

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Tamara Teodoro Araújo

Proteomic analysis of mitochondria from rat liver exposed to chronic fluoride exposure in two experimental periods

Análise proteômica das mitocôndrias de fígados de ratos expostos à exposição crônica por fluoreto em dois períodos experimentais

BAURU

2019

Tamara Teodoro Araújo

Proteomic analysis of mitochondria from rat liver exposed to chronic fluoride exposure in two experimental periods

Análise proteômica das mitocôndrias de fígados de ratos expostos à exposição crônica por fluoreto em dois períodos experimentais

Dissertation presented to the Bauru School of Dentistry of the University of São Paulo to obtain the degree of Master in Science in the Applied Dental Science Program, Stomatology and Oral Biology concentration area.

Supervisor: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientadora: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU

2019

Araujo, Tamara Teodoro

Proteomic analysis of mitochondria from rat liver exposed to chronic fluoride exposure in two experimental periods / Tamara Teodoro Araújo. -- Bauru, 2019.

119 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Animais da FOB-USP

Protocolo nº: 009/2017

Data: 18 de agosto de 2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação as seguintes pessoas:

Minha Família, minha mãe Edna, meu Pai Marcos, meu namorado Junior e meus amigos.

Dedico esta dissertação aos meus pais Edna e Marcos, meus maiores exemplos de vida;
Sempre me incentivaram a ir atrás dos meus objetivos independentemente da situação;
Obrigada por terem me oferecido base e sustentação para evoluir como pessoa e como profissional, meu maior incentivo são vocês, com todo o amor eu dedico mais uma etapa da minha vida a vocês.

Ao meu namorado Junior que sempre me encorajou e me incentivou em todos os momentos até aqui. Obrigada por toda compreensão, respeito e amor. Serei sempre grata por ter você por perto.

A todos os colegas de pesquisa que sempre me acolheram muito bem, me ajudaram e me divertiram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por permitir que mais uma etapa possa ser concluída com muita dignidade, paz de espírito e sabedoria. Obrigada por permitir que eu passasse com muita saúde por todos estes momentos até hoje, sou grata pela vida que tenho, pela família, casa, meus animais, namorado, amigos e profissão. Sou grata senhor por me conceder tamanha sabedoria, paciência e força necessária para acordar todos os dias feliz e em paz para tentar fazer um dia melhor para mim e para as pessoas que estão ao meu redor, gratidão.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me criar com muita dignidade, caráter e humildade, obrigada por terem se sacrificado tanto pagando meus estudos, comprando meus materiais, por pagarem meu transporte.

Obrigado por me darem a oportunidade de crescer em um lar cheio de paz, amor, respeito, perseverança e persistência. Com isso levo para minha vida como é que uma família deve ser mediante as alegrias e as dificuldades, cheia de amor, respeito, gratidão e com muitos animais ne?!!

Hoje estamos aqui, formando a primeira mestre da família, e quem diria que seria a filha de vocês não é mesmo?! Mas como sempre digo, Deus sabe de todas as coisas em nossas vidas e seu propósito é grande.

Saibam que serei eternamente grata a vocês, dedico essa e todas as fases da minha vida á vocês. Muito obrigada, amo vocês.

Ao meu **namorado Junior**

Você sabe o quão Deus tem sido bom com a gente né?! Como eu poderia imaginar que aquele rapaz andando de moto na rua que eu mexi, hoje viraria parte de tanta coisa na minha vida. Você me completa, me acrescenta e me impulsiona todos os dias. Você é uma das pessoas mais pacientes que eu já conheci, uma das pessoas mais família, que se importa com o bem-estar de todos ao seu redor. Você é uma pessoa muito iluminada, que eu tive a sorte de poder conhecer e ter você todos os dias na minha vida. Seu coração genuíno te faz um grande homem.

Obrigada por sempre me oferecer uma palavra de conforto ou de incentivo todas as vezes que eu necessitava, obrigada pelo amor puro e sincero, companheirismo, respeito e paciência, você foi essencial para a conclusão desta fase, Te amo.

À minha **amiga Camila**

Obrigada por toda companhia desde a faculdade, sua parceria, sinceridade e amizade foi e é essencial para mim. Quantas conversas, risadas (e olha que foram muitas), cafês, momentos de tensão pré provas, de descontração pós provas e MEMES né, nossa quantos MEMES.

Te agradeço por toda ajuda e por estar presente nos meus dias, seja para eu desabafar ou para você. Nossa amizade cresceu e se fortaleceu e com você eu aprendi muita coisa, você me ensina diariamente e tenho certeza que os planos de Deus são maravilhosos para você, muito obrigada por tudo.

A minha **co-orientadora Helo**

Helo, serei sempre grata por ter me aceitado como sua aluna de IC lá em 2013, você sempre foi uma profissional brilhante que sabe o que faz e consegue passar seu conhecimento com muita clareza e paciência. Tudo o que eu aprendi no lab desde 2013 devo a você, quantos *western blot* já não fizemos juntas hein?

Sempre vi sua garra e esforço em correr atrás das coisas, e me espelho muito em você; Você é um incentivo para todos nós, obrigada por sempre me orientar e me ajudar em todos os momentos, sem seus ensinamentos eu não teria chego até aqui, obrigada.

A minha amiga **Aline**

Oii Lii, tudo bem? (Segura que lá vem bomba por mensagem, hein?!!) Brincadeiras à parte, Li sou muito grata por ter te conhecido, que ser humano fantástico que você e toda sua família são. Você nasceu com o dom do ensinamento, você é um exemplo de pessoa e profissionalismo para todos nós, você é extremamente inteligente, competente, focada, ama o que faz, uma profissional com amplo conhecimento em tantas áreas né? Obrigada por sempre me ajudar com prontidão, por me ensinar tantas coisas com tanta paciência, obrigada pelas companhias no bandejaio, no lab, e na vida. Obrigada amiga, por tudo, sem sua ajuda eu não teria chego aqui.

Aos colegas do **laboratório de bioquímica**

Aline Braga, Bia, Daia, Isa, Thamyris, Tati, Natara, Vini, Talita, Adriano, Van, Ana, Mari, Cintia, Ju, Jéssica... Trabalhar com vocês foi extremamente gratificante para mim. Sempre que precisei vocês me ajudaram nos experimentos, conversávamos, riamos muito no café do laboratório, almoçávamos no bandejão e sempre pude contar com a ajuda de vocês.

Sem essa ajuda eu jamais teria conseguido concluir este trabalho. Vocês sempre estarão no meu coração e que Deus continue abençoando cada vez mais essa equipe extremamente competente.

Agradeço as funcionárias do laboratório de bioquímica Thelma e Larissa por sempre nos ajudarem em tudo. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao pessoal da Limpeza do laboratório, muito obrigada por deixarem o lab sempre cheiroso e limpinho, vocês são demais.

A secretária Dalva, muito obrigada por sempre solucionar minhas dúvidas com muita prontidão.

A minha professora de inglês que se tornou amiga, Melina. Muito obrigada Mel por todo ensinamento, por todas as dicas de receitas vegetarianas e restaurantes, por compartilhar suas histórias e por ouvir as minhas. Seus ensinamentos foram essenciais para a minha evolução durante esses dois anos, muito obrigada.

Aos **professores da Bioquímica**

Muito obrigada professora Ana Carolina Magalhães e professor Rodrigo Cardoso de Oliveira, por sempre estarem dispostos a tirar nossas duvidas, nos ensinar durante as disciplinas e também fora delas, com a ajuda de vocês, eu pude ver o progresso dos meus seminários, modo de escrita e tudo que envolve a parte acadêmica, muito obrigada por todas as dicas.

A minha **orientadora Marília**

Obrigada professora Marília por sempre me tratar tão bem, ser tão atenciosa e prestativa com todas as minhas dúvidas e questionamentos, mesmo com tantas coisas para fazer e com tantos alunos para atender. Obrigada por ser essa pessoa que não mede esforços para compartilhar seus conhecimentos com todos. O contato que eu tive no meu mestrado com a senhora foi essencial para minha evolução profissional, sou muito grata por todas oportunidades que a senhora me destes. Obrigada imensamente pela confiança que teve em mim e no meu trabalho, por sempre me dar liberdade para desenvolver o projeto, escrever minha dissertação e artigo. Isso com certeza me acrescentou muito nestes dois anos.

A senhora é um exemplo para todos nós, uma profissional extremamente inteligente, um ser humano muito iluminado e humilde com todos ao seu redor, uma excelente professora,

pesquisadora, empresária e mãe, que exemplo de ser humano, obrigada por ter compartilhado tantos ensinamentos. A sua orientação foi fundamental para que eu me tornasse a profissional que sou.

Agradecimentos institucionais

Agradeço também a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES**, pela bolsa de pesquisa concedida, no âmbito FAPESP/CAPES, por meio do processo nº 2016/23414-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, entre abril de 2017 a março de 2019. A bolsa concedida foi indispensável para que a pesquisa alcançasse os resultados aqui apresentados.

A faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP por ter utilizado as dependências da instituição e equipamentos para a realização deste projeto e por fazer parte de uma instituição de ensino renomada.

A todos o meu carinho e o meu mais sincero agradecimento.

“Só o riso, o amor e o prazer merecem revanche.

O resto, mais que perda de tempo...

É perda de vida “.

(Chico Xavier)

RESUMO

O íon fluoreto (F), quando ingerido em excesso, pode alterar várias funções celulares. Como o fígado é um órgão de alta atividade metabólica, tornou-se alvo de investigações sobre os efeitos colaterais do F, relacionados a alterações na expressão de proteínas metabólicas, aumento do estresse oxidativo e alterações na função mitocondrial. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de expressão proteica de mitocôndrias hepáticas de ratos expostos cronicamente a duas concentrações de F na água de beber (15 ou 50 mgF / L) por 20 ou 60 dias. Trinta e seis amostras de fígado de ratos *Wistar* machos com 21 dias de idade foram divididos em 6 grupos (n= 6 animais por grupo) de acordo com a concentração de F administrada em água potável (0, 15 ou 50 mg / L) e o tratamento tempo (20 ou 60 dias). As mitocôndrias foram extraídas do tecido hepático e preparadas para análise proteômica quantitativa sem marcadores (Xevo Q-TOF, Waters). O software PLGS foi utilizado para detectar mudanças na expressão de proteínas entre os diferentes grupos. A maioria das alterações foi observada nas vias metabólicas como glicólise, gliconeogênese, β -oxidação, ciclo da ureia, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia de transporte de elétrons, além de alterações nas proteínas envolvidas no sistema antioxidante e homeostase do cálcio. A dose de 15 mgF/L, quando administrada por 20 dias, reduziu a glicólise, que foi contrabalançada pelo aumento de outras vias energéticas. Aos 60 dias, no entanto, um aumento em todas as vias de energia foi observado. Por outro lado, a dose de 50 mgF/L, quando administrada por 20 dias, reduziu as enzimas envolvidas em todas as vias energéticas, indicando menor taxa de produção de energia, com menor geração de ROS e consequente redução de enzimas antioxidantes. No entanto, quando a dose de 50 mgF/L foi administrada por 60 dias, observou-se um aumento no metabolismo energético, mas, em geral, não foram observadas alterações nas enzimas antioxidantes. Com exceção do grupo tratado com 50 mgF/L por 20 dias, todos os demais grupos apresentaram alterações nas proteínas na tentativa de manter a homeostase do cálcio e evitar a apoptose. Assim, os resultados sugerem que o organismo parece se adaptar aos efeitos do F ao longo do tempo, ativando vias para reduzir a toxicidade desse íon. Em última análise, nossos achados corroboram com a segurança do uso do flúor no controle da cárie.

Palavras-chave: Fluoreto. Fígado. Mitocôndria. Metabolismo energético. Sistema antioxidante.

ABSTRACT

Proteomic analysis of mitochondria from rat liver exposed to chronic fluoride exposure in two experimental periods.

