



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**“EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA DE
FLÚOR EN EL AGUA DE BEBIDA SOBRE EL
TRANSPORTE RENAL DE IONES Y LA
REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS”**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

LEZLY ROSAS PÉREZ

Bajo la Dirección de:
DR. OLIVIER CHRISTOPHE BARBIER



Pachuca de Soto, Hgo., Febrero 2009

ÍNDICE

Índice de Figuras y Tablas-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
I. RESUMEN-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
II. INTRODUCCIÓN-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
1. Flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
1.1. Perspectiva histórica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
1.2. Unidades comúnmente usadas para medir flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
1.3. Biomarcadores de exposición y de daño	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
1.4. Toxicocinética del flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
1.4.1. Absorción-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
1.4.2. Distribución	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
1.4.3. Biotransformación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
1.4.4. Excreción-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
1.5. Medios ambientales de exposición a flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
1.5.1. Aire-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
1.5.2. Agua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
1.5.3. Suelo-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
1.6. Usos más frecuentes de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
1.7. Principales fuentes de exposición a flúor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
1.8. Consideraciones dietéticas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
1.9. Limite permisible de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
1.10. Dosis Letal del flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
1.11. Toxicología-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
1.11.1. Daños generales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
1.11.2. Daños renales-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
2. Anatomía del riñón-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
2.1. Función renal y regulación de la homeostasis-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
2.2. Filtración glomerular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
2.3.-Reabsorción y secreción tubular: manejo renal de agua y electrolitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28

3. Metabolismo de Glucosa e Insulina	-	-	-	-	-	-	-	-	29
3.1. Glucosa-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
3.2. Insulina-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
3.3. Trastornos del metabolismo de la glucosa-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	-	-	-	-	-	-	-	-	33
IV. JUSTIFICACIÓN-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
V. OBJETIVOS-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
1. Objetivo general--	-	-	-	-	-	-	-	-	35
2. Objetivos específicos-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
VI. HIPOTESIS-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
VII. DISEÑO METODOLÓGICO--	-	-	-	-	-	-	-	-	37
1. Grupos experimentales e intoxicación subcrónica con flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	37
2. Proceso quirúrgico experimental-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
3. Obtención de muestras biológicas-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
3.1. Obtención y conservación de muestras de orina--	-	-	-	-	-	-	-	-	38
3.2. Obtención y conservación de muestras de plasma-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
4. Cuantificación de Creatinina (Método Jaffe sin desproteinización)-	-	-	-	-	-	-	-	-	39
5. Cuantificación de Glucosa (Método Hexocinasa)-	-	-	-	-	-	-	-	-	39
6. Cuantificación de Fosfatos (Método de Chen)-	-	-	-	-	-	-	-	-	41
7. Cuantificación de Insulina (Método por ELISA)-	-	-	-	-	-	-	-	-	42
8. Cuantificación de Flúor (Método del potenciómetro con electrodo selectivo)	-	-	-	-	-	-	-	-	43
9. Cuantificación de la proteinuria (Método de Bradford)-	-	-	-	-	-	-	-	-	44
10. Cuantificación de la osmolalidad (Método del osmometro de presión de vapor)	-	-	-	-	-	-	-	-	45
-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
11. Determinación de los parámetros funcionales renales	-	-	-	-	-	-	-	-	45
11.1. Depuración de creatinina y aproximación de la velocidad de filtración glomerular (VFG)-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
11.2. Flujo urinario	-	-	-	-	-	-	-	-	46
11.3. Depuración osmolal	-	-	-	-	-	-	-	-	46
11.4. Excreción fraccional de fosfatos y de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	46

12. Análisis estadístico-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47
VIII. RESULTADOS-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
1. Estado general de los animales y peso corporal-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
2. Volumen de agua ingerida-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
3. Presión Arterial-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
4. Flujo urinario-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
5. Creatinina plasmática y Velocidad de Filtración Glomerular-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
5.1. Creatinina plasmática-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
5.2. Velocidad de Filtración Glomerular (VFG) -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
6. Depuración osmolal (C _{Osm})-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
7. Glucosa e Insulina-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54
7.1. Glucosa plasmática y urinaria-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54
7.2. Insulina -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54
8. Fosfatos-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
8.1. Fosfatos en plasma y orina -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
8.2. Excreción fraccional de fosfatos-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
9. Niveles de Flúor--	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
9.1. Flúor en plasma y en orina-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
9.2. Excreción fraccional de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
10. Proteinuria-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
IX. DISCUSIÓN-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61
X. CONCLUSIÓN-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68
XI. REFERENCIAS-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Átomo de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Figura 2. Áreas de exposición a flúor en México	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Figura 3. Estructura macroscópica del riñón-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
Figura 4. Estructura de la nefrona-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Figura 5. Esquema general de la nefrona-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
Figura 6. Esquema del metabolismo de glucosa-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
Figura 7. Volumen de agua ingerida-	-	-	-	-	-	-	-	-	49
Figura 8. Media de la Presión Arterial-	-	-	-	-	-	-	-	-	49
Figura 9. Flujo urinario-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
Figura 10. Concentración plasmática de creatinina-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
Figura 11. Velocidad de filtración glomerular-	-	-	-	-	-	-	-	-	52
Figura 12. Depuración Osmolal-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
Figura 13. Concentraciones plasmática (A) y urinaria (B) de glucosa-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
Figura 14. Concentración plasmática de insulina-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
Figura 15. Concentración plasmática (A) y urinaria (B) de Fosfatos-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
Figura 16. Excreción fraccional de Fosfatos-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
Figura 17. Concentraciones plasmática (A) y urinaria (B) de flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	59
Figura 18. Excreción fraccional de flúor--	-	-	-	-	-	-	-	-	59
Figura 19. Proteinuria-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
Tabla 1. Unidades comúnmente usadas para medir flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Tabla 2. Niveles de fluoruro en jugos de frutