposição. O sistema de cores indica valores o valor p em escala logaritimica.

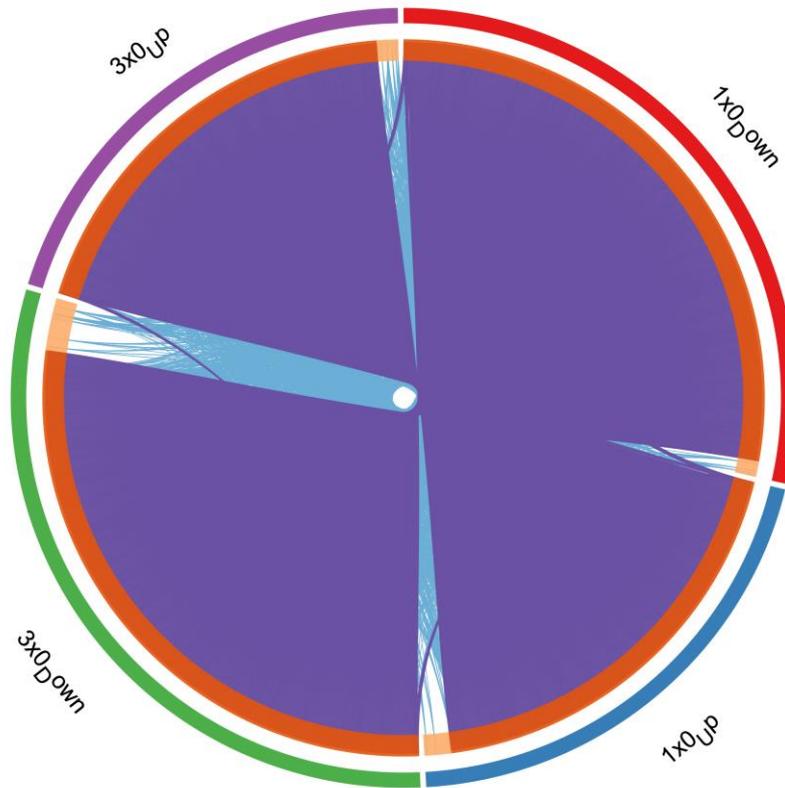


Figura.27: Distribuição genica nas vias moleculares alteradas após a exposição ao fluoreto. O compartilhamento de genes entre as concentrações foi demonstrado através de linhas azul claro enquanto as vias moleculares foram demonstradas através de linhas azul escuro.

#### 4.9. INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA E ANÁLISE DE HUB GENES

Na análise de interação proteína-proteína baseada a partir dos genes diferencilmente expressos, foi mostrado quais genes possuíam a maior significância biológica no contexto da exposição. Os 25 genes mais significativos são mostrados nas tabelas 5 e 6. A Figura 28 mostra como esses genes são organizados hierarquicamente nas vias moleculares demonstradas anteriormente e como essas vias interagem entre si. As cores internas indicam os grupos a que cada via pertence enquanto que a distribuição de cores (preto, branco, cinza escuro e cinza claro) indica a qual condição os genes podem ser encontrados (preto 0.095 Down, branco 0.095 Up, cinza escuro 0.22 Down e cinza claro 0.22 Up).

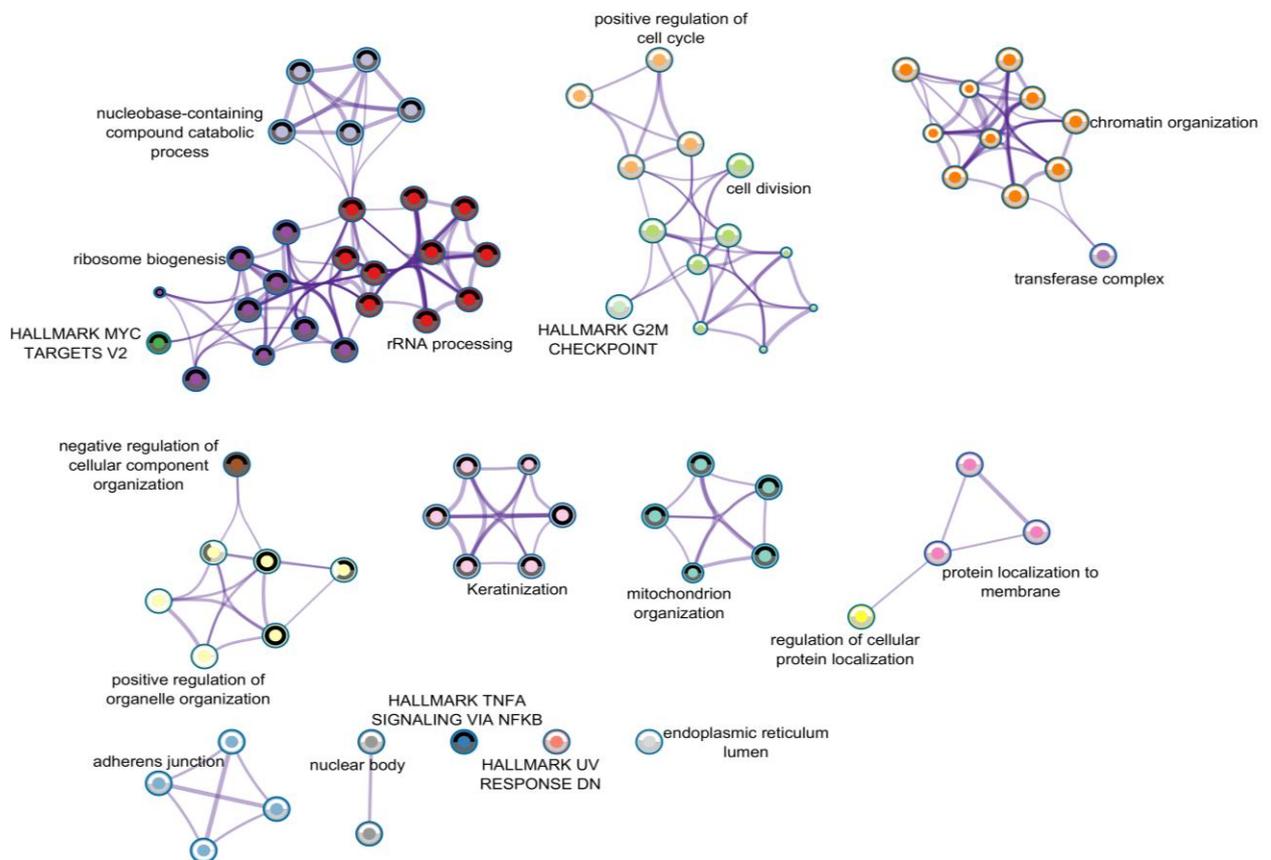


Figura 28: Rede de interação proteína-proteína diferencilmente expressas após a exposição ao fluoreto. A figura mostra as vias moleculares organizadas hierarquicamente (a legenda mostra apenas o grupo hierarquicamente mais alto) sob uma mesma cor. Também mostra quais grupos de pathways possuem relação entre si. As cores internas indicam os grupos a que cada via pertence e o gráfico interno indica em quais condições os genes podem ser encontrados (preto para 1x0 Down, branco para 1x0 Up, cinza escuro para 3x0 Down e cinza claro para 3x0 Up).

Quadro 3: GenesHub identificados após 10 dias de exposição a 0,095µg/mL de fluoreto

Display name	Query term	Description	Degree	Betweenness	Stress
RPS27A	RPS27A	ribosomal protein S27a	157	52.031	9E+05
UBA52	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	150	38.660	7E+05
TP53	TP53	tumor protein p53	66	52.278	6E+05
GNG2	GNG2	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 2	58	5.116	79372
RHOA	RHOA	ras homolog family member A	58	12.383	2E+05
AVP	AVP	arginine vasopressin	57	5.335	2E+05
EP300	EP300	E1A binding protein p300	56	33.173	4E+05
PIK3R1	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (alpha)	55	14.458	2E+05
APP	APP	amyloid beta (A4) precursor protein	51	5.930	61104
CDC20	CDC20	cell division cycle 20 homolog (S, cerevisiae)	49	4.127	77974
RPS13	RPS13	ribosomal protein S13	49	3.445	1E+05
RPS26	RPS26	ribosomal protein S26	49	3.445	1E+05
RPS3A	RPS3A	ribosomal protein S3A	49	3.445	1E+05
GNG5	GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 5	48	2.521	68480
EGF	EGF	epidermal growth factor	48	12.386	2E+05
GNG8	GNG8	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 8	47	753	17542
GNG10	GNG10	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 10	47	753	17542
RPS18	RPS18	ribosomal protein S18	46	909	16688
RPL5	RPL5	ribosomal protein L5	44	3.301	96496

EIF4E	EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	42	10.945	1E+05
NHP2L1	NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S, cerevisiae)	42	8.481	1E+05
ANAPC1	ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1	42	3.128	62820
RPL7	RPL7	ribosomal protein L7	42	2.006	78300
VAMP2	VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	41	7.493	2E+05
RPL13A	RPL13A	ribosomal protein L13a	39	833	46648

Quadro 4: GenesHub identificados após 10 dias de exposição a 0,22µg/mL de fluoreto

Query term	Description	Degree	Betweenness	Stress
RPS27A	ribosomal protein S27a	166	56385,28741	1E+06
UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	159	44037,39955	8E+05
TP53	tumor protein p53	68	53789,31745	6E+05
RHOA	ras homolog family member A	60	12890,80308	2E+05
GNG2	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 2	57	5394,084727	87500
EP300	E1A binding protein p300	57	33782,33453	4E+05
RPS13	ribosomal protein S13	55	3312,716869	2E+05
RPS26	ribosomal protein S26	55	3312,716869	2E+05
RPS29	ribosomal protein S29	55	3312,716869	2E+05
RPS3A	ribosomal protein S3A	55	3312,716869	2E+05
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (alpha)	54	13400,28019	2E+05
AVP	arginine vasopressin	53	5649,93148	2E+05
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S, cerevisiae)	52	4748,525366	92414
RPS18	ribosomal protein S18	52	864,7576048	18394
RPL5	ribosomal protein L5	51	3444,003192	1E+05
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	51	7428,207944	85118
EGF	epidermal growth factor	49	11162,2682	2E+05
RPL7	ribosomal protein L7	48	2188,025528	1E+05
RPL17	ribosomal protein L17	48	1980,324078	94086

RPL23A	ribosomal protein L23a	47	1648,109603	9219 8
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	46	13266,36613	2E+0 5
GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 5	46	2597,896754	6960 0
RPL13A	ribosomal protein L13a	45	923,3499458	6850 8
GNG8	guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 8	45	747,8967541	1819 0
SNORD68	ribosomal protein L13	45	952,0858267	6283 6

#### 4.10. AMPLIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POR RT-QPCR

A análise quantitativa por RT-qPCR foi utilizada para validar os genes diferencialmente expressos encontrados na análise de microarray. Dois genes foram validados, tendo a sua quantificação sido demonstrada em relação à expressão relativa de *TBP*, um gene constitutivo que já foi demonstrado por não ser diferencionalmente expresso após a exposição ao flúor. Nossos resultados sugerem que o flúor pode ocasionar o aumento na expressão dos genes *CY1B1* e *PTGE*, validando dessa forma os achados encontrados na análise do microarray (Fig. 29).

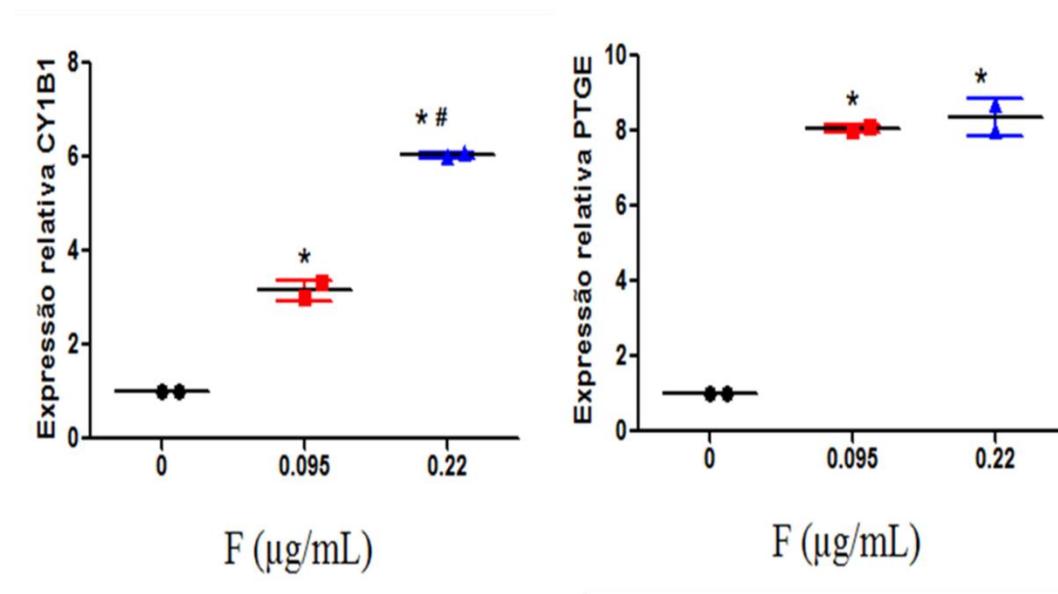


Figura. 29: Quantificação dos genes diferencialmente expressos por RT-qPCR. Foram quantificados os genes *CY1B1* e *PTGE* com expressão relativa ao gene constitutivo *TBP*. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão e foram considerados como significativos os dados que apresentaram  $p < 0,05$ . \* vs controle, # vs 0.095.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho nós demonstramos que a exposição de longa duração ao fluoreto é capaz de ocasionar alterações funcionais em células da glia humana em cultivo celular.. Nossos resultados apontam que a exposição ao flúor pode ocasionar diminuição no percentual de células vivas, alterações morfológicas e no metabolismo celular, disfunção mitocondrial, diminuição nos níveis de GSH/GSSG bem como danos ao material genético de células gliais da linhagem U87. Para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do flúor em células da linhagem U87, este trabalho demonstrou a alteração no perfil global de expressão gênica das células gliais, com diminuição na expressão de 1735 genes e aumento na expressão de 1047 genes após exposição a 0.095µg/mL e a diminuição da expressão de 1863 genes e aumento da expressão de 1023 após exposição a 0.22µg/mL. Nós também destacamos as principais vias moleculares alteradas após a exposição, como a via de sinalização TNF-alfa via NFK-B, evidenciando genes com significativa importância biológica (genes hub) como os genes PTGES3, EP300, CYP1B1, RPS27A.

Para demonstrar as alterações ocasionadas pelo flúor no SNC, nós optamos por utilizar linhagem de células humanas. Os teste *in vitro* representam uma alternativa a experimentação animal com o intuito de reduzir, repor e refinar os modelos experimentais atualmente utilizados, de acordo com a lei dos 3R's (North e Vulp, 2010). Além disso, diversos trabalhos na literatura tem demonstrado que há uma boa correlação entre os dados encontrados em cultura de células primarias e linhagens celulares (Ekwall e col., 1990). Sendo assim, a redução do sacrifício de animais aliado a fácil manutenção e resultados mais preditivos de estudos toxicológicos em linhagem celulares, faz desse modelo uma excelente alternativa de estudo. Isso se torna ainda mais importante quando se analisa o efeito de xenobióticos no SNC, onde os efeitos em humanos são difíceis de serem identificados devido a complexidade das análises e questões éticas envolvendo pesquisas em seres humanos. Dessa forma, estudos onde se faz necessário a identificação de vias moleculares em resposta a toxicidade de xenobióticos são importantes para a identificação de ferramentas moleculares que possam ser uteis para estratégias de tratamentos e prevenção a toxicidade.

Sabendo-se que a exposição de humanos ao flúor acontece de maneira constante durante longos períodos da vida tanto através da ingestão de água fluoretada como do consumo de diversos alimentos que contém flúor na sua composição, neste trabalho nós procuramos mimetizar um modelo de exposição de longa duração em cultura celular.

Dessa forma, as células foram expostas a cada dois dias a solução contendo 0.095µg/mL a 0.22µg/mL de flúor e após 10 dias de exposição foram realizados os teste para identificar alterações na fisiologia celular, como viabilidade, metabolismo, estresse oxidativo, bem como para identificar possíveis alterações gênicas nas principais células do SNC. A escolha das concentrações utilizadas foi baseada na concentração de flúor encontrado no sangue e plasma de populações que possuem contato com água de abastecimento público fluoretada e de populações que vivem em regiões de exposição endêmica e apresentam quadro de fluorose dentaria (Hennon e col., 1969; Cardoso e col., 2006; Şener e col., 2007; Ahmed e col., 2012, Kumar e col., 2017).

Dessa forma, nós primeiramente procuramos avaliar se as concentrações utilizadas seriam capazes de induzir alterações celulares mais grosseiras, como diminuição na viabilidade celular, alterações morfológicas e no metabolismo das células gliais (U87) e neuronais (IMR-32). Nossos resultados indicaram que o flúor induz morte celular somente nas células U87 após exposição a 0.22µg/mL, sugerindo que essas células apresentam maior sensibilidade quando comparada com células IMR-32 expostas a mesma concentração de flúor. Estudos conduzidos em modelos animais que avaliam a citotoxicidade do flúor no SNC geralmente mostram alterações teciduais de maneira geral, sem a identificação dos tipos celulares que são alterados após a exposição. A participação das células da glia na resposta a toxicidade do flúor no SNC já foi demonstrada, sugerindo que tanto a exposição a baixas (10ppm) quanto a altas concentrações (100ppm) podem ser capazes de induzir a reatividade glial após 4 e 11 semanas de exposição, respectivamente (Akinrinade 2015; Shivarajashankara 2002). Por outro lado, estudos que sugerem a indução de morte celular em cultura de neurônios de diferentes espécies (Homo sapiens, Gallus galus, Mus musculus) geralmente utilizam concentrações tão elevadas que não representam a realidade de exposição a que seres humanos estão expostos. Por exemplo, a morte celular e ativação de caspase 3, aparecem quando cultura de neurônios primários de rato e células humanas da linhagem SHSY-5Y são expostas de forma aguda a concentrações acima de 40µg/mL (Zhang et al., 2007; Xu et al., 2009). Sabendo-se que a provável dose toxica do fluoreto corresponde a 5mg de flúor por Kg (Whitford 2011), no cenário proposto seria necessário a ingestão de 200L de solução contendo flúor por Kg de massa corpórea.

Sabendo-se que a normal morfologia também pode ser um indicativo da saúde celular em cultivo, nós realizamos análises de morfometria para demonstrar parâmetros relacionados a área do núcleo e citoplasma. Nossos resultados indicaram que somente

nas células da linhagem U87 foi possível observar estes tipos de alteração, sugerindo que o flúor pode ocasionar alterações estruturais nas células da glia que podem estar relacionadas com a indução de toxicidade e morte celular.

Outro ponto importante a ser analisado está relacionado a fisiologia metabólica, onde parâmetros relacionados a mitocôndria, a principal fonte de energia das células, pode servir como indicativo de toxicidade de xenobióticos (Abdelwahid e col., 2011; Mason e Rathmell, 2011). Dessa forma, nós avaliamos dois parâmetros: a redução do MTT pela enzima NADPH presente tanto em mitocôndrias como no citoplasma celular e a síntese de ATP. A análise de metabolismo pelo método do MTT revelou uma discreta alteração em neurônios após exposição a 0,095 e 0,19 $\mu\text{g/mL}$  enquanto que nenhuma alteração foi observada após exposição a 0,22 $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, quando observado a síntese de ATP, nenhuma alteração significativa foi observada. Dessa forma, acreditamos que apesar da diferença estatística apontada após a análise de metabolismo pelo método MTT, nenhum efeito biológico pode realmente ser observado nesse tipo celular. Por outro lado, quando avaliadas as células U87, foi possível observar um aumento no metabolismo após a exposição a maior concentração de flúor (0,22 $\mu\text{g/mL}$ ). Os níveis de ATP no entanto, aparecem diminuídos desde a exposição a menor concentração (0,095 $\mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que nessas células o flúor pode atuar como uma toxina de mitocôndria mesmo em concentrações mais baixas que não são capazes de induzir a morte celular.

Diversos estudos já demonstraram que o flúor pode atuar como uma toxina de mitocôndria tanto em modelo animal quanto em cultivo celular (Anuradha e col.2011; Barbier e col., 2010; Song e col., 2017; Tu e col., 2018; Tan e col., 2018; Wei e col., 2018). Essas alterações na mitocôndria levam ao comprometimento do normal funcionamento da cadeia respiratória e isso acontece principalmente devido a inibição de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e diminuição na produção de ATP (Murphy e col., 1992; Suketa e col., 1995; Kravtsova e col., 2004; Adamek e col., 2005; Xu e col., 2007). Sabendo que nossos resultados sugerem que nas concentrações utilizadas o flúor exerce efeito na função mitocôndrial somente de células da glia humana sem nenhum efeito em neurônios, é possível que as células da glia atuem como alvo primário da toxicidade, no entanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar esta hipótese.

É importante lembrar que o status metabólico das células pode estar intimamente ligado aos processos de manutenção da viabilidade e proliferação celular, sendo por este motivo que toxinas que são capazes de comprometer o normal funcionamento do

metabolismo celular serem consideradas possíveis candidatas a induzir a morte celular após longo prazo de exposição (Orrenius e col., 2010; Tang e col., 2019). Além disso, estudos sugerem que alterações metabólicas podem estar relacionadas com danos ao material genético devido a formação de espécies reativas de oxigênio (Higuchi, 2003; Bajt e col., 2007)

Dessa forma, baseado nos resultados encontrados nós optamos por aprofundar os estudos de toxicidade do flúor somente nas células U87 com o intuito de demonstrar quais as principais alterações fisiológicas e genéticas seriam induzidas após a exposição nesse tipo celular. Sabendo-se que as alterações de mitocôndria possuem relação direta com os mecanismos de morte celular (Orrenius e col., 2010; Tang e col., 2019), nós procuramos entender então como o flúor ocasiona morte nas células U87. O teste utilizado fornece três parâmetros de análise voltado para viabilidade celular, citotoxicidade e ativação de caspase 3 e 7. A análise de citotoxicidade funciona como um indicativo de que células perderam sua integridade de membrana, o que pode revelar a indução de necrose primária. Nossos resultados de viabilidade corroboram com o demonstrado pelo teste de exclusão por azul de tripan, validando nossa técnica. Além disso, foi observado um aumento da citotoxicidade após exposição a 0,22µg/mL enquanto que nenhuma ativação de caspase 3 ou 7 foi observada nas células expostas ao flúor. Nossos resultados indicam um mecanismo de morte celular independente da ativação de caspases 3 e 7 e com perda de integridade de membrana, características essas similares a morte celular por necrose (Linkermann e col., 2014; Tang e col., 2019).

Em seguida nós procuramos avaliar se essa toxicidade observada nas células U87 seriam ocasionadas devido ao desbalanço oxidativo induzido pela exposição ao flúor. A dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a EROS mais estável em cultivo celular, mostrou que a exposição a 10 dias ao flúor não ocasiona alteração nos níveis de EROS nem peroxidação de lipídeos de membrana. No entanto, quando avaliamos os níveis de GSH/GSSG foi possível observar uma significativa diminuição após a exposição a 0,22µg/mL. A literatura sugere que o flúor é um potente inibidor enzimático (Adamek e col., 2005), atuando principalmente nas enzimas do sistema glutatona (Campos-pereira, 2017; Podder e col., 2010). Essas alterações no sistema glutatona já foram demonstrada em estudos em humanos e em diferentes modelos *in vivo* (Shivarajashankara e col., 2001; Chouhan e col., 2008; Flora e col., 2009; Miranda e col., 2018). *In vitro*, já foi demonstrado em células pancreáticas (BTC-6), neurônios hipocampais primários de rato

e hepatócitos (rato e HepG2) (Morgan e col., 2002; Zhang e col., 2007; Garcia-Montalvo e col., 2009). Sendo assim, nossos resultados corroboram com o encontrado na literatura e demonstram que os níveis de GSH/GSSG também são alterados após exposição de células da glia ao flúor.

A glutatona representa uma importante enzima antioxidante no combate aos radicais livres, no entanto, sabendo-se que a exposição ao flúor nas células U87 não foi capaz de aumentar os níveis de EROS, uma possível explicação para a diminuição da razão GSH/GSSG pode estar na diminuição dos níveis de ATP produzidos nas células após a exposição. A síntese de glutatona acontece através de duas reações enzimáticas de maneira dependente de ATP, então em situações onde ocorre a diminuição na produção de ATP é possível que ocorra alterações no sistema glutatona sem necessariamente estar relacionado com o aumento de EROS na célula (Shelly, 2013).

Sabendo-se que a disfunção mitocondrial é responsável pela liberação de proteínas que interferem diretamente na integridade do material genético da célula (Bajt e col., 2007), nós então procuramos avaliar a integridade do DNA das células após a exposição. Nossos resultados apontaram para um discreto aumento na fragmentação do DNA (porcentagem de DNA presente na cauda do cometa) quando as células foram expostas a 0,22µg/mL. Essa fragmentação aparece de maneira independente a morte celular mediada por apoptose, sendo assim, é importante ressaltar que essa fragmentação de DNA pode funcionar como um indicador de necrose que ocorreu após dias de exposição a um composto citotóxico, corroborando com os resultados demonstrados anteriormente. Estudos recentes tem sugerido que a fronteira entre as diferentes características de morte mediada por apoptose ou necrose tem sido cada vez mais difíceis de serem observadas (Brauchle e col., 2013; Yuan e col., 2016; Tang e col., 2019). Em um estudo realizado em células *Jukart* foi demonstrado que nos primeiros estágios da necrose é possível observar fragmentação de DNA de maneira específica, através de cortes somente nas extremidades 5'. Acredita-se que a ruptura na membrana celular induzida pela morte por necrose seja capaz de liberar nucleases que danificam o próprio material genético da célula, no entanto, os mecanismos desse tipo de fragmentação ainda não são completamente compreendidos (Fairbairn e O'Neill, 1995, Didenko e col., 2003). Uma maneira de tentar distinguir a fragmentação do DNA na morte por apoptose e necrose é através da quantificação do momento da cauda do cometa realizado através do ensaio cometa. O momento da cauda pode ser calculado através do produto do comprimento da cauda com o percentual de DNA presente na

cauda. Sendo assim, células apoptóticas apresentam um momento homogêneo enquanto células necróticas apresentam momento heterogênea, com uma diminuição nas diferenças quantificáveis entre o DNA danificado e o DNA não danificado (Fairbairn e O'Neill, 1995, Olive e col., 1999). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a exposição de longa duração ao flúor pode levar as células da linhagem U87 a morrer por necrose.

Após demonstrar as principais alterações fisiológicas e bioquímicas encontradas nas células U87, nós realizamos um mapeamento do perfil global de expressão gênica para elucidar os mecanismos moleculares da toxicidade do flúor. Nossos resultados demonstraram uma significativa alteração no perfil de expressão genica mesmo na menor concentração utilizada. Esse resultado indica que mesmo as concentrações de flúor que não apresentam toxicidade evidente ao organismo devem ser observadas com cautela. Sabendo-se que todo e qualquer composto pode ser capaz de ocasionar alterações prejudiciais ao organismo, dependendo do tempo de exposição e concentração/dose, nossos dados sugerem que mesmo a exposição a baixas concentrações de flúor podem ser potencialmente prejudiciais, pois são capazes de alterar o perfil de expressão genica das células. Quando avaliamos os genes diferencialmente expressos nas duas condições experimentais, nossos resultados indicaram uma grande similaridade entre genes down e up regulados após a exposição 0.095 e 0.22 $\mu$ g/mL. No entanto, 131 genes apareceram exclusivamente regulados após exposição a 0.095 e 144 genes exclusivamente na exposição a 0.22 $\mu$ g/mL.

Diversos trabalhos já demonstram que a exposição ao flúor pode ocasionar alterações na expressão de genes em diferentes modelos *in vitro*, como cultura de células de osteosarcoma, células epiteliais, odontoblastos, linfócitos e células neuronais da linhagem SHSY-5Y (Wurtz e col., 2008; Liu e col., 2011; Tabuchi e col., 2014; He e col., 2015; Ghandi e col., 2016). Sendo assim, o presente estudo é o primeiro a demonstrar alterações do perfil de expressão gênica de células da glia humana da linhagem U87, sendo que nossos resultados podem trazer novas ideias para elucidar os mecanismos de toxicidade do flúor no SNC.

Nas células do trato oral, as alterações gênicas encontradas são geralmente relacionadas a alterações no balanço oxidativo, metabolismo mitocondrial, condensação de cromatina e morte celular (Wurtz e col., 2008; Tabuchi e col., 2014; Ghandi e col., 2016). Nossos resultados corroboram com o encontrado na literatura, sugerindo que a toxicidade do flúor possui íntima relação com danos de mitocôndria, estresse oxidativo

e danos ao material genético em diferentes tecidos do organismo. Sabendo-se que o flúor já foi apontado como uma toxina de mitocôndria, é possível que os principais efeitos toxicológicos observados sejam ocasionados por dano primário nessa organela. Nossos resultados demonstram que uma série de genes relacionados com o normal funcionamento da mitocôndria foram diferencialmente expressa nos grupos tratados com flúor. Dentre esses genes podemos citar, *GPD2*, *TFAM*, *PARP14*, *MGARP*, *PARP9*, *SLC25A16*, *ATPAF1*, *GPAM*, *CYB5R4*, *CYP1B1*, *CYB5RL* que são up-regulados e *CTSE*, *MRPL2*, *PARP10*, *PARP12*, *TOMM40*, *POLRMT*, *HGNC*, *TIMM50*, *MRRF*, *ND4*, *FTMT*, *MRPS2*, *SLC25A6*, *ERAL1*, *AIF1L*, *SARS2*, *ATP5D*, *ND3*, *SLC25A25*, *MPV17L2*, *TUFM*, *TOMM34*, *MTG1*, *SLC25A28*, *MRM1*, *MAVS*, *MPRS12*, *BID*, *MRPS36*, *ND2*, *BCS1L*, *CYP2R1*, *CYP4F11*, *UQCRC1*, *CYP4F8*, *UQCR10*, *SCO2* que são down-regulados tanto após exposição a 0.095 quanto a 0.22µg/mL. Já os genes *PMPCA* aparece down-regulado exclusivamente após exposição a 0,095 enquanto que os genes *MRPS21*, *MIEF2*, *MRPS12* e *CYCI* aparecem exclusivamente no grupo exposto a 0,22µg/mL. A alteração nesse grupo de genes é responsável por direcionar alterações nos processos biológicos relacionados a organização mitocondrial, que de acordo com o Gene Ontology resulta em problemas na síntese dos componentes mitocondriais bem como na replicação do genoma.

Nossos resultados também demonstraram uma significativa alteração em genes responsáveis pela síntese de glutathiona, como a supressão dos genes *GSTO1*, *HAGHL*, *CHAC1*. Esses genes são responsáveis pelo controle oxidativo e metabolismo mediado pela glutathiona. No SNC, os níveis de glutathiona são maiores nas células da glia do que em neurônios e é bem estabelecido na literatura a importância da manutenção da glutathiona neuronal pelas células gliais (Dringen e col., 1999; Sagara e col., 1993; Barreto e col., 2011). Estudos também sugerem que a glutathiona possui um papel importante na comunicação celular, atuando como um gliotransmissor (Oja e col., 2000). Esse tripeptídeo, por ser formado por resíduos de glutamato, seria capaz de mimetizar o efeito excitatório do glutamato, possuindo então significativa importância no processo de comunicação neuronal. Sendo assim, além da influência na da glutathiona no balanço oxidativo, é importante ressaltar que a diminuição nos níveis de glutathiona no SNC pode estar intimamente relacionado com o aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e doença de Parkinson (Jonhson e col., 2012; Smeyne e Smeyne, 2013; Aoyama e Nakaki 2013).

Diversos estudos já demonstraram que o flúor pode ocasionar alterações cognitivas em seres humanos, como a diminuição no coeficiente de inteligência e o aumento de casos diagnosticados de déficit de atenção e hiperatividade em crianças que vivem em áreas de exposição endêmica ao flúor (Lu e col., 2000, Malin e Till, 2015). No entanto, é importante ressaltar que essas alterações cognitivas geralmente são observadas em crianças que possuem altos níveis de flúor ( $4.99 \pm 2.57$  mg/L) identificado na urina (Lu e col., 2000). Esse fato levanta dúvidas sobre os efeitos a longo prazo da exposição ao flúor, levando diversos autores a se questionar se a exposição por um longo período da vida poderia estar relacionada com o aparecimento de doenças neurodegenerativas em adultos e idosos. Estudos recentes em modelos animais já demonstraram que ratos que receberam água floretada por um longo período apresentam diminuição na capacidade de armazenar informações, interferindo na memória espacial mas não na memória de trabalho (Jiang e col., 2014; Han e col., 2014; Zhu e col., 2017; Sun e col., 2018). Além disso, Jeti e colaboradores (2016) demonstraram que as alterações na memória ocasionadas pelo flúor podem ser evitadas através do uso de antioxidantes como vitamina C e Ginkgo biloba, confirmando que as alterações observadas após exposição ao flúor acontecem principalmente devido ao desbanço oxidativo que pode ser mediado pela mitocôndria.

Em relação as vias moleculares moduladas pela exposição ao flúor, a literatura sugere a participação de vias que possuem papel reconhecido no controle da sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular como as vias NF- $\kappa$ B, WNT, insulina, TGF-beta, hedgehog, VEGF e MAPK (Zhang e col., 2008; Wang e col., 2011). O papel da via MAPK foi demonstrada em modelos de exposição em odontoblastos, sugerindo que a morte celular por apoptose nesse tipo de célula depende mais da participação da via JNK do que da via ERK (Karube e col., 2009). Nossos resultados apontaram para uma significativa participação da via TNF-alfa via NF $\kappa$ B. O fator alfa de necrose tumoral (TNF) tem sido demonstrado por atuar em diversas vias de sinalização celular, como indução de morte celular e ativação da transcrição gênica na indução de proliferação e sobrevivência celular (Leong e Karsan, 2000). Apesar de ser descrito como via de sinalização de morte mediada por apoptose (Baxter e col., 1999; Chau e col., 2004) diversos trabalhos já apontaram o papel do TNF-alfa em outras vias de morte celular independentes da ativação de caspase. Por exemplo, já foi demonstrado que TNF-alfa é capaz de induzir morte celular tipo necrose de maneira dependente a inibidores de caspase e de alterações na cadeia respiratória mitocondrial. Isso

aconteceria devido à ação de proteases de caspase que são encontradas nas mitocôndrias e são liberadas quando ocorre a disfunção mitocondrial, sendo este um importante mecanismo na morte celular tipo necrose (Grooten e col., 1993; Vercammen e col., 1998; Li e Beg, 2000).

Sendo assim, em resumo, nossos resultados podem indicar que a disfunção mitocondrial induzida pelo flúor nas células U87 é capaz de ocasionar morte do tipo necrose mediada pelas vias TNF-alfa/NF-kB.

## **6. CONCLUSÃO**

Neste trabalho nós demonstramos pela primeira vez as alterações fisiológicas, bioquímicas e gênicas induzidas pela exposição ao flúor nas células gliais da linhagem U87. Essas células apresentaram-se mais sensíveis quando comparadas com células neuronais da linhagem IMR-32, onde não foram encontrados sinais precoces de toxicidade após a exposição. A análise de expressão gênica nas células U87 indicou a mitocôndria como um importante alvo da toxicidade do flúor, ocasionando alterações de genes que dirigem a síntese de ATP e glutatona, além de ativar as vias de sinalização TNF-alfa/NF-kB levando a morte celular do tipo necrose.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Aardema, M.J e Tsutsui, T. Sodium fluoride-induced chromosome aberrations in different cell cycle stages. *Mutation Research*, 331(1), 171-172, 1995.
2. Abdelwahid E, Rolland S, Teng X, Conradt B, Hardwick JM, White K. Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1813(4):597-607. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.008.
3. Adamek E, Pawłowska-G.ral L, Bober K. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity, *Ann. Acad. Med. Stetin* 51, 69–85, 2005.
4. Agnelli PB. Variação do índice CPOD do Brasil no período de 1980 a 2010. *Rev. bras. odontol.*, Rio de Janeiro, v. 72, n. 1/2, p. 10-5, 2015.
5. Ahmed I, Rafique T, Hasan SK, Khan N, Khan MH, Usmani TH. Correlation of fluoride in drinking water with urine, blood plasma, and serum fluoride levels of people consuming high and low fluoride drinking water in pakistan. *Research report Fluoride* 45(4)384–388,2012
6. Akinrinade ID, Memudu AE, Ogundele OM, Ajetunmobi OI. Interplay of glia activation and oxidative stress formation in fluoride and aluminium exposure. ;22(1):39-48. doi: 10.1016/j.pathophys.2014.12.001, 2015.
7. Andersen ME e Krewski D. Toxicity testing in the 21st century: Bringing the vision to life. *Toxicol. Sci.*, 107, 324–330, 2009.
8. Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*; 31(3):367-73, 2001.
9. Aoba T e Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med.*;13(2):155-70, 2002.
10. Aoyama K e Nakaki T. Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 21021-21044; doi:10.3390/ijms141021021, 2013
11. Arlien-Søborg, Peter Simonsen, Leif. *Chemical Neurotoxic Agents*. 2011.
12. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.*17;76:9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19, 2017.
13. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2003. *Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 2003.

14. Bajt ML, Farhood A, Lemasters JJ, Jaeschke H. Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murinemodel of acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jan;324(1):8-14
15. Balle V, Linthicum FH Jr. HISTOLOGICALLY PROVEN COCHLEAR OTOSCLEROSIS WITH PURE SENSORINEURAL HEARING LOSS. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1984 Mar-Apr;93(2 Pt 1):105-11.1984.
16. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.*;188(2):319-33, 2010
17. Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res.* 2011 Oct;71(2):107-13. doi: 10.1016/j.neures.2011.06.004.
18. Bartos M, Gumilar F, Bras C, Gallegos CE, Giannuzzi L, Cancela LM, Minetti A. Neurobehavioural effects of exposure to fluoride in the earliest stages of rat development. *Physiol Behav.* 2015 Aug 1;147:205-12, 2015
19. Basha PM, Rai P, Begum S. Fluoride toxicity and status of serum thyroid hormones, brain histopathology, and learning memory in rats: a multigenerational assessment. *Biol Trace Elem Res.*;144(1-3):1083-94, 2011.
20. Basha PM, Sujitha NS. Combined impact of exercise and temperature in learning and memory performance of fluoride toxicated rats. *Biol Trace Elem Res* 150(1–3):306–313, 2012
21. Basu N. Applications and implications of neurochemical biomarkers in environmental toxicol. *Environ Toxicol Chem.*;34(1):22-9. doi: 10.1002/etc.2783.2014, 2015.
22. Baxter GT, Kuo RC, Jupp OJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9539-47.
23. Bhatnagar M, Rao P, Sushma J, Bhatnagar R. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian J Exp Biol.*;40(5):546-54, 2002.
24. Blaylock RL. Excitotoxicity: A possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. *Fluoride* 37(4):301-314; 2004.
25. Bolognesi C, Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol Biol.*;1044:191-207. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3\_10, 2013.

26. Bracken MB. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med.* 102(3):120-2. doi: 10.1258/jrsm.2008.08k033.,2008
27. Brauchle E, Thude S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy.*
28. Buzalaf MA e Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.*;22:20-36. doi: 10.1159/000325107, 2011.
29. Buzalaf MA, Salvadori DM, Marques ME, Caroselli EE, Leite AL, Camargo EA, Ribeiro DA. Absence of DNA damage in multiple organs after oral exposure to fluoride in Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol.*;77(5):700-6, 2006.
30. Campos-Pereira FD, Lopes-Aguiar L, Renosto FL, Nogueira GA, Costa EF, Barbieri Pulz R, Silva-Zacarin EC, Oliveira CA, Pigoso AA, Severi-Aguiar GD. Genotoxic effect and rat hepatocyte death occurred after oxidative stress induction and antioxidant gene downregulation caused by long term fluoride exposure. *Chem Biol Interact.* 2017 Feb 25;264:25-33. doi: 10.1016/j.cbi.2017.01.005.
31. Cardoso VE1, Whitford GM, Buzalaf MA. Relationship between daily fluoride intake from diet and the use of dentifrice and human plasma fluoride concentrations. *Arch Oral Biol.* 2006 Jul;51(7):552-7. Epub 2006 Jan 19.
32. Chau BN, Chen TT, Wan YY, DeGregori J, Wang JY. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4438-47.
33. Chen J, Shan KR, Wang YN, Nordberg A, Guan ZZ. Selective decreases of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells exposed to fluoride. *Toxicology*;183:235–42; 2003.
34. Chen Q, Wang Z, Xiong Y, Xue W, Kao X, Gao Y, Muhammad N, Song D. Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis. *J Toxicol Sci*;34(4):399-405, 2009.
35. Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Developmental Fluoride Neurotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*; 120(10): 1362–1368, 2012.
36. Chouhan S, Flora SJS. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data, *Toxicology* 254 (2008) 61–67.

37. Cruz WB e Peixoto CAM. A evolução química das águas subterrâneas de Poços de Caldas – MG. *Revista Brasileira de Geociências*, 21(1):23-33, 1991.
38. Cury JA, Del Fiol FS, Tenuta LM, Rosalen PL. Low-fluoride dentifrice and gastrointestinal fluoride absorption after meals. *J. Dent. Res*; 84 (12): 1133-7, 2005.
39. Cury JA, Tabchoury CPM. Determination of appropriate exposure to fluoride in non-EME countries in the future. *J Appl Oral Sci*; 11(2):83–95, 2003.
40. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv. Dent. Res*; 20 (1): 13-6, 2008.
41. Das TK, Susheela AK, Effect of long-term administration of sodium fluoride on plasma calcium level in relation to intestinal absorption and urinary excretion in rabbits, *Environ. Res.* 62,14–18, 1993.
42. Dharmshaktu, N. A review of the effect of high fluoride content of water on health and environment and the strategy adopted for its prevention and control, with special reference to India. (Thesis). University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, 2013.
43. Didenko VV, Ngo H, Baskin DS. Early necrotic DNA degradation: presence of blunt-ended DNA breaks, 3' and 5' overhangs in apoptosis, but only 5' overhangs in early necrosis. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1571-8.
44. Dos santos MGC e Dos Santos RC. Fluoretação das Águas de Abastecimento Público no Combate à Cárie Dentária. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde.* Volume 15 Número 1 Páginas 75-80, 2011.
45. Downing R, Benning A, Downing F, McHarness R, Richards M, Tomkowitz T. Electrolytic Cells for Production of Fluorine. *Ind. Eng. Chem.* 39 (3), pp 259–262, 1947.
46. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci.* 1999 Jan 15;19(2):562-9.
47. Drummond BK, Curzon ME, Strong M. Estimation of fluoride absorption from swallowed fluoride tooth pastes. *Caries research*, 24: 211–215, 1990
48. Duan Q, Jiao J, Chen X, Wang X. Association between water fluoride and the level of children's intelligence: a dose-response meta-analysis. *Public Health.* 154:87-97. doi: 10.1016/j.puhe.2017.08.013, 2018.
49. Dutta M, Rajak P, Khatun S, Roy S. Toxicity assessment of sodium fluoride in *Drosophila melanogaster* after chronic sub-lethal exposure. *Chemosphere.*;166:255-266. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.112, 2017.

50. Ekwall B. Overview of the Final MEIC Results: II. The In Vitro--In Vivo Evaluation, Including the Selection of a Practical Battery of Cell Tests for Prediction of Acute Lethal Blood Concentrations in Humans. *Toxicol In Vitro*. 1999 Aug-Oct;13(4-5):665-73.
51. Fairbairn e O'Neil. Necrotic dna degradation mimics apoptotic nucleosomal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:171-173, 1995
52. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. Fluoride in drinking-water. London: World Health Organization (WHO); 2006.
53. Flora SJ, Mittal M, Mishra D. Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain, *J. Neurol. Sci.* 285, 198–205, 2009.
54. Frazao P e Narvai PC. Cobertura e vigilância da fluoretacão da agua no Brasil. Municípios com mais de 50mil habitantes. Faculdade de saúde publica da USP, 2017 Doi:10.11606/9788588848252
55. Gad SC, Chengelis CP. Acute Toxicity Testing Perspectives and Horizons. The Telford Press Inc., West Caldwell, pp. 2–4a (318b,156c, 165-167d, 159, 1988.
56. García-Montalvo EA, Reyes-Pérez H, Del Razo LM, Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress, *Toxicology* 26, 75–83, 2009.
57. Garcia-Montalvo EA, Reyes-Prez H, Del Razo LM. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress, *Toxicology* 263;75–83 2009
58. Ghasemi M, Mayasi Y, Hannoun A, Eslami SM, Carandang R. Nitric Oxide and Mitochondrial Function in Neurological Diseases. *Neuroscience*.15;376:48-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.017; 2018.
59. Grandjean P e Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. VOLUME 13, ISSUE 3, P330-338, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3); 2014
60. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* ;66(1):39-63, 2002.
61. Grooten J, Goossens V, Vanhaesebroeck B, Fiers W. Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity *Cytokine*. 1993 Nov;5(6):546-55.
62. Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS, Afshari CA. An overview of toxicogenomics. *Curr. Issues Mol. Biol*, 4, 45–56, 2002.

63. Han H, Du W, Zhou B, Zhang W, Xu G, Niu R, Sun Z. Effects of chronic fluoride exposure on object recognition memory and mRNA expression of SNARE complex in hippocampus of male mice. *Biol Trace Elem Res*;158(1):58-64, 2014.
64. Hayes KR, Bradfield CA. Advances in toxicogenomics. *Chem. Res. Toxicol.*, 18,403–414, 2005.
65. Haynes WM. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 95th Edition, CRC press. p. B-17. Fluoride 41120–41124, 2015
66. Heifetz SB & Horowitz HS. 1984. The amounts of fluoride in current fluoride therapies: safety considerations for children. *Dent. Children, Chicago*,51(4): 257-69
67. Hennon DK, Stookey GK, Muhler JC. Blood and urinary fluoride levels in humans associated with ingestion of sodium fluoride-containing vitamin tablets. *J Dent Res*. 1969 Nov-Dec;48(6):1211-5.
68. Hentschel MA, Huizinga P, van der Velden DL, Wegner I, Bittermann AJ, van der Heijden GJ, Grolman W. Limited evidence for the effect of sodium fluoride on deterioration of hearing loss in patients with otosclerosis: a systematic review of the literature. *Otol Neurotol*. ;35(6):1052-7. doi: 10.1097/MAO.0000000000000310, 2014
69. Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1527-35, 2003
70. Ingle NA, Sirohi R, Kaur N and Siwach A. Salivary fluoride levels after toothbrushing with dentifrices containing different concentrations of fluoride. *J Int Soc Prev Community Dent*. 4(2): 129–132, 2014.
71. Izquierdo-Vega JA, M. Sánchez-Gutiérrez, L.M. Del Razo, Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 230; 352–357, 2008.
72. Jetli R, Raghuvver CV, Mallikarjuna RC. Protective effect of ascorbic acid and Ginkgo biloba against learning and memory deficits caused by fluoride. *Toxicol Ind Health*. 2016 Jan;32(1):183-7. doi: 10.1177/0748233713498460
73. Jiang S, Su J, Yao S, Zhang Y, Cao F, Wang F, Wang H, Li J, Xi S. Fluoride and Arsenic Exposure Impairs Learning and Memory and Decreases mGluR5 Expression in the Hippocampus and Cortex in Rats. *PLoS ONE* 9(4): e96041, 2014

74. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012 Oct 9;4(10):1399-440. doi: 10.3390/nu4101399..
75. Joseph P. Transcriptomics in toxicology. *Food Chem Toxicol*. 109(Pt 1):650-662. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.031, 2017.
76. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik B. Fluoride: a review of use and effects on health. *Mater Sociomed*. 28(2): 133-137, 2016.
77. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells, *J. Dent. Res*. 88,461–465, 2009.
78. Khalil AM, Da'dara AA. The genotoxic and cytotoxic activities of inorganic fluoride in cultured rat bone marrow cells. *Arch Environ Contam Toxicol*.;26(1):60-3, 1994.
79. Kleerekoper M. The role of fluoride in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*.;27(2):441-52, 1998.
80. Kravtsova VV, Kravtsov OV. Inactivation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase from cattle brain by sodium fluoride, *Ukr. Biokhim. Zh*. 76; 39–47, 2004.
81. Kumar S, Lata S, Yadav J, Yadav JP. Relationship between water, urine and serum fluoride and fluorosis in school children of Jhajjar District, Haryana, India. *Appl Water Sci* (2017) 7: 3377. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0492-2>
82. Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, Kim SH, Kim WJ. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts, *Toxicology* 243, 340–347, 2008.
83. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol*. 2000 Oct;15(4):1303-25. doi: 10.14670/HH-15.1303.
84. Li M, Beg AA. Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells. *J Virol*. 2000 Aug;74(16):7470-7.
85. Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride expose on intelligence in children. *Fluoride* 28, 189–192, 1995
86. Li Y, Liang C, Slemenda CW, Ji R, Sun S, Cao J, Emsley CL, Ma F, Wu Y, Ying P, Zhang Y, Gao S, Zhang W, Katz BP, Niu S, Cao S, Johnston CC Jr. Effect of long-term exposure to fluoride in drinking water on risks of bone fractures. *J Bone Miner Res*.;16(5):932-9, 2001.
87. Li YM, Dunipace AJ, Stookey GK. Genotoxic effects of fluoride: a controversial issue. *Mutat Res*.;195(2):127-36, 1988.

88. Li YM, Heerema NA, Dunipace AJ, Stookey GK. Genotoxic effects of fluoride evaluated by sister-chromatid exchange. *Mutat Res.*;192(3):191-201, 1987.
89. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med.* 2014 Jan 30;370(5):455-65. doi: 10.1056/NEJMra1310050
90. Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, Pei JJ. Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride-- a mechanism connected with activating JNK phosphorylation. *Toxicol Lett.* 2011 Jul 28;204(2-3):183-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.04.030.
91. Long YG, Wang Y, Chen J, Jiang S, Nordberg A. Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Neurotoxicol Teratol.*751-7; 2002.
92. Lu Y, Sun ZR, Wu LN, Wang X, Lu W, Liu SS. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride* 33, 74-7, 2000.
93. Malin AJ e Till C. Exposure to fluoridated water and attention deficit hyperactivity disorder prevalence among children and adolescents in the United States: an ecological association. *Environ Health.* 27;14:17. doi: 10.1186/s12940-015-0003-1, 2015
94. Malin AJ, Till C. Exposure to fluoridated water and attention deficit hyperactivity disorder prevalence among children and adolescents in the United States: an ecological association. *Environ Health.* 27;14:17. doi: 10.1186/s12940-015-0003-1, 2015.
95. Maltz M, Wannmacher FF. Fluoretos como medicamentos. In: Wannmacher L. e Cardoso MB. *Farmacologia Clinica Para Dentistas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.181-193, 1999.
96. Manivannan J, Sinha S, Ghosh M, Mukherjee A. Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to sodium fluoride. *Mutat Res.* 18;751(1):59-65. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.11.006, 2013.
97. Mason EF, Rathmell JC. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1813(4):645-54. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.011.
98. McKay FS e Black GV. An investigation of mottled teeth: an endemic developmental imperfection of the enamel of the teeth, heretofore unknown in the literature of dentistry. *Dental Cosmos,* 58:477-484, 1916.
99. McKay FS. Relation of mottled enamel to caries. *Journal of the American Dental Association* 15:1.429-1.437, 1928.
100. Meng Z, Meng H, Cao X. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers at a phosphate fertilizer factory. *Mutat Res.* 334(2):243-6, 1995.

101. Meng Z, Zhang B. Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of workers at a phosphate fertilizer factory. *Mutat Res.* 24;393(3):283-8, 1997.
102. Ministério da Saúde. Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
103. Miranda GHN, Gomes BAQ, Bittencourt LO, Aragão WAB, Nogueira LS, Dionizio AS3, Buzalaf MAR, Monteiro MC, Lima RR. Chronic Exposure to Sodium Fluoride Triggers Oxidative Biochemistry Misbalance in Mice: Effects on Peripheral Blood Circulation. *Oxid Med Cell Longev.*;2018:8379123. doi: 10.1155/2018/8379123, 2018.
104. Morgan KT, Ni H, Brown HR, Yoon L, Qualls CW, Crosby LM, Reynolds R, Gaskill B, Anderson SP et al. Application of cDNA microarray technology to in vitro toxicology and the selection of genes for a real-time RT-PCR-based screen for oxidative stress in Hep-G2 Cells, *Toxicol. Pathol.* 30;435–451, 2002.
105. Mugford CA, Kedderis GL. Sex dependent metabolism of xenobiotics, *Drug Metab. Rev.* 30, 441–498, 1988.
106. Mukherjee RN, Sobels FH. The effects of sodium fluoride and iodoacetamide on mutation induction by x-irradiation in mature spermatozoa of *Drosophila*. *Mutat Res.*;6(2):217-25, 1968.
107. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol*;17:169-77, 1995.
108. Murphy AJ, Hoover JC. Inhibition of the Na,K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase, *J. Biol. Chem.* 267;16700–16995, 1992.
109. Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica*, 19(6):385–93, 2006.
110. Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciência & Saúde Coletiva*, 5(2):381-392, 2000.
111. Niu RY, Sun Z, Cheng Z, Li Z, Wang J. Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, Sep;28(2):254-8, 2009.
112. Niu RY, Sun ZL, Wang JM. Effects of fluoride and lead on locomotor behavior and expression of nissl body in brain of adult rats. *Fluoride* 41(4):276–282, 2008.
113. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.*, 7;81(1):53-62, 1995.

114. North M e Vulp CD. Functional Toxicogenomics: Mechanism-Centered Toxicology. *Int J Mol Sci.*; 11(12): 4796–4813, 2010.
115. Oja SS, Janáky R, Varga V, Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep;37(2-3):299-306. Review.
116. Olive PL, Vikse CM, Vanderbyl S. Increase in the fraction of necrotic, not apoptotic, cells in SiHa xenograft tumours shortly after irradiation. *Radiother Oncol.* 1999 Jan;50(1):113-9.
117. O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, Whelton H, Whitford GM. Fluoride and Oral Health. *Community Dent Health*; 33(2):69-99, 2016.
118. Organização Mundial da Saúde. Air Quality Guidelines - Second Edition. Chapter 6.5 Fluorides. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000.
119. Orren DK, Petersen LN, Bohr VA. Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Mol Biol Cell*;8(6):1129-42, 1997.
120. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2011 Jan;119(1):3-19. doi: 10.1093/toxsci/kfq268
121. Pennie WD, Tugwood JD, Gerry J. Oliver A, Kimber I. The Principles and Practice of Toxicogenomics: Applications and Opportunities. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 54, 277–283, 2000.
122. Pereira M, Dombrowski PA, Losso EM, Chioca LR, Da Cunha C, Andreatini R. Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. *Neurotox Res*;19(1):55-62, 2011
123. Pitt P and Berry H. Fluoride treatment in osteoporosis. *Postgrad Med J.* Apr;67(786):323-6, 1991.
124. Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S, Ranjan M. Differential in vivo genotoxic effect of lower and higher concentrations of fluoride in mouse bone marrow cells. *Fluoride* 41(4):290-296,2009.
125. Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S, Ray MR, Chakraborty A. Fluoride-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells: effect of buthionine sulfoximine and N-acetyl-L-cysteine. *J Appl Toxicol*;31(7):618-25, 2011a.
126. Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S. Reduction in fluoride-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells after substituting high fluoride-containing water with safe drinking water. *J Appl Toxicol.*;31(7):703-5. doi: 10.1002/jat.1644, 2011b.

127. Prystupa J. Fluorine - A current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(2): 103–170, 2011.
128. Qian W, Miao K, Li T. Effect of selenium on fluoride-induced changes in synaptic plasticity in rat hippocampus. *Biol Trace Elem Res* 155(2):253–260, 2013.
129. Ramires I, Buzalaf MA. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária – cinquenta anos no Brasil. *Ciência e saúde coletiva*, 12(4): 1057- 1065, 2007.
130. Ribeiro DA, Marques ME, de Assis GF, Anzai A, Poleti ML, Salvadori DM. No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats. *Caries Res.*;38(6):576-9, 2004.
131. Ribeiro DA, Yujra VQ, da Silva VHP, Claudio SR, Estadella D, de Barros Viana M, Oshima CTF. Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res Int.*;24(18):15254-15259. doi: 10.1007/s11356-017-9105-3, 2017.
132. Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, Chao EY, Wahner HW, Muhs JM, Cedel SL, Melton LJ. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 22;322(12):802-9, 1990.
133. Saha A, Mukherjee AK, Ravichandran B. Musculoskeletal problems and fluoride exposure: A cross sectional study among metal smelting workers. *Toxicol Ind Health.* 2016 Sep;32(9):1581-8. doi: 10.1177/0748233714568477
134. SARRI, E.; CLARO, E. Fluoride-induced depletion of polyphosphoinositides in rat brain cortical slices: a rationale for the inhibitory effects on phospholipase C. *Int J Dev Neurosci*, v.17, n.4, p.357-67, 1999.
135. Schrattenholz A, Šoškić V, Schöpf R, Poznanović S, Klemm-Manns M, Groebe K. Protein biomarkers for in vitro testing of toxicology. *Mutat Res.* ;746(2):113-23. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.02.008, 2012
136. Sener Y, Tosun G, Kahvecioglu F, Gökalp A, Koç H. Fluoride levels of human plasma and breast milk. *Eur J Dent.* 2007 Jan;1(1):21-4.
137. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med.* 15;4:2. doi: 10.1186/1747-5341-4-2, 2009.
138. Shelly CL. GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May ; 1830(5): 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008, 2013

139. Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna BP, Rao SH. Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis, *Fluoride* 34, 108–113, 2001.
140. Shuhua X, Ziyou L, Ling, Wang YF, Sun G. A Role of Fluoride on Free Radical Generation and Oxidative Stress in BV-2 Microglia Cells. *Mediators of Inflammation*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/102954>, 2012.
141. Singh S, Singhal NK, Srivastava G, Singh MP. Omics in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Mech Methods*. 20(7):355-62. doi: 10.3109/15376510903559976, 2010.
142. Sireli M, A. Bülbül, The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28, 591–595, 2004
143. Smeyne M e Smeyne RJ. Glutathione Metabolism and Parkinson's Disease. *Free Radic Biol Med*. 2013 September ; 62: 13–25. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001, 2013.
144. Smith GE. Genotoxic effects of fluoride. *Mutat Res.*;241(3):339-40, 1990.
145. Song GH, Huang FB, Gao JP, Liu ML, Pang WB, Li Wb, Yan XY, Huo MJ, Yang X. Effects of Fluoride on DNA Damage and Caspase-Mediated Apoptosis in the Liver of Rats. *Biol Trace Elem Res*;166(2):173-82. doi: 10.1007/s12011-015-0265-z, 2015.
146. Spittle B. Psychopharmacology of fluoride: a review. *Int Clin Psychopharmacol*;9(2):79-82, 1994.
147. Sun Z, Zhang Y, Xue X, Niu R, Wang J. Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Hum Exp Toxicol*. 2018 Jan;37(1):87-93. doi: 10.1177/0960327117693067.
148. Swenberg JA<sup>1</sup>, Fryar-Tita E, Jeong YC, Boysen G, Starr T, Walker VE, Albertini RJ. Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chem Res Toxicol.*;21(1):253-65, 2008
149. Tabuchi Y, Yunoki T, Hoshi N, Suzuki N, Kondo T. Genes and gene networks involved in sodium fluoride-elicited cell death accompanying endoplasmic reticulum stress in oral epithelial cells. *Int J Mol Sci*. 2014 May 20;15(5):8959-78. doi: 10.3390/ijms15058959.
150. Tan PP, Zhou BH, Zhao WP, Jia LS, Liu J, Wang HW. Mitochondria-Mediated Pathway Regulates C2C12 Cell Apoptosis Induced by Fluoride. *Biol Trace Elem Res*. 2018 Oct;185(2):440-447. doi: 10.1007/s12011-018-1265-6.

151. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019 May;29(5):347-364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
152. Tsutsui T, Suzuki N, Ohmori M, Maizumi H. Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblasts induced by sodium fluoride. *Mutational Research*, 139(4), 193-198, 1984.
153. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumornecrosis factor. *J Exp Med.* 1998 May 4;187(9):1477-85.
154. Verma A, Ali D, Pathak AK. Fluoride induces DNA damage and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicological & Environmental Chemistry Volume 99*, <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1155380>, 2016.
155. Wang Y, Zhang X, Zhao Z, Xu H. Preliminary Analysis of MicroRNAs Expression Profiling in MC3T3-E1 Cells Exposed to Fluoride. *Biol Trace Elem Res.* 2017 Apr;176(2):367-373. doi: 10.1007/s12011-016-0833-x.
156. Waters MD, Fostel JM. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet.* 5(12):936, 2004.
157. Wei Y, Zeng B, Zhang H, Chen C, Wu Y, Wang N, Wu Y, Zhao D, Zhao Y, Iqbal J, Shen L. Comparative proteomic analysis of fluoride treated rat bone provides new insights into the molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Toxicol Lett.* 2018 Jul;291:39-50. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.04.006.
158. Wetmore BA e Merrick BA. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol Pathol.* 32(6):619-42, 2004.
159. Whitford GM, Sampaio FC, Pinto CS, Maria AG, Cardoso VE, Buzalaf MA. Pharmacokinetics of ingested fluoride: lack of effect of chemical compound. *Arch Oral Biol.*;53(11):1037-41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.04.001, 2008.
160. Whitford GM, Taves DR. Fluoride-induced diuresis: Plasma concentrations in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 137:458-460, 1971.
161. Whitford GM. Acute toxicity of ingested fluoride. *Monogr Oral Sci.*;22:66-80. doi: 10.1159/000325146, 2011.

162. Whitford GM. Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res*, v71, n.5, p.1249-54, 1992.
163. Whitford GM. Determinants and mechanisms of enamel fluorosis. *Ciba Foundation Symposium*, 205, 226–241, 1997.
164. Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res*, v.69, p.539-49, 1990.
165. Wurtz T1, Houari S, Mauro N, MacDougall M, Peters H, Berdal A. Fluoride at non-toxic dose affects odontoblast gene expression in vitro. *Toxicology*. 2008 Jul 10;249(1):26-34. doi: 10.1016/j.tox.2008.04.013.
166. Xu H, Zhou YL, Zhang JM, Liu H, Jing L, Li GS. Effects of fluoride on the intracellular free Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPase of kidney. *Biol Trace Elem Res*. 2007 Jun;116(3):279-88.
167. Yan L, Liu S, Wang C, Wang F, Song Y, Yan N, Xi S, Liu Z, Sun G. JNK and NADPH oxidase involved in fluoride-induced oxidative stress in BV-2 microglia cells. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:895975. doi: 10.1155/2013/895975.
168. Yu-Huan H. e Si-Shung W. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*;51:1591-1593, 1988
169. Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, Chen X, Yang K. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*;236(3):208-16, 2007.
170. Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, Chen X, Yang K. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons, *Toxicology* 236 208–216, 2007.
171. Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*;179(1):1-5, 2008
172. Zhu YP, Xi SH, Li MY, Ding TT, Liu N, Cao FY, Zeng Y, Liu XJ, Tong JW, Jiang SF. Fluoride and arsenic exposure affects spatial memory and activates the ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *Neurotoxicology*. 2017 Mar;59:56-64. doi: 10.1016/j.neuro.2017.01.006

## 8. APENDICE

Apendice 1. Genes diferencialmente expressos exclusivamente apos exposiçao a 0,095 µg/mL de fluoreto

GeneSymbol	Description	GeneName
<b>0,095µg/mL Down-regulated</b>		
AMMECR1L	Homo sapiens AMMECR1-like (AMMECR1L), transcript variant 1, mRNA [NM_031445]	AMMECR1-like
ANKRD18DP	Homo sapiens ankyrin repeat domain 18D, pseudogene (ANKRD18DP), non-coding RNA [NR_003291]	ankyrin repeat domain 18D, pseudogene
PTDSS1	Homo sapiens phosphatidylserine synthase 1 (PTDSS1), transcript variant 1, mRNA [NM_014754]	phosphatidylserine synthase 1
ABLIM3	Homo sapiens actin binding LIM protein family, member 3 (ABLIM3), transcript variant 2, mRNA [NM_014945]	actin binding LIM protein family, member 3
POLR1B	Homo sapiens polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa (POLR1B), transcript variant 1, mRNA [NM_019014]	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa
LINC01019	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1019 (LINC01019), long non-coding RNA [NR_033898]	long intergenic non-protein coding RNA 1019
HIP1R	Homo sapiens huntingtin interacting protein 1 related (HIP1R), transcript variant 1, mRNA [NM_003959]	huntingtin interacting protein 1 related
YIPF3	Yip1 domain family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21023] [ENST00000372417]	Yip1 domain family, member 3
DCHS1	Homo sapiens dachsous cadherin-related 1 (DCHS1), mRNA [NM_003737]	dachsous cadherin-related 1
lnc-FBXO25-4	LNCipedia lincRNA (lnc-FBXO25-4), lincRNA [lnc-FBXO25-4:1]	lnc-FBXO25-4:1
ABHD17A	Homo sapiens abhydrolase domain containing 17A (ABHD17A), transcript variant 1, mRNA [NM_031213]	abhydrolase domain containing 17 <sup>a</sup>
FSTL3	Homo sapiens follistatin-like 3 (secreted glycoprotein) (FSTL3), mRNA [NM_005860]	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)
DUSP22	Homo sapiens dual specificity phosphatase 22 (DUSP22), transcript variant 2, mRNA [NM_020185]	dual specificity phosphatase 22
WIPF1	Homo sapiens WAS/WASL interacting protein family, member 1 (WIPF1), transcript variant 2, mRNA [NM_001077269]	WAS/WASL interacting protein family, member 1
C9orf114	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 114 (C9orf114), mRNA [NM_016390]	chromosome 9 open reading frame 114
FAHD2A	Homo sapiens fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A (FAHD2A), mRNA [NM_016044]	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A
AP2A2	Homo sapiens adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit (AP2A2), transcript variant 2, mRNA [NM_012305]	adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit
GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A), transcript variant 1, mRNA [NM_001924]	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha

ARRDC1	Homo sapiens arrestin domain containing 1 (ARRDC1), mRNA [NM_152285]	arrestin domain containing 1
HPD	Homo sapiens 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD), transcript variant 1, mRNA [NM_002150]	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
NPIPB5	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B5 (NPIPB5), mRNA [NM_001135865]	nuclear pore complex interacting protein family, member B5
POLL	Homo sapiens polymerase (DNA directed), lambda (POLL), transcript variant 1, mRNA [NM_001174084]	polymerase (DNA directed), lambda
SURF6	Homo sapiens surfeit 6 (SURF6), transcript variant 1, mRNA [NM_006753]	surfeit 6
CSPG4P8	chondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:48359] [ENST00000612093]	-
CHCHD4P4	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4 pseudogene 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:44492] [ENST00000437690]	-
MTMR3	Homo sapiens myotubularin related protein 3 (MTMR3), transcript variant 3, mRNA [NM_021090]	myotubularin related protein 3
MFAP3L	microfibrillar-associated protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7034] [ENST00000520327]	-
NPIPB15	nuclear pore complex interacting protein family, member B15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:34409] [ENST00000429990]	nuclear pore complex interacting protein family, member B15
lnc-ST3GAL1-1	LNCipedia lincRNA (lnc-ST3GAL1-1), lincRNA [lnc-ST3GAL1-1:1]	lnc-ST3GAL1-1:1
DUX4	Homo sapiens double homeobox 4 (DUX4), mRNA [NM_001293798]	double homeobox 4
CDK5RAP1	Homo sapiens CDK5 regulatory subunit associated protein 1 (CDK5RAP1), transcript variant 2, mRNA [NM_016082]	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
SLC25A6	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 (SLC25A6), mRNA [NM_001636]	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6
SLFN1	Homo sapiens schlafen-like 1 (SLFN1), transcript variant 1, mRNA [NM_144990]	schlafen-like 1
SLC7A11	Homo sapiens solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11 (SLC7A11), mRNA [NM_014331]	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11
FXYP5	FXYP domain containing ion transport regulator 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4029] [ENST00000392218]	FXYP domain containing ion transport regulator 5
ADAM19	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 19 (ADAM19), mRNA [NM_033274]	ADAM metallopeptidase domain 19
CTNBL1	Homo sapiens catenin, beta like 1 (CTNBL1), transcript variant 1, mRNA [NM_030877]	catenin, beta like 1
lnc-SLC12A8-1	Q4RES2_TETNG (Q4RES2) Chromosome 13 SCAF15122, whole genome shotgun sequence, partial (10%) [THC2639066]	lnc-SLC12A8-1:1

CORO7	Homo sapiens coronin 7 (CORO7), transcript variant 1, mRNA [NM_024535]	coronin 7
NUP214	Homo sapiens nucleoporin 214kDa (NUP214), mRNA [NM_005085]	nucleoporin 214kDa
NOL6	Homo sapiens nucleolar protein 6 (RNA-associated) (NOL6), transcript variant alpha, mRNA [NM_022917]	nucleolar protein 6 (RNA-associated)
SARS	Homo sapiens seryl-tRNA synthetase (SARS), transcript variant 1, mRNA [NM_006513]	seryl-tRNA synthetase
GGT1	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1), transcript variant 6, mRNA [NM_001288833]	gamma-glutamyltransferase 1
GAR1	Homo sapiens GAR1 ribonucleoprotein (GAR1), transcript variant 1, mRNA [NM_018983]	GAR1 ribonucleoprotein
lnc-MTR-1	LNCipedia lincRNA (lnc-MTR-1), lincRNA [lnc-MTR-1:1]	lnc-MTR-1:1
lnc-RSPH1-4	LNCipedia lincRNA (lnc-RSPH1-4), lincRNA [lnc-RSPH1-4:1]	lnc-RSPH1-4:1
URGCP	Homo sapiens upregulator of cell proliferation (URGCP), transcript variant 2, mRNA [NM_001077664]	upregulator of cell proliferation
<b>0,095 Up-regulated</b>		
SUMF2	Homo sapiens sulfatase modifying factor 2 (SUMF2), transcript variant 2, mRNA [NM_015411]	sulfatase modifying factor 2
LOC101927070	Homo sapiens uncharacterized LOC101927070 (LOC101927070), long non-coding RNA [NR_126337]	uncharacterized LOC101927070
IGF2R	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), mRNA [NM_000876]	insulin-like growth factor 2 receptor
CAB39	Homo sapiens calcium binding protein 39 (CAB39), transcript variant 1, mRNA [NM_016289]	calcium binding protein 39
ADAM5	Homo sapiens ADAM metalloproteinase domain 5 (pseudogene) (ADAM5), non-coding RNA [NR_001448]	ADAM metalloproteinase domain 5 (pseudogene)
lnc-GNG11-2	LNCipedia lincRNA (lnc-GNG11-2), lincRNA [lnc-GNG11-2:2]	lnc-GNG11-2:2
LOC101928499	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101928499 (LOC101928499), ncRNA [XR_248132]	uncharacterized LOC101928499
RNF150	Homo sapiens ring finger protein 150 (RNF150), mRNA [NM_020724]	ring finger protein 150
lnc-SLC12A7-1	LNCipedia lincRNA (lnc-SLC12A7-1), lincRNA [lnc-SLC12A7-1:1]	lnc-SLC12A7-1:1
LOC101930634	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101930634 (LOC101930634), ncRNA [XR_248595]	uncharacterized LOC101930634
CFAP46	Homo sapiens cilia and flagella associated protein 46 (CFAP46), mRNA [NM_001200049]	cilia and flagella associated protein 46
DAB1	Dab, reelin signal transducer, homolog 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2661] [ENST00000371230]	Dab, reelin signal transducer, homolog 1 (Drosophila)
RAP2C	Homo sapiens RAP2C, member of RAS oncogene family (RAP2C), transcript variant 2, mRNA [NM_021183]	RAP2C, member of RAS oncogene family
lnc-NDFIP2-3	LNCipedia lincRNA (lnc-NDFIP2-3), lincRNA [lnc-	lnc-NDFIP2-3:1

	NDFIP2-3:1]	
PPIB	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (PPIB), mRNA [NM_000942]	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
lnc-AL591845.1-2	LNCipedia lincRNA (lnc-AL591845.1-2), lincRNA [lnc-AL591845.1-2:2]	lnc-AL591845.1-2:2
SMAP2	Homo sapiens small ArfGAP2 (SMAP2), transcript variant 1, mRNA [NM_022733]	small ArfGAP2
C6orf89	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 89 (C6orf89), transcript variant 1, mRNA [NM_152734]	chromosome 6 open reading frame 89
MIR670HG	PREDICTED: Homo sapiens MIR670 host gene (non-protein coding) (MIR670HG), transcript variant X1, ncRNA [XR_109044]	MIR670 host gene (non-protein coding)
lnc-TRIM29-1	LNCipedia lincRNA (lnc-TRIM29-1), lincRNA [lnc-TRIM29-1:2]	lnc-TRIM29-1:2
P4HA1	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I (P4HA1), transcript variant 3, mRNA [NM_001142595]	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I
NSUN6	Homo sapiens NOP2/Sun domain family, member 6 (NSUN6), mRNA [NM_182543]	NOP2/Sun domain family, member 6
XLOC_12_011001	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_011001), lincRNA [TCONS_12_00020967]	
WRB	Homo sapiens tryptophan rich basic protein (WRB), transcript variant 1, mRNA [NM_004627]	tryptophan rich basic protein
CCDC63	Homo sapiens coiled-coil domain containing 63 (CCDC63), transcript variant 1, mRNA [NM_152591]	coiled-coil domain containing 63
SUMO2	SUMO2 pseudogene 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:39018] [ENST00000434672]	
RIMKLB	Homo sapiens ribosomal modification protein rimK-like family member B (RIMKLB), transcript variant 1, mRNA [NM_020734]	ribosomal modification protein rimK-like family member B
OXTR	Homo sapiens oxytocin receptor (OXTR), mRNA [NM_000916]	oxytocin receptor
Desconhecido	BX117672 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGp998N024171, mRNA sequence [BX117672]	
NPEPPS	Homo sapiens aminopeptidase puromycin sensitive (NPEPPS), mRNA [NM_006310]	aminopeptidase puromycin sensitive
ITFG1	Homo sapiens integrin alpha FG-GAP repeat containing 1 (ITFG1), mRNA [NM_030790]	integrin alpha FG-GAP repeat containing 1
DHFRL1	Homo sapiens dihydrofolate reductase-like 1 (DHFRL1), transcript variant 2, mRNA [NM_176815]	dihydrofolate reductase-like 1
FAM169A	Homo sapiens family with sequence similarity 169, member A (FAM169A), transcript variant 1, mRNA [NM_015566]	family with sequence similarity 169, member A
lnc-ERP44-3	LNCipedia lincRNA (lnc-ERP44-3), lincRNA [lnc-ERP44-3:5]	lnc-ERP44-3:5
-	DB526434 RIKEN full-length enriched human cDNA library, testis Homo sapiens cDNA clone H013092G21 3', mRNA sequence [DB526434]	
HIST1H4F	Homo sapiens histone cluster 1, H4f (HIST1H4F), mRNA [NM_003540]	histone cluster 1, H4f
TNFAIP3	XM_853289 tumor necrosis factor alpha isoform 3 {Canis familiaris} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (5%)	

	[THC2701640]	
LOC102724785	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC102724785 (LOC102724785), transcript variant X1, ncRNA [XR_425793]	uncharacterized LOC102724785
ZBPB	zona pellucida binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15662] [ENST00000465922]	zona pellucida binding protein
PLGLB1	Homo sapiens plasminogen-like B1 (PLGLB1), mRNA [NM_001032392]	plasminogen-like B1
Desconhecido	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC100507486 (LOC100507486), misc_RNA [XR_109525]	
CTCFL	Homo sapiens CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like (CTCFL), transcript variant 2, mRNA [NM_080618]	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like
SNTG1	Homo sapiens syntrophin, gamma 1 (SNTG1), transcript variant 1, mRNA [NM_018967]	syntrophin, gamma 1
ANGPT4	Homo sapiens angiotensinogen 4 (ANGPT4), mRNA [NM_015985]	angiotensinogen 4
LOC101929019	Desconhecido	uncharacterized LOC101929019
lnc-FAM120AOS-2	LNCipedia lincRNA (lnc-FAM120AOS-2), lincRNA [lnc-FAM120AOS-2:1]	lnc-FAM120AOS-2:1
LOC101929584	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101929584 (RP11-319E16.1), transcript variant X4, ncRNA [XR_424301]	uncharacterized LOC101929584
MLNR	Homo sapiens motilin receptor (MLNR), mRNA [NM_001507]	motilin receptor
LAMTOR2	Homo sapiens late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2 (LAMTOR2), transcript variant 1, mRNA [NM_014017]	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2
DLGAP1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2905] [ENST00000581550]	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1
PLEK	Homo sapiens pleckstrin (PLEK), mRNA [NM_002664]	Pleckstrin
LOC101929572	Homo sapiens uncharacterized LOC101929572 (LOC101929572), long non-coding RNA [NR_110504]	uncharacterized LOC101929572
FLJ36000	Homo sapiens uncharacterized FLJ36000 (FLJ36000), long non-coding RNA [NR_027084]	uncharacterized FLJ36000
LOC100506136	Homo sapiens uncharacterized LOC100506136 (LOC100506136), long non-coding RNA [NR_038948]	uncharacterized LOC100506136
lnc-MTHFSD-3	LNCipedia lincRNA (lnc-MTHFSD-3), lincRNA [lnc-MTHFSD-3:1]	lnc-MTHFSD-3:1
SEC22B	Homo sapiens SEC22 vesicle trafficking protein homolog B (S. cerevisiae) (gene/pseudogene) (SEC22B), mRNA [NM_004892]	SEC22 vesicle trafficking protein homolog B (S. cerevisiae) (gene/pseudogene)
CMAHP	Homo sapiens cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene (CMAHP), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_002174]	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene

lnc-SPTLC3-2	LNCipedia lincRNA (lnc-SPTLC3-2), lincRNA [lnc-SPTLC3-2:1]	lnc-SPTLC3-2:1
SNRNP40	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein 40kDa (U5) (SNRNP40), mRNA [NM_004814]	small nuclear ribonucleoprotein 40kDa (U5)
ZNF891	Homo sapiens zinc finger protein 891 (ZNF891), mRNA [NM_001277291]	zinc finger protein 891
CDC42P2	cell division cycle 42 pseudogene 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33952] [ENST00000448566]	
FLJ32154	Homo sapiens cDNA FLJ32154 fis, clone PLACE600070. [AK056716]	uncharacterized protein FLJ32154
LOC100509445	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686C0338 (from clone DKFZp686C0338). [CR749395]	uncharacterized LOC100509445
ZNF878	Homo sapiens zinc finger protein 878 (ZNF878), mRNA [NM_001080404]	zinc finger protein 878
COQ10B	Homo sapiens coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae) (COQ10B), mRNA [NM_025147]	coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)
HHATL	Homo sapiens hedgehog acyltransferase-like (HHATL), transcript variant 1, mRNA [NM_020707]	hedgehog acyltransferase-like
PLS3	Homo sapiens plastin 3 (PLS3), transcript variant 1, mRNA [NM_005032]	plastin 3
ZNF429	Homo sapiens zinc finger protein 429 (ZNF429), mRNA [NM_001001415]	zinc finger protein 429
AQP7	Homo sapiens aquaporin 7 (AQP7), mRNA [NM_001170]	aquaporin 7
lnc-PRDM15-1	LNCipedia lincRNA (lnc-PRDM15-1), lincRNA [lnc-PRDM15-1:1]	lnc-PRDM15-1:1
LOC100505784	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC100505784 (LOC100505784), ncRNA [XR_109853]	uncharacterized LOC100505784
LOC102723473	Homo sapiens cDNA FLJ33910 fis, clone CTONG2008562. [AK091229]	uncharacterized LOC102723473
lnc-OGFRL1-3	LNCipedia lincRNA (lnc-OGFRL1-3), lincRNA [lnc-OGFRL1-3:1]	lnc-OGFRL1-3:1
PKIG	Homo sapiens protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma (PKIG), transcript variant 1, mRNA [NM_181805]	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma
HAPLN3	Homo sapiens hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (HAPLN3), mRNA [NM_178232]	hyaluronan and proteoglycan link protein 3
NR2F1-AS1	Homo sapiens NR2F1 antisense RNA 1 (NR2F1-AS1), transcript variant 4, long non-coding RNA [NR_109818]	NR2F1 antisense RNA 1
ICE2	Homo sapiens interactor of little elongation complex ELL subunit 2 (ICE2), transcript variant 1, mRNA [NM_024611]	interactor of little elongation complex ELL subunit 2
CNOT7	Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 7 (CNOT7), transcript variant 2, mRNA [NM_054026]	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7
Desconhecido	AGENCOURT_10197749 NIH_MGC_126 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6559929 5', mRNA sequence [BU533525]	

Apêndice 2. Genes diferencialmente expressos exclusivamente após a exposição a 0.22 µg/mL de fluoreto

GeneSymbol	Description	GeneName
<b>0,22µ/mL Down-regulated</b>		
PSMB7	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7 (PSMB7), mRNA [NM_002799]	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7
RPL5P18	ribosomal protein L5 pseudogene 18 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36640] [ENST00000406671]	-
Desconhecido	Unknown	-
Desconhecido	Unknown	-
OGFOD1	Homo sapiens 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1 (OGFOD1), mRNA [NM_018233]	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1
NDUFB11	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17.3kDa (NDUFB11), transcript variant 1, mRNA [NM_019056]	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17.3kDa
DGKQ	Homo sapiens diacylglycerol kinase, theta 110kDa (DGKQ), mRNA [NM_001347]	diacylglycerol kinase, theta 110kDa
Desconhecido	ribosomal protein L15 pseudogene 20 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36130] [ENST00000482912]	-
TGFB1	Homo sapiens transforming growth factor, beta 1 (TGFB1), mRNA [NM_000660]	transforming growth factor, beta 1
C11orf84	Homo sapiens chromosome 11 open reading frame 84 (C11orf84), mRNA [NM_138471]	chromosome 11 open reading frame 84
Desconhecido	Unknown	-
LOC645553	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC645553 (AC006262.5), misc_RNA [XR_244001]	uncharacterized LOC645553
SMIM13	Homo sapiens small integral membrane protein 13 (SMIM13), mRNA [NM_001135575]	small integral membrane protein 13
MOB2	Homo sapiens MOB kinase activator 2 (MOB2), transcript variant 2, mRNA [NM_053005]	MOB kinase activator 2
UBIAD1	Homo sapiens UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1), mRNA [NM_013319]	UbiA prenyltransferase domain containing 1
SLC9A4	Homo sapiens solute carrier family 9, subfamily A (NHE4, cation proton antiporter 4), member 4 (SLC9A4), mRNA [NM_001011552]	solute carrier family 9, subfamily A (NHE4, cation proton antiporter 4), member 4
DDX23	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23 (DDX23), mRNA [NM_004818]	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23
EIF3M	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M (EIF3M), mRNA [NM_006360]	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M
ENO3	Homo sapiens enolase 3 (beta, muscle) (ENO3), transcript variant 1, mRNA [NM_001976]	enolase 3 (beta, muscle)
LINC01572		long intergenic non-protein coding RNA 1572
C5orf60	chromosome 5 open reading frame 60 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27753] [ENST00000511063]	-
LOC100505978	Homo sapiens uncharacterized LOC100505978 (LOC100505978), long non-coding RNA [NR_038912]	uncharacterized LOC100505978
SLC35A2	Homo sapiens solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2 (SLC35A2), transcript variant 1, mRNA [NM_005660]	solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2

HGFAC	Homo sapiens HGF activator (HGFAC), transcript variant 1, mRNA [NM_001297439]	HGF activator
SPECC1L	Homo sapiens sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1-like (SPECC1L), transcript variant 1, mRNA [NM_015330]	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1-like
TOR1AIP1	Homo sapiens torsin A interacting protein 1 (TOR1AIP1), transcript variant 2, mRNA [NM_015602]	torsin A interacting protein 1
CEBPZ	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta (CEBPZ), mRNA [NM_005760]	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta
PIEZO1	Homo sapiens piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (PIEZO1), mRNA [NM_001142864]	piezo-type mechanosensitive ion channel component 1
RPL23AP46	ribosomal protein L23a pseudogene 46 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:35894] [ENST00000438548]	
ASB13	Homo sapiens ankyrin repeat and SOCS box containing 13 (ASB13), transcript variant 1, mRNA [NM_024701]	ankyrin repeat and SOCS box containing 13
lnc-LPA-1	LNCipedia lincRNA (lnc-LPA-1), lincRNA [lnc-LPA-1:1]	lnc-LPA-1:1
PMM2	Homo sapiens phosphomannomutase 2 (PMM2), mRNA [NM_000303]	phosphomannomutase 2
RPL23A	Homo sapiens ribosomal protein L23a (RPL23A), mRNA [NM_000984]	ribosomal protein L23a
ACD	Homo sapiens adrenocortical dysplasia homolog (mouse) (ACD), transcript variant 1, mRNA [NM_001082486]	adrenocortical dysplasia homolog (mouse)
RPL7AP60	ribosomal protein L7a pseudogene 60 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:35859] [ENST00000469026]	
EEF1G	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (EEF1G), mRNA [NM_001404]	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
KDM4D	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 4D (KDM4D), mRNA [NM_018039]	lysine (K)-specific demethylase 4D
HIC2	Homo sapiens hypermethylated in cancer 2 (HIC2), mRNA [NM_015094]	hypermethylated in cancer 2
GAS6	Q6IMN1_HUMAN (Q6IMN1) Growth arrest-specific 6, partial (6%) [THC2779442]	
RPS29	Homo sapiens ribosomal protein S29 (RPS29), transcript variant 1, mRNA [NM_001032]	ribosomal protein S29
PPDPF	Homo sapiens pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor (PPDPF), mRNA [NM_024299]	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor
PLEKHG5	Homo sapiens pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5 (PLEKHG5), transcript variant 2, mRNA [NM_198681]	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5
BAD	Homo sapiens BCL2-associated agonist of cell death (BAD), transcript variant 1, mRNA [NM_004322]	BCL2-associated agonist of cell death
VPS51	Homo sapiens vacuolar protein sorting 51 homolog (S. cerevisiae) (VPS51), transcript variant 1, mRNA [NM_013265]	vacuolar protein sorting 51 homolog (S. cerevisiae)
FAM189B	Homo sapiens family with sequence similarity 189, member B (FAM189B), transcript variant 1, mRNA [NM_006589]	family with sequence similarity 189, member B
POLR3C	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C (62kD) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30076] [ENST00000334163]	
XLOC_12_009539	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_009539), lincRNA [TCONS_12_00018033]	
NDUFV3	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa (NDUFV3), transcript variant 1, mRNA [NM_021075]	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa

KLHL18	Homo sapiens kelch-like family member 18 (KLHL18), mRNA [NM_025010]	kelch-like family member 18
RNF126	Homo sapiens ring finger protein 126 (RNF126), mRNA [NM_194460]	ring finger protein 126
CSE1L	Homo sapiens CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast) (CSE1L), transcript variant 1, mRNA [NM_001316]	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
Desconhecido	Unknown	
PABPC3	Homo sapiens poly(A) binding protein, cytoplasmic 3 (PABPC3), mRNA [NM_030979]	poly(A) binding protein, cytoplasmic 3
MUC4	Homo sapiens mucin 4, cell surface associated (MUC4), transcript variant 1, mRNA [NM_018406]	mucin 4, cell surface associated
GOLGA6L7P	golgin A6 family-like 7, pseudogene [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:37442] [ENST00000567390]	golgin A6 family-like 7, pseudogene
ZNF79	Homo sapiens zinc finger protein 79 (ZNF79), transcript variant 1, mRNA [NM_007135]	zinc finger protein 79
RAB7A	Homo sapiens RAB7A, member RAS oncogene family (RAB7A), mRNA [NM_004637]	RAB7A, member RAS oncogene family
LOC100505942	Homo sapiens uncharacterized LOC100505942 (LOC100505942), long non-coding RNA [NR_104656]	uncharacterized LOC100505942
ITK	Homo sapiens IL2-inducible T-cell kinase (ITK), mRNA [NM_005546]	IL2-inducible T-cell kinase
RHBDD2	Homo sapiens rhomboid domain containing 2 (RHBDD2), transcript variant 2, mRNA [NM_001040457]	rhomboid domain containing 2
RPL23A	Homo sapiens ribosomal protein L23a (RPL23A), mRNA [NM_000984]	ribosomal protein L23a
APBB1IP	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein (APBB1IP), mRNA [NM_019043]	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein
DHX8	Homo sapiens DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8 (DHX8), transcript variant 1, mRNA [NM_004941]	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8
DNLZ	Homo sapiens DNL-type zinc finger (DNLZ), transcript variant 1, mRNA [NM_001080849]	DNL-type zinc finger
MRPS21	mitochondrial ribosomal protein S21 pseudogene 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29753] [ENST00000415184]	
DEFB4A	Homo sapiens defensin, beta 4A (DEFB4A), mRNA [NM_004942]	defensin, beta 4A
MAPKAP1	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase associated protein 1 (MAPKAP1), transcript variant 6, mRNA [NM_001006618]	mitogen-activated protein kinase associated protein 1
CCDC12	Homo sapiens coiled-coil domain containing 12 (CCDC12), transcript variant 1, mRNA [NM_144716]	coiled-coil domain containing 12
MTMR14	Homo sapiens myotubularin related protein 14 (MTMR14), transcript variant 1, mRNA [NM_001077526]	myotubularin related protein 14
ZNF525	Homo sapiens zinc finger protein 525 (ZNF525), non-coding RNA [NR_003699]	zinc finger protein 525
RPSAP58	Homo sapiens ribosomal protein SA pseudogene 58 (RPSAP58), non-coding RNA [NR_003662]	ribosomal protein SA pseudogene 58
MRPS21	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein S21 (MRPS21), transcript variant 1, mRNA [NM_031901]	mitochondrial ribosomal protein S21
HIGD2A	Homo sapiens HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A (HIGD2A), mRNA [NM_138820]	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A

LOC100130456	Homo sapiens cDNA FLJ37693 fis, clone BRHIP2014954. [AK095012]	uncharacterized LOC100130456
lnc-BNIP3-2	LNCipedia lincRNA (lnc-BNIP3-2), lincRNA [lnc-BNIP3-2:1]	lnc-BNIP3-2:1
XLOC_12_013863	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_013863), lincRNA [TCONS_12_00027379]	-
Desconhecido	Unknown	-
lnc-MAD2L2-1	LNCipedia lincRNA (lnc-MAD2L2-1), lincRNA [lnc-MAD2L2-1:1]	lnc-MAD2L2-1:1
MGRN1	Homo sapiens mahogunin ring finger 1, E3 ubiquitin protein ligase (MGRN1), transcript variant 1, mRNA [NM_015246]	mahogunin ring finger 1, E3 ubiquitin protein ligase
IGLV1-50	immunoglobulin lambda variable 1-50 (non-functional) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5881] [ENST00000390291]	-
Desconhecido	Q5JX79_HUMAN (Q5JX79) OTTHUMP00000030115 (Fragment), partial (27%) [THC2659533]	-
EPR-1	Human effector cell protease receptor-1 (EPR-1) mRNA, partial cds. [L26245]	-
XLOC_12_007147	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_007147), lincRNA [TCONS_12_00013262]	-
URM1	Homo sapiens ubiquitin related modifier 1 (URM1), transcript variant 3, mRNA [NM_001265582]	ubiquitin related modifier 1
LOC643733	-	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase pseudogene
RPS4XP17	ribosomal protein S4X pseudogene 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36789] [ENST00000479057]	
DUX4	Homo sapiens double homeobox 4 (DUX4), mRNA [NM_001293798]	double homeobox 4
FEZF1-AS1	Homo sapiens FEZF1 antisense RNA 1 (FEZF1-AS1), long non-coding RNA [NR_036484]	FEZF1 antisense RNA 1
TLDC1	Homo sapiens TBC/LysM-associated domain containing 1 (TLDC1), mRNA [NM_020947]	TBC/LysM-associated domain containing 1
Desconhecido	Unknown	
RPL39	Homo sapiens ribosomal protein L39 (RPL39), mRNA [NM_001000]	ribosomal protein L39
C9orf106	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 106 (C9orf106), mRNA [NM_001012715]	chromosome 9 open reading frame 106
LOC101930159	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101930159 (LOC101930159), ncRNA [XR_251533]	uncharacterized LOC101930159
RPL17	Homo sapiens ribosomal protein L17 (RPL17), transcript variant 1, mRNA [NM_000985]	ribosomal protein L17
CHTOP	Homo sapiens chromatin target of PRMT1 (CHTOP), transcript variant 1, mRNA [NM_015607]	chromatin target of PRMT1
lnc-TP53INP1-1	Homo sapiens hypothetical protein LOC286149, mRNA (cDNA clone IMAGE:40114544). [BC128221]	lnc-TP53INP1-1:1
LINC01128	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1128 (LINC01128), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_047519]	long intergenic non-protein coding RNA 1128
RPL39P5	ribosomal protein L39 pseudogene 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26015] [ENST00000512505]	
UGDH	Homo sapiens UDP-glucose 6-dehydrogenase (UGDH), transcript variant 1, mRNA [NM_003359]	UDP-glucose 6-dehydrogenase

CCDC94	Homo sapiens coiled-coil domain containing 94 (CCDC94), mRNA [NM_018074]	coiled-coil domain containing 94
DNLZ	Homo sapiens DNL-type zinc finger (DNLZ), transcript variant 1, mRNA [NM_001080849]	DNL-type zinc finger
ESRRA	Homo sapiens estrogen-related receptor alpha (ESRRA), transcript variant 1, mRNA [NM_004451]	estrogen-related receptor alpha
FBRS	Homo sapiens fibrosin (FBRS), mRNA [NM_001105079]	fibrosin
lnc-AC099552.4.1-1	LNCipedia lincRNA (lnc-AC099552.4.1-1), lincRNA [lnc-AC099552.4.1-1:2]	lnc-AC099552.4.1-1:2
GHDC	Homo sapiens GH3 domain containing (GHDC), transcript variant 1, mRNA [NM_032484]	GH3 domain containing
LGI3	Homo sapiens leucine-rich repeat LGI family, member 3 (LGI3), mRNA [NM_139278]	leucine-rich repeat LGI family, member 3
<b>MTHFD1L</b>	Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like (MTHFD1L), transcript variant 1, mRNA [NM_001242767]	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like
-	Homo sapiens clone DNA170192 AALS9165 (UNQ9165) mRNA, complete cds. [AY358211]	
XLOC_12_012371	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_012371), lincRNA [TCONS_12_00023999]	
PPP1R15B	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B (PPP1R15B), mRNA [NM_032833]	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B
ZNF664-FAM101A	Homo sapiens filamin-interacting protein FAM101A (ZNF664-FAM101A), mRNA [NM_001204299]	filamin-interacting protein FAM101A
LINC00964	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 964 (LINC00964), long non-coding RNA [NR_027321]	long intergenic non-protein coding RNA 964
CNOT3	Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 (CNOT3), mRNA [NM_014516]	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3
WIZ	Homo sapiens widely interspaced zinc finger motifs (WIZ), mRNA [NM_021241]	widely interspaced zinc finger motifs
NUP88	Homo sapiens nucleoporin 88kDa (NUP88), mRNA [NM_002532]	nucleoporin 88kDa
NOTCH2NL	Homo sapiens notch 2 N-terminal like (NOTCH2NL), mRNA [NM_203458]	notch 2 N-terminal like
<b>MIEF2</b>	Homo sapiens mitochondrial elongation factor 2 (MIEF2), transcript variant 1, mRNA [NM_139162]	mitochondrial elongation factor 2
CDK5R2	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39) (CDK5R2), mRNA [NM_003936]	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)
XLOC_12_010854	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_010854), lincRNA [TCONS_12_00020780]	
EIF1P3	eukaryotic translation initiation factor 1 pseudogene 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49616] [ENST00000423841]	
<b>CYC1</b>	Homo sapiens cytochrome c-1 (CYC1), mRNA [NM_001916]	cytochrome c-1
RPL23AP12	ribosomal protein L23a pseudogene 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23840] [ENST00000467573]	
METTL3	Homo sapiens methyltransferase like 3 (METTL3), mRNA [NM_019852]	methyltransferase like 3
PRMT1	Homo sapiens protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1), transcript variant 1, mRNA [NM_001536]	protein arginine methyltransferase 1
<b>ATAD3B</b>	Homo sapiens ATPase family, AAA domain containing 3B (ATAD3B), mRNA [NM_031921]	ATPase family, AAA domain containing 3B

SNORD83A	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 83A (SNORD83A), small nucleolar RNA [NR_000027]	small nucleolar RNA, C/D box 83A
TCF7	Homo sapiens transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7), transcript variant 1, mRNA [NM_003202]	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
ZNF646	Homo sapiens zinc finger protein 646 (ZNF646), mRNA [NM_014699]	zinc finger protein 646
XLOC_12_006789	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_006789), lincRNA [TCONS_12_00012635]	
PRDX6	Homo sapiens peroxiredoxin 6 (PRDX6), mRNA [NM_004905]	peroxiredoxin 6
WDR90	Homo sapiens WD repeat domain 90 (WDR90), mRNA [NM_145294]	WD repeat domain 90
CAPN10	Homo sapiens calpain 10 (CAPN10), transcript variant 1, mRNA [NM_023083]	calpain 10
ZBTB39	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 39 (ZBTB39), mRNA [NM_014830]	zinc finger and BTB domain containing 39
PNPLA2	Homo sapiens patatin-like phospholipase domain containing 2 (PNPLA2), mRNA [NM_020376]	patatin-like phospholipase domain containing 2
LOC101060498	Homo sapiens uncharacterized LOC101060498 (LOC101060498), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_121640]	uncharacterized LOC101060498
lnc-NOM1-6	LNCipedia lincRNA (lnc-NOM1-6), lincRNA [lnc-NOM1-6:1]	lnc-NOM1-6:1
EXOSC10	exosome component 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9138] [ENST00000490565]	exosome component 10
RPP25	Homo sapiens ribonuclease P/MRP 25kDa subunit (RPP25), mRNA [NM_017793]	ribonuclease P/MRP 25kDa subunit
ORAI1	Homo sapiens ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI1), mRNA [NM_032790]	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1
ECSIT	Homo sapiens ECSIT signalling integrator (ECSIT), transcript variant 1, mRNA [NM_016581]	ECSIT signalling integrator
C16orf52	chromosome 16 open reading frame 52 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27087] [ENST00000569656]	
RPL36AAP51	ribosomal protein L36a pseudogene 51 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36632] [ENST00000487216]	
MTHFD1	Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase (MTHFD1), mRNA [NM_005956]	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase
PRAF2	Homo sapiens PRA1 domain family, member 2 (PRAF2), mRNA [NM_007213]	PRA1 domain family, member 2
LINC00994	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 994 (LINC00994), long non-coding RNA [NR_033978]	long intergenic non-protein coding RNA 994
MTHFD1L	Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like (MTHFD1L), transcript variant 2, mRNA [NM_015440]	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like
TAPT1-AS1	Homo sapiens TAPT1 antisense RNA 1 (head to head) (TAPT1-AS1), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_027696]	TAPT1 antisense RNA 1 (head to head)
ABHD13	Homo sapiens abhydrolase domain containing 13 (ABHD13), mRNA [NM_032859]	abhydrolase domain containing 13
SSSCA1	Homo sapiens Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 (SSSCA1), transcript variant 1, mRNA [NM_006396]	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1
AAR2	Homo sapiens AAR2 splicing factor homolog (S. cerevisiae) (AAR2), transcript variant 1, mRNA [NM_015511]	AAR2 splicing factor homolog (S. cerevisiae)
lnc-LCP1-1	LNCipedia lincRNA (lnc-LCP1-1), lincRNA [lnc-LCP1-1:1]	lnc-LCP1-1:1

INVS	Homo sapiens inversin (INVS), transcript variant 1, mRNA [NM_014425]	Inversin
LINC01104	long intergenic non-protein coding RNA 1104 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49226] [ENST00000441036]	long intergenic non-protein coding RNA 1104
GAPDH32	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase pseudogene 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:37784] [ENST00000433816]	
SNORD72	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 72 (SNORD72), small nucleolar RNA [NR_002583]	small nucleolar RNA, C/D box 72
LOC400043	Homo sapiens uncharacterized LOC400043 (LOC400043), long non-coding RNA [NR_026656]	uncharacterized LOC400043
FAM219A	Homo sapiens family with sequence similarity 219, member A (FAM219A), transcript variant 4, mRNA [NM_147202]	family with sequence similarity 219, member A
<b>0,22µg/mL Up-regulated</b>		
FAR1	Homo sapiens fatty acyl CoA reductase 1 (FAR1), mRNA [NM_032228]	fatty acyl CoA reductase 1
CECR2	Homo sapiens cat eye syndrome chromosome region, candidate 2 (CECR2), transcript variant 1, mRNA [NM_001290047]	cat eye syndrome chromosome region, candidate 2
lnc-CCDC37-3	LNCipedia lincRNA (lnc-CCDC37-3), lincRNA [lnc-CCDC37-3:1]	lnc-CCDC37-3:1
TOR3A	Homo sapiens torsin family 3, member A (TOR3A), mRNA [NM_022371]	torsin family 3, member A
RBM6	Homo sapiens RNA binding motif protein 6 (RBM6), transcript variant 1, mRNA [NM_005777]	RNA binding motif protein 6
PTPN11	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (PTPN11), transcript variant 1, mRNA [NM_002834]	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
UBE2V2	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 (UBE2V2), mRNA [NM_003350]	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MINPP1	Homo sapiens multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1 (MINPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_004897]	multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1
CRYZ	Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase) (CRYZ), transcript variant 1, mRNA [NM_001130042]	crystallin, zeta (quinone reductase)
DHX40	Homo sapiens DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 (DHX40), transcript variant 1, mRNA [NM_024612]	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40
TMEM56-RWDD3	Homo sapiens TMEM56-RWDD3 readthrough (TMEM56-RWDD3), mRNA [NM_001199691]	TMEM56-RWDD3 readthrough
CHPT1	Homo sapiens choline phosphotransferase 1 (CHPT1), mRNA [NM_020244]	choline phosphotransferase 1
lnc-C9orf102-3	LNCipedia lincRNA (lnc-C9orf102-3), lincRNA [lnc-C9orf102-3:1]	lnc-C9orf102-3:1
GANAB	Homo sapiens glucosidase, alpha; neutral AB (GANAB), transcript variant 3, mRNA [NM_198335]	glucosidase, alpha; neutral AB
BRWD1	Homo sapiens bromodomain and WD repeat domain containing 1 (BRWD1), transcript variant 1, mRNA [NM_018963]	bromodomain and WD repeat domain containing 1
NCAM1	Homo sapiens neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), transcript variant 4, mRNA [NM_001242608]	neural cell adhesion molecule 1
lnc-CBLB-7	LNCipedia lincRNA (lnc-CBLB-7), lincRNA [lnc-CBLB-7:18]	lnc-CBLB-7:18
STAU2	Homo sapiens staufen double-stranded RNA binding protein 2 (STAU2), transcript variant 1, mRNA [NM_001164380]	staufen double-stranded RNA binding protein 2
LINC00636	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 636 (LINC00636), long non-coding RNA [NR_015394]	long intergenic non-protein coding RNA 636

RWDD3	Homo sapiens RWD domain containing 3 (RWDD3), transcript variant 1, mRNA [NM_015485]	RWD domain containing 3
MAT2A	Homo sapiens methionine adenosyltransferase II, alpha (MAT2A), mRNA [NM_005911]	methionine adenosyltransferase II, alpha
LOC729970	Homo sapiens hCG2028352-like (LOC729970), long non-coding RNA [NR_033998]	hCG2028352-like
POC5	Homo sapiens POC5 centriolar protein (POC5), transcript variant 2, mRNA [NM_152408]	POC5 centriolar protein
SC5D	Homo sapiens sterol-C5-desaturase (SC5D), transcript variant 2, mRNA [NM_001024956]	sterol-C5-desaturase
BMP2K	Homo sapiens BMP2 inducible kinase (BMP2K), transcript variant 2, mRNA [NM_017593]	BMP2 inducible kinase
LOC102723721	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC102723721 (LOC102723721), ncRNA [XR_424100]	uncharacterized LOC102723721
C5orf42	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 42 (C5orf42), mRNA [NM_023073]	chromosome 5 open reading frame 42
SLC44A1	Homo sapiens solute carrier family 44 (choline transporter), member 1 (SLC44A1), transcript variant 1, mRNA [NM_080546]	solute carrier family 44 (choline transporter), member 1
lnc-STAT6-1	LNCipedia lincRNA (lnc-STAT6-1), lincRNA [lnc-STAT6-1:1]	lnc-STAT6-1:1
IGF1R	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), transcript variant 1, mRNA [NM_000875]	insulin-like growth factor 1 receptor
TCEAL7	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII)-like 7 (TCEAL7), mRNA [NM_152278]	transcription elongation factor A (SII)-like 7
XLOC_12_002894	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_002894), lincRNA [TCONS_12_00005523]	
APLP1	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (APLP1), transcript variant 2, mRNA [NM_005166]	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1
lnc-ASB4-3	LNCipedia lincRNA (lnc-ASB4-3), lincRNA [lnc-ASB4-3:3]	lnc-ASB4-3:3
C5orf24	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 24 (C5orf24), transcript variant 1, mRNA [NM_001135586]	chromosome 5 open reading frame 24
lnc-KLF6-6	LNCipedia lincRNA (lnc-KLF6-6), lincRNA [lnc-KLF6-6:1]	lnc-KLF6-6:1
C18orf25	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 25 (C18orf25), transcript variant 1, mRNA [NM_145055]	chromosome 18 open reading frame 25
WRNIP1	Homo sapiens Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1), transcript variant 2, mRNA [NM_130395]	Werner helicase interacting protein 1
DZIP3	Homo sapiens DAZ interacting zinc finger protein 3 (DZIP3), mRNA [NM_014648]	DAZ interacting zinc finger protein 3
DENND1B	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 1B (DENND1B), transcript variant 3, mRNA [NM_001195215]	DENN/MADD domain containing 1B
APBB2	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (APBB2), transcript variant 1, mRNA [NM_004307]	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2
LOC401320	Homo sapiens uncharacterized LOC401320 (LOC401320), long non-coding RNA [NR_038889]	uncharacterized LOC401320
RPS6KA6	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6 (RPS6KA6), mRNA [NM_014496]	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6
LOC645166	Homo sapiens lymphocyte-specific protein 1 pseudogene (LOC645166), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_027354]	lymphocyte-specific protein 1 pseudogene
YIPF6	Homo sapiens Yip1 domain family, member 6 (YIPF6), transcript variant A, mRNA [NM_173834]	Yip1 domain family, member 6
ERI2	Homo sapiens ERII exoribonuclease family member 2 (ERI2), transcript variant 1, mRNA [NM_001142725]	ERI1 exoribonuclease family member 2

TSPAN13	Homo sapiens tetraspanin 13 (TSPAN13), mRNA [NM_014399]	tetraspanin 13
ZNF404	Homo sapiens zinc finger protein 404 (ZNF404), mRNA [NM_001033719]	zinc finger protein 404
PRTFDC1	Homo sapiens phosphoribosyl transferase domain containing 1 (PRTFDC1), transcript variant 1, mRNA [NM_020200]	phosphoribosyl transferase domain containing 1
BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1065] [ENST00000367808]	basic leucine zipper nuclear factor 1
XLOC_12_005874	BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_005874), lincRNA [TCONS_12_00010943]	
LCOR	Homo sapiens ligand dependent nuclear receptor corepressor (LCOR), transcript variant 1, mRNA [NM_032440]	ligand dependent nuclear receptor corepressor
BNIP3L	Homo sapiens ovarian epithelial carcinoma-related protein mRNA, complete cds. [AF370457]	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like