The fluoride ion (F), when ingested in excess, may alter various cellular functions. As liver is an organ of high metabolic activity, it has become the target of investigations on the side effects of F, related to changes in the expression of metabolic proteins, increase in oxidative stress and changes in mitochondrial function. Thus, the objective of the present work was to evaluate the protein expression profile of liver mitochondria from rats chronically exposed to two F concentrations through the drinking water (15 or 50 mgF/L) for 20 or 60 days. Thirty-six liver samples from 21-day-old male *Wistar* rats were divided into 6 groups (n= 6 animals per group) according to the concentration of F administered in drinking water (0, 15 or 50 mg/L) and the treatment time (20 or 60 days). Mitochondria were extracted from hepatic tissue and prepared for quantitative label-free proteomic analysis (Xevo Q-TOF, Waters). PLGS software was used to detect changes in protein expression among the different groups. Most of the changes were observed in the metabolic pathways such as glycolysis, gluconeogenesis, β -oxidation, urea cycle, tricarboxylic acids cycle and electron transport chain, in addition alterations in proteins involved in the antioxidant system, calcium homeostasis and apoptosis. The dose of 15 mgF/L, when administered for 20 days, reduced glycolysis, which was counterbalanced by an increase in other energetic pathways. At 60 days, however, an increase in all energy pathways was observed. On the other hand, the dose of 50 mgF/L, when administered for 20 days, reduced the enzymes involved in all energetic pathways, indicating a lower rate of energy production, with less generation of ROS and consequent reduction of antioxidant enzymes. However, when the 50 mgF/L dose was administered for 60 days, an increase in energy metabolism was seen but in general no changes were observed in the antioxidant enzymes. Except for the group treated with 50 mgF/L for 20 days, all the other groups had alterations in proteins in attempt to maintain calcium homeostasis and avoid apoptosis. Thus, the results suggest that the organism seems to adapt to the effects of F over time, activating pathways to reduce the toxicity of this ion. Ultimately, our findings corroborate the safety of the use of fluoride for caries control.

Key-words: Fluoride. Liver. Mitochondria. Energy metabolism. Antioxidant system.

TABLE OF CONTENTS

1	INTRODUCTION	13
2	ARTICLE	19
3	DISCUSSION.....	89
	REFERENCES	103
	ANNEX	117

1- *I*ntroduction

1 INTRODUCTION

The fluoride ion (F) is derived from the chemical element fluorine, a gaseous element from the group of halogens (VII), extremely reactive and electronegative. These characteristics make easier its complexation with other elements of the periodic table, thus forming organic and/or inorganic compounds (Smith F, 1996; Barbier *et al.*, 2010). When naturally identified in the soil, water and vapors of volcanic eruptions, F is always associated with another element and is never in its free form (Buzalaf, 2013). Due to this, in this work we will mention the ion F but not the chemical element fluorine.

As F is naturally present in the environment, in some regions of the world it can be found in high concentrations in the groundwater, which may result in excessive concentrations in the water supply. In these situations, it is estimated that the intake of F can reach up to 27 mg/day (Dey *et al.*, 2011). Because of these elevated concentrations in natural environments, the World Health Organization (WHO) has established a limiting concentration of 1.5 mg F/L in the drinking water as a safe limit, and the average daily intake of F should not exceed 2 mg/day. High concentrations of F can also be seen in some regions of Brazil (Pessan *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2013), as well as in other areas of the world such as India (Hussain *et al.*, 2010). Due to the established effectiveness for the control of dental caries, supplementation of F in the drinking water of several municipalities has become frequent. Since F is available in fluoridated water, food and supplements, its daily intake can easily exceed the WHO recommended limit, leading to toxic responses in the body (Buzalaf, 2018).

When F is ingested, approximately 25% is absorbed by the gastric mucosa in the form of HF, a process inversely related to the pH. The fraction that is not absorbed by the stomach will be absorbed in the intestine. In this case F passes in the space between the cells of the intestinal mucosa, which does not depend on the pH. Due to the rapid absorption, plasma F concentration rises rapidly, reaching a peak between 30-45 minutes after ingestion. Much of the circulating F will be incorporated into the mineralized tissues and only a small fraction is taken up by the soft tissues. In the latter, the entry or exit of F from the cells depends on the pH gradient between the intra- and extracellular compartments, since the cells are permeable to HF. Absorbed F that is not incorporated into the body will be excreted mainly through the urinary tract, a phenomenon that is also dependent on the pH of the urine (Buzalaf e Whitford, 2011; Buzalaf, 2013). Thus, after absorption, F is rapidly distributed to the body and can reach all

tissues and cell types. Thus, depending on the amount of F ingested, duration of ingestion, solubility of the compounds containing it and individual factors, F can disturb the homeostasis of the organism (Buzalaf e Whitford, 2011).

For many decades, several studies have been conducted in attempt to investigate the effects of F in the organism. Many *in vitro* laboratory studies, as well as *in vivo* investigations, conducted both with animals and humans have shown adverse effects caused by excessive ingestion of F, which are related to the amount and time of exposure (for review see (Barbier *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2018; Zuo *et al.*, 2018). The most well documented adverse effect of F is fluorosis (Buzalaf, 2013). It can occur in three forms according to the affected tissues, namely: dental, skeletal and non-skeletal that affects soft tissues such as liver, kidney, lung, muscle, blood, cells, gastrointestinal mucosa. In these tissues, F affects several proteins and enzymes, and interferes in distinct molecular processes. Among these are cell cycle, ion transport, apoptosis, signaling pathways and metabolism of free radicals. These effects have been described in several organs and tissues such as liver, kidney, heart, brain, muscle and intestine (Whitford, 1996; Chlubek *et al.*, 2003; Shanthakumari *et al.*, 2004; Strunecka, 2007; Strunecka *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2007; Blaszczyk *et al.*, 2008; Chouhan e Flora, 2008; Kobayashi *et al.*, 2009; Barbier *et al.*, 2010; Inkielewicz-Stepniak e Czarnowski, 2010; Dey *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Lima Leite *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017; Dionizio, A. *et al.*, 2018; Dionizio, A. S. *et al.*, 2018; Malvezzi *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018).

Experimental studies to evaluate F toxicity are usually performed in animals, especially in rodents where drinking water supplemented with various concentrations of F is commonly used for distinct periods, thus allowing assessment of the effects of short- and long-term exposure to this ion. When rodents are used as a model, it is important to bear in mind that they metabolize F 5 times faster than humans (Dunipace *et al.*, 1995). This means that, e.g., the F concentration of 15 mgF/L in the drinking water for rats corresponds to approximately water containing 3 mgF/L for humans. This concentration can be naturally found in the drinking water of endemic regions of fluorosis and is sufficient to cause hepatic changes, since the liver stands out as the main organ of the body involved in the detoxification of the organism (Dabrowska *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2013; Iano *et al.*, 2014; Yan e Xie, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Dionizio, A. *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018). The liver has a high metabolic rate, which shares substrates and energy in addition to receiving the nutrients absorbed in the digestive system, processing them, storing them and synthesizing substances that are transported to other parts of the body. It is an organ that neutralizes and eliminates toxic substances (Merrick, 2006). Some alterations may be due to the metabolism of liver tissue itself

in order to eliminate toxic compounds, which can lead to cellular dysfunction and oxidative stress, and, depending on genetic factors, may give rise to a greater or lesser degree of cellular stress (Stirnemann *et al.*, 2010). Studies involving enzymes related to hepatic metabolism such as aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) have shown alterations in the presence of high concentrations of F and may indicate their direct action in the organ with impaired hepatic functions (Michael *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2018).

The toxic effects of F have often been related as an important factor causing oxidative stress, defined as the sum of factors that cause an imbalance between the antioxidant enzymes and the reactive oxygen species (ROS) (Dabrowska *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016). Mitochondria are considered the main sources of ROS and this has been related to the increase in the production of superoxide anions. This excessive production can contribute to mitochondrial damage and be an important mechanism in redox signaling of the organelle (Brownlee, 2001; Droge, 2002; Balaban *et al.*, 2005; Murphy, 2009; Sun *et al.*, 2014; Dionizio, A. *et al.*, 2018).

Mitochondria are organelles with diverse forms and functions, among which the main one is bioenergetics that involves the transformation of energy derived from oxidation/reduction reactions into chemical energy (ATP). ATP is produced mainly in the electron transport chain and perturbations in this process can lead to excessive production of ROS, which in turn can alter calcium signaling and induce apoptosis (Fagian *et al.*, 1990; Castilho *et al.*, 1995; Castilho *et al.*, 1996; Kowaltowski *et al.*, 1996; Komarova *et al.*, 2000; Yan e Xie, 2015). There are several reports indicating disturbs in energy metabolism induced by F, leading to the generation of oxidative stress and eventually apoptosis, depending on the dose (Barbier *et al.*, 2010; Fina *et al.*, 2014; Jothiramajayam *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2018). In addition, F has been reported to act directly as an uncoupling agent on mitochondria (Ligeret *et al.*, 2004), which promotes the opening of the transition pore of mitochondrial permeability (TPMP) and increases the disruption of the mitochondrial membrane potential (MMP) and then provokes the release of Cyt c, leading to caspase-3 cleavage and finally apoptosis (Wei *et al.*, 2018). Recent studies from our research group employing proteomic tools reported that different doses of F alter the expression of several mitochondrial proteins. Both in liver, muscle and intestine of rats and mice, exposure to F provoked alterations in energy metabolism, mitochondrial dysfunction and oxidative stress (Kobayashi *et al.*, 2009; Lima Leite *et al.*, 2014; Lobo *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Dionizio, A. S. *et al.*, 2018; Malvezzi *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018). Similar findings were reported by Lima Leite *et al.* (2014). However, in these studies, proteomic analysis was performed in the

homogenate of the tissues. In the present study, we isolated the mitochondrial fraction of the liver of rats, since our focus was to detect changes in mitochondrial proteins induced by F.

This dissertation is presented in the form of an article, in which we evaluated the effect of the different concentrations of F administered for 20 or 60 days in the proteomic profile of mitochondria of liver of rats.

References

REFERENCES

ADAMEK, E.; PAWLOWSKA-GORAL, K.; BOBER, K. In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. **Ann Acad Med Stetin**, v. 51, n. 2, p. 69-85, 2005.

ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. **Mitochondrion**, Mar 15 2018.

AKRAM, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell Biochem Biophys**, v. 68, n. 3, p. 475-8, Apr 2014.

ALEXEYEV, M. F. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? **FEBS J**, v. 276, n. 20, p. 5768-87, Oct 2009.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-95, Feb 25 2005.

BAN, H. S. et al. A Novel Malate Dehydrogenase 2 Inhibitor Suppresses Hypoxia-Inducible Factor-1 by Regulating Mitochondrial Respiration. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162568, 2016.

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 319-33, Nov 5 2010.

BIRKNER E, G.-M. E., MACHOY Z, TARNAWSK RI, POLANIAKA; KATOWICE R, S. DISTURBANCE OF PROTEIN METABOLISM IN RATS AFTER ACUTE POISONING WITH SODIUM FLUORIDE. **Fluoride**, v. 33 p. 182-186, 2000.

BLASZCZYK, I. et al. Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: effects of methionine and vitamin E. **Biol Trace Elem Res**, v. 121, n. 1, p. 51-9, Jan 2008.

BOON, L. et al. High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 6, p. 445-52, Jun 1999.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 13 2001.

BULTEAU, A. L.; IKEDA-SAITO, M.; SZWEDA, L. I. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. **Biochemistry**, v. 42, n. 50, p. 14846-55, Dec 23 2003.

BUZALAF, M. A.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism. **Monogr Oral Sci**, v. 22, p. 20-36, 2011.

BUZALAF, M. A. R. Fluoretos e Saúde Bucal. . **Livraria Santos Editora**, 2013.

BUZALAF, M. A. R. Review of Fluoride Intake and Appropriateness of Current Guidelines. **Adv Dent Res**, v. 29, n. 2, p. 157-166, Mar 2018.

CAMBRIDGE, E. L. et al. The AMP-activated protein kinase beta 1 subunit modulates erythrocyte integrity. **Exp Hematol**, v. 45, p. 64-68 e5, Jan 2017.

CANTU, D.; SCHAACK, J.; PATEL, M. Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H₂O₂-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7095, Sep 18 2009.

CAO, W. et al. Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 attenuates the apoptotic effects of BNIP3 in two human cell lines. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 6, p. 873-80, Jun 2008.

CASTILHO, R. F. et al. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 3, p. 479-86, Mar 1995.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca²⁺ plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J Bioenerg Biomembr**, v. 28, n. 6, p. 523-9, Dec 1996.

CASTRO MDEL, R. et al. Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 1, p. 29-37, Jan 2012.

CELA, O. et al. Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: results of a study on cell cultures. **Mitochondrion**, v. 10, n. 5, p. 487-96, Aug 2010.

CHAE, S. et al. A mitochondrial proteome profile indicative of type 2 diabetes mellitus in skeletal muscles. **Exp Mol Med**, v. 50, n. 9, p. 129, Sep 28 2018.

CHAUHAN, S. S.; MAHMOOD, A.; OJHA, S. Ethanol and age enhances fluoride toxicity through oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat intestine. **Mol Cell Biochem**, v. 384, n. 1-2, p. 251-62, Dec 2013.

CHEN, X. J. et al. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. **Science**, v. 307, n. 5710, p. 714-7, Feb 4 2005.

CHLUBEK, D. et al. Activity of pancreatic antioxidative enzymes and malondialdehyde concentrations in rats with hyperglycemia caused by fluoride intoxication. **J Trace Elem Med Biol**, v. 17, n. 1, p. 57-60, 2003.

CHOUHAN, S.; FLORA, S. J. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. **Toxicology**, v. 254, n. 1-2, p. 61-7, Dec 5 2008.

DABROWSKA, E. et al. Ultrastructural study of the mitochondria in the submandibular gland, the pancreas and the liver of young rats, exposed to NaF in drinking water. **Rocz Akad Med Białymst**, v. 49 Suppl 1, p. 180-1, 2004.

DABROWSKA, E.; LETKO, R.; BALUNOWSKA, M. Effect of sodium fluoride on the morphological picture of the rat liver exposed to NaF in drinking water. **Adv Med Sci**, v. 51 Suppl 1, p. 91-5, 2006.

DASHTI, N.; ONTKO, J. A. Rate-limiting function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase in ketogenesis. **Biochem Med**, v. 22, n. 3, p. 365-74, Dec 1979.

DE SOUZA, C. F. et al. Assessment of groundwater quality in a region of endemic fluorosis in the northeast of Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 185, n. 6, p. 4735-43, Jun 2013.

DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 65-7, Apr 4 2003.

DEVLIN, T. M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. **John Wiley & Sons**, v. 7th ed., 2011.

DEY, S. et al. In vivo efficacy of tamarind (*Tamarindus indica*) fruit extract on experimental fluoride exposure in rats. **Res Vet Sci**, v. 91, n. 3, p. 422-5, Dec 2011.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-90, May 14 2007.

DIONIZIO, A. et al. Effect of Duration of Exposure to Fluoride and Type of Diet on Lipid Parameters and De Novo Lipogenesis. **Biol Trace Elem Res**, Oct 16 2018.

DIONIZIO, A. S. et al. Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: insights from proteomics and enteric innervation analysis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3180, Feb 16 2018.

DOUARRE, C. et al. Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41094, 2012.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DUNIPACE, A. J. et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **J Dent Res**, v. 74, n. 1, p. 358-68, Jan 1995.

FAGIAN, M. M. et al. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. **J Biol Chem**, v. 265, n. 32, p. 19955-60, Nov 15 1990.

FINA, B. L. et al. Fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100768, 2014.

FORETZ, M. et al. Maintenance of red blood cell integrity by AMP-activated protein kinase alpha1 catalytic subunit. **FEBS Lett**, v. 584, n. 16, p. 3667-71, Aug 20 2010.

FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; SCORRANO, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 287-95, 2007.

GHIMIRE, P.; DHAMOON, A. S. Ketoacidosis. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2018.

GIORGI, C. et al. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. **Curr Mol Med**, v. 8, n. 2, p. 119-30, Mar 2008.

GOWARD, C. R.; NICHOLLS, D. J. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. **Protein Sci**, v. 3, n. 10, p. 1883-8, Oct 1994.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-12, Aug 28 1998.

GRUCKA-MAMCZAR E, M. R. A., TARNAWSKI E, BIRKNER A. . Influence of long term sodium fluoride administration on selected parameters of rat blood serum and liver function. **Fluoride**, p. 157-164, 1997.

GUO, C. et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 21, p. 2003-14, Jul 25 2013.

HAMILTON, I. R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. **J Dent Res**, v. 69 Spec No, p. 660-7; discussion 682-3, Feb 1990.

HAN, S. J. et al. IDH2 deficiency increases the liver susceptibility to ischemia-reperfusion injury via increased mitochondrial oxidative injury. **Redox Biol**, v. 14, p. 142-153, Apr 2018.

HE, Y. Q. et al. Differential Expression ESTs Associated with Fluorosis in Rats Liver. **Comp Funct Genomics**, v. 2012, p. 208390, 2012.

HROUDOVA, J.; FISAR, Z. Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 4, p. 363-75, Feb 5 2013.

HUSSAIN, J.; HUSSAIN, I.; SHARMA, K. C. Fluoride and health hazards: community perception in a fluorotic area of central Rajasthan (India): an arid environment. **Environ Monit Assess**, v. 162, n. 1-4, p. 1-14, Mar 2010.

HUTTEMANN, M. et al. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 12, p. 1701-20, Dec 2007.

IANO, F. G. et al. Effects of chronic fluoride intake on the antioxidant systems of the liver and kidney in rats. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 168, n. 0, p. 212-217, 2014.

INKIELEWICZ-STEPNIAK, I.; CZARNOWSKI, W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 6, p. 1607-11, Jun 2010.

JITRAPAKDEE, S. et al. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. **Biochem J**, v. 413, n. 3, p. 369-87, Aug 1 2008.

JITRAPAKDEE, S.; VIDAL-PUIG, A.; WALLACE, J. C. Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 7-8, p. 843-54, Apr 2006.

JO, S. H. et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16168-76, May 11 2001.

JOTHIRAMAJAYAM, M. et al. Sodium fluoride promotes apoptosis by generation of reactive oxygen species in human lymphocytes. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 21, p. 1269-80, 2014.

JUHASZOVA, M. et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1123, p. 197-212, Mar 2008.

K., U. R. Mitochondrial Ca²⁺ levels lower down rate of metabolic diseases and cardiomyopathies. **J Stem Cell Res Ther.**, p. 82-87, 2018.

KACSO, G. et al. Two transgenic mouse models for beta-subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. **Biochem J**, v. 473, n. 20, p. 3463-3485, Oct 15 2016.

- KADENBACH, B. et al. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 3, p. 205-12, Mar 2010.
- KHAN, Z. N. et al. Liver Proteome of Mice with Distinct Genetic Susceptibilities to Fluorosis Treated with Different Concentrations of F in the Drinking Water. **Biol Trace Elem Res**, Apr 29 2018.
- KIM, S. J. et al. Mitochondria-targeted Ogg1 and aconitase-2 prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 289, n. 9, p. 6165-76, Feb 28 2014.
- KIRICHOK, Y.; KRAPIVINSKY, G.; CLAPHAM, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 360-4, Jan 22 2004.
- KOBAYASHI, C. A. et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. **Chem Biol Interact**, v. 180, n. 2, p. 305-11, Jul 15 2009.
- KOMAROVA, S. V.; ATAULLAKHANOV, F. I.; GLOBUS, R. K. Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, n. 4, p. C1220-9, Oct 2000.
- KOTOH, K. et al. Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. **Exp Ther Med**, v. 2, n. 2, p. 195-199, Mar 2011.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, v. 378, n. 2, p. 150-2, Jan 8 1996.
- KREMER, J. C. et al. Arginine Deprivation Inhibits the Warburg Effect and Upregulates Glutamine Anaplerosis and Serine Biosynthesis in ASS1-Deficient Cancers. **Cell Rep**, v. 18, n. 4, p. 991-1004, Jan 24 2017.
- KUBLI, D. A.; YCAZA, J. E.; GUSTAFSSON, A. B. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. **Biochem J**, v. 405, n. 3, p. 407-15, Aug 1 2007.
- KUMAR, A. et al. The beta-3 adrenergic agonist (CL-316,243) restores the expression of down-regulated fatty acid oxidation genes in type 2 diabetic mice. **Nutr Metab (Lond)**, v. 12, p. 8, 2015.
-
-

KUNAU, W. H.; DOMMES, V.; SCHULZ, H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. **Prog Lipid Res**, v. 34, n. 4, p. 267-342, 1995.

LAMY, L. et al. CD47 and the 19 kDa interacting protein-3 (BNIP3) in T cell apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 26, p. 23915-21, Jun 27 2003.

LEE, I. et al. Isolation of regulatory-competent, phosphorylated cytochrome C oxidase. **Methods Enzymol**, v. 457, p. 193-210, 2009.

LEONE, T. C.; WEINHEIMER, C. J.; KELLY, D. P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7473-8, Jun 22 1999.

LI, L. et al. Proteomic analysis of liver mitochondria from rats with nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 16, p. 4778-86, Apr 28 2014.

LIANG, S. et al. Fluoride impairs oocyte maturation and subsequent embryonic development in mice. **Environ Toxicol**, v. 31, n. 11, p. 1486-1495, Nov 2016.

LIGERET, H. et al. Fluoride curcumin derivatives: new mitochondrial uncoupling agents. **FEBS Lett**, v. 569, n. 1-3, p. 37-42, Jul 2 2004.

LIMA LEITE, A. et al. Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106646, 2014.

LINDEN, P. et al. Reduced mitochondrial malate dehydrogenase activity has a strong effect on photorespiratory metabolism as revealed by ¹³C labelling. **J Exp Bot**, v. 67, n. 10, p. 3123-35, May 2016.

LOBO, J. G. et al. Low-Level Fluoride Exposure Increases Insulin Sensitivity in Experimental Diabetes. **J Dent Res**, v. 94, n. 7, p. 990-7, Jul 2015.

MALVEZZI, M. et al. Low-level fluoride exposure reduces glycemia in NOD mice. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 168, p. 198-204, Oct 30 2018.

MARTINEZ-REYES, I. et al. TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. **Mol Cell**, v. 61, n. 2, p. 199-209, Jan 21 2016.

MCCORMACK, J. G.; DENTON, R. M. The role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism and energy production in rat heart. **Mol Cell Biochem**, v. 89, n. 2, p. 121-5, Sep 7 1989.

MELO, C. G. S. et al. Enteric innervation combined with proteomics for the evaluation of the effects of chronic fluoride exposure on the duodenum of rats. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1070, Apr 21 2017.

MERRICK, B. A. Toxicoproteomics in liver injury and inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1076, p. 707-17, Sep 2006.

MICHAEL, M.; BAROT, V. V.; CHINOY, N. J. Investigation of soft tissue functions in fluorotic individuals of north Gujarat. **Fluoride**, v. 29, p. 63-71, 1996.

MILLER, C. et al. The interplay between SUCLA2, SUCLG2, and mitochondrial DNA depletion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 5, p. 625-9, May 2011.

MIN, Z.; GAO, J.; YU, Y. The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 783, 2018.

MOREAU, B.; NELSON, C.; PAREKH, A. B. Biphasic regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺ concentration. **Curr Biol**, v. 16, n. 16, p. 1672-7, Aug 22 2006.

MORGENSTERN, M. et al. Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. **Cell Rep**, v. 19, n. 13, p. 2836-2852, Jun 27 2017.

MORRIS, S. M., JR. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p. 87-105, 2002.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 1-13, Jan 1 2009.

NASRIN, N. et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 31995-2002, Oct 15 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. W. H. Freeman, 2012.

NUNES-NESE, A. et al. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiol**, v. 137, n. 2, p. 611-22, Feb 2005.

OTSUKI, S. et al. Possible link between glycolysis and apoptosis induced by sodium fluoride. **J Dent Res**, v. 84, n. 10, p. 919-23, Oct 2005.

PANNEERSELVAM, L.; RAGHUNATH, A.; PERUMAL, E. Acute fluoride poisoning alters myocardial cytoskeletal and AMPK signaling proteins in rats. **Int J Cardiol**, v. 229, p. 96-101, Feb 15 2017.

PEREIRA, H. et al. Proposed mechanism for understanding the dose- and time-dependency of the effects of fluoride in the liver. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 358, p. 68-75, Nov 1 2018.

PEREIRA, H. A. et al. Fluoride Intensifies Hypercaloric Diet-Induced ER Oxidative Stress and Alters Lipid Metabolism. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158121, 2016.

PEREIRA, H. A. et al. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75343, 2013.

PESSAN, J. P. et al. Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. **J Dent Res**, v. 87, n. 5, p. 461-5, May 2008.

PETHE, S.; BOUCHER, J. L.; MANSUY, D. Interaction of anions with rat liver arginase: specific inhibitory effects of fluoride. **J Inorg Biochem**, v. 88, n. 3-4, p. 397-402, Feb 2002.

REITMAN, Z. J.; YAN, H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 13, p. 932-41, Jul 7 2010.

ROTHER, F.; BROSZ, M.; STORM-MATHISEN, J. Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. **Neuroscience**, v. 62, n. 4, p. 1133-46, Oct 1994.

ROY CHOWDHURY, S.; BANERJI, V. Targeting Mitochondrial Bioenergetics as a Therapeutic Strategy for Chronic Lymphocytic Leukemia. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 2426712, 2018.

SANTO-DOMINGO, J.; DEMAUREX, N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 907-12, Jun-Jul 2010.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1488-93, Mar 5 1999.

SCHMIDT, E.; SCHMIDT, F. W. [Distribution Pattern of Several Enzymes in Human Liver and Its Variations during Cell Damage. Iii. On the Methodology of Enzyme Determination in Human Organ Extracts and Serum]. **Enzymol Biol Clin (Basel)**, v. 35, p. 73-9, 1963.

SHAHED, A. R.; MILLER, A.; ALLMANN, D. W. Effect of fluorine containing compounds on the activity of glycolytic enzymes in rat hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 94, n. 3, p. 901-8, Jun 16 1980.

SHANTHAKUMARI, D.; SRINIVASALU, S.; SUBRAMANIAN, S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. **Toxicology**, v. 204, n. 2-3, p. 219-28, Nov 15 2004.

SHARMA, R.; TSUCHIYA, M.; BARTLETT, J. D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. **Environ Health Perspect**, v. 116, n. 9, p. 1142-6, Sep 2008.

SHERER, T. R.; SUTTIE, J. W. Effect of fluoride on glycolytic and citric acid cycle metabolites in rat liver. **J Nutr**, v. 100, n. 7, p. 749-56, Jul 1970.

SHEU, S. S.; NAUDURI, D.; ANDERS, M. W. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 256-65, Feb 2006.

SHIMADA, S. et al. Solubilization conditions for bovine heart mitochondrial membranes allow selective purification of large quantities of respiratory complexes I, III, and V. **Protein Expr Purif**, v. 150, p. 33-43, Oct 2018.

SMITH F, E. J. The occurrence and the chemistry of fluoride. **Fluoride in dentistry**, p. 17-26, 1996.

SPANAKI, C.; PLAITAKIS, A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. **Neurotox Res**, v. 21, n. 1, p. 117-27, Jan 2012.

STIRNIMANN, G.; KESSEBOHM, K.; LAUTERBURG, B. Liver injury caused by drugs: an update. **Swiss Med Wkly**, v. 140, p. w13080, 2010.

STRUNECKA, A. et al. Fluoride Interaction: From Molecules to Disease. **Curr Signal Transduct Ther**, v. 2, n. 3, p. 190-213, 2007.

STRUNECKA, A., PATOCKA, J., BLAYLOCK, E.L., CHINOY, N. J. Fluoride Interactions: From Molecules to Disease. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 2, p. 190-213, 2007.

SUN, L. et al. Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 38, n. 3, p. 1000-6, Nov 2014.

SUZUKI, M.; BANDOSKI, C.; BARTLETT, J. D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 89, p. 369-78, Dec 2015.

TREBERG, J. R. et al. Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. **Neurochem Res**, v. 39, n. 3, p. 516-26, 2014.

VAN PILSUM, J. F. et al. Simplified assay for transaminase activities of rat kidney homogenates. **Anal Biochem**, v. 35, n. 1, p. 277-86, May 1970.

VANDE VELDE, C. et al. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 15, p. 5454-68, Aug 2000.

VANDERCAMMEN, A.; VAN SCHAFTINGEN, E. Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. **Eur J Biochem**, v. 200, n. 2, p. 545-51, Sep 1 1991.

VISHWANATH, V. A. Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review. **Ann Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 51-5, Mar 2016.

VOETS, A. M. et al. Transcriptional changes in OXPHOS complex I deficiency are related to anti-oxidant pathways and could explain the disturbed calcium homeostasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 7, p. 1161-8, Jul 2012.

WANDERS, R. J. et al. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 479-94, Oct 2010.

WANG, H. W. et al. ATP5J and ATP5H Proactive Expression Correlates with Cardiomyocyte Mitochondrial Dysfunction Induced by Fluoride. **Biol Trace Elem Res**, v. 180, n. 1, p. 63-69, Nov 2017.

WANG, S. et al. AMPK α 1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 19976-85, Jun 25 2010.

WEI, Q. et al. A mini review of fluoride-induced apoptotic pathways. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 34, p. 33926-33935, Dec 2018.

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

XIONG, X. et al. Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. **Environ Res**, v. 103, n. 1, p. 112-6, Jan 2007.

XU, H. et al. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. **Toxicol Lett**, v. 160, n. 1, p. 69-75, Dec 30 2005.

YAN, Y.; XIE, X. Metabolic compensations in mitochondria isolated from the heart, liver, kidney, brain and white muscle in the southern catfish (*Silurus meridionalis*) by seasonal acclimation. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 183, p. 64-71, May 2015.

ZHOU, B. H. et al. Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. **Chemosphere**, v. 139, p. 504-11, Nov 2015.

ZHOU, K. et al. Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin. **Nat Genet**, v. 48, n. 9, p. 1055-1059, Sep 2016.

ZHU, Y. et al. Caspase cleavage of cytochrome c1 disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release. **Cell Res**, v. 22, n. 1, p. 127-41, Jan 2012.

ZUO, H. et al. Toxic effects of fluoride on organisms. **Life Sci**, v. 198, p. 18-24, Apr 1 2018.

*A***nnex**



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais

CEEPA-Proc. Nº 009/2017.

Bauru, 18 de agosto de 2017.

Senhora Professora,

Informamos que Projeto de Pesquisa denominado "**Análise proteômica das mitocôndrias de fígados de ratos expostos à exposição crônica por fluoreto em dois períodos experimentais**" tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi analisado e considerado APROVADO em reunião ordinária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), realizada nesta data.

Vigência do projeto:	<i>Outubro/2017 a Março/2019</i>
Espécie/Linhagem:	<i>Serão utilizadas amostras de mitocôndrias de fígados de Rato Wistar, já coletadas em estudo anterior (Proc. CEEPA nº037/2011)</i>
Nº de animais:	<i>Não se aplica.</i>
Peso/Idade	<i>Não se aplica.</i>
Sexo:	<i>Não se aplica.</i>
Origem:	<i>Não se aplica.</i>

Esta CEEPA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Cássia Maria Fischer Rubira
Profª Drª Cássia Maria Fischer Rubira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Participação em encontro científico

Nome do evento: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, São Paulo, Brazil, July 18th to 21th, 2018.

Apresentação de trabalho em forma de pôster: “Proteomic analysis of mitochondria of livers rats exposed to chronic fluoride exposure for 20 days “. **ARAUJO, T. T.**; SANCHES, C. C.; DIONIZIO, ALINE SALGADO; PEREIRA, HELOISA APARECIDA BARBOSA SILVA; BUZALAF, M.A.R.

Dexamethasone photodegradation and metabolite formation: an alternative to decrease the environmental impact. SANCHES, C. C.; PIPI, A. R.F.; XIMENES, V.F; SPAZZINI, F. C. R.; BERTOZO, L. C.; **ARAUJO, T. T.**; BUZALAF, CAMILA PERES.

Palestras assistidas durante o evento:

July 18th: Symp 1 – Cellular micro environments (Roger Chammas) / Advanced Microscopy (Hernandes Carvalho)/ Cell biology of neuroimmune interactions (Wilson Savino)/ Symp 5- Extracellular matrix (Marcelo Lamers)/ Symp 6 - RNA and cell Biology (Patrícia Coltri)/ Symp 7 – New genetic tools (Rodrigo Nunes da Fonseca)/ Symp 9 - Cell Migration (Claudia Mermelstein)/ Symp 10 - Cell proliferation & death.

July 19th : Cellular microenvironments (*Roger Chammas*; Luisa Iruela Arispe; Alexander Birbrair) / Regenerative medicine (*Silvyta Stuchi Maria-Engler*; Rafael Linden; San W Won Han) / Advanced Microscopy (*Hernandes F Carvalho*; *Gustavo Menezes*; Carlos Lenz Cesar) / Cell biology neuroimmune interactions (Wilson Savino; Carmem Gottfried; Hartmut Wekerle) / Extracellular matrix (*Marcelo Lamers*; Sérgio Felisbino; Vanessa Freitas) / RNA and Cell Biology (*Patrícia P Coltri*; Kirill Afonin; Jorg Kobarg) / New genetic tools in developmental biology (*Rodrigo Nunes Fonseca*; Helena Araújo; Federico Brown) / Glia and disease (*Flavia Gomes*; Flávia Lima; Dora Brites).

July 20th

Cellular and molecular mechanisms of tumor progression (*Luiz Eurico Nasciutti*; Sabrina Battista; Thereza C Barja- Fidalgo; Martin H Bonamino) / DNA damage, epigenetics and lncRNA (*Enilza M Espreafico*; Miriam Galvonas Jasiulionis; TBA) / Cells & Organelles (*Luis Lamberti*; Martin Lowe; Ana Cláudia Torrecilhas) / Chromatin remodelling and DNA repair (*Silvia Batistuzzo de Medeiros*; Michelle Debatisse; Nicolas Hoch) / Cell migration and differentiation (*Manoel L Costa*; Cristiano Coutinho; Roberta Escaleira; Flavio Zolessi).

July 21st: Conf 13 Emer Ferro/ Conf 14 TBA/ Conf 15 Anselmo Moriscot SBBC 40 years/
Conf 16 André Pupo/ Conf 17 Glauca Santelli/ Conf 18 Tiago Rodrigues.

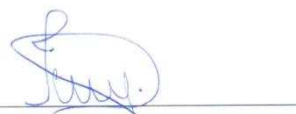
Artigos publicados em 2018-2019

ARAUJO, T. T.; PEREIRA, H. A. B. S.; DIONIZIO, A. S.; SANCHEZ, C. C.; CARVALHO, T. S.; FERNANDES, M. S.; BUZALAF, M. A. R. Changes in energy metabolism induced by fluoride: insights from inside the mitochondria. **CHEMOSPHERE (UNDER REVIEW)**.

MALVEZZI, MARIA APARECIDA PEREIRA NUNES; PEREIRA, HELOISA APARECIDA BARBOSA SILVA; DIONIZIO, A. S.; **ARAUJO, T. T.;** BUZALAF, NATHALIA RABELO; SABINO-ARIAS, ISABELA TOMAZINI; FERNANDES, MILENI SILVA; GRIZZO, LARISSA TERCILIA; MAGALHÃES, ANA CAROLINA; BUZALAF, MARILIA AFONSO RABELO. Low-level fluoride exposure reduces glycemia in NOD mice. **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY**, v. 168, p. 198-204, 2019.

DIONIZIO, A. S.; PEREIRA, HELOISA APARECIDA BARBOSA SILVA; **ARAUJO, T. T.;** SABINO-ARIAS, ISABELA TOMAZINI; FERNANDES, MILENI SILVA; OLIVEIRA, KARINA APARECIDA; RAYMUNDO, FABIELLE SALES; CESTARI, TÂNIA MARY; NOGUEIRA, FERNANDO NEVES; CARVALHO, RUI ALBUQUERQUE; BUZALAF, MARÍLIA AFONSO RABELO. Effect of Duration of Exposure to Fluoride and Type of Diet on Lipid Parameters and De Novo Lipogenesis. **BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH**, v. 1, p. 1-15, 2018.

BARBOSA SILVA PEREIRA, HELOISA APARECIDA; DIONIZIO, A. S.; **ARAUJO, T. T.;** DA SILVA FERNANDES, MILENI; IANO, FLÁVIA GODOY; BUZALAF, MARÍLIA AFONSO RABELO. Proposed mechanism for understanding the dose- and time-dependency of the effects of fluoride in the liver. **TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY**, v. 18, p. 1, 2018.



Tamara Teodoro Araujo

(Aluna)



Profa. Marília A. R. Buzalaf

(Orientadora)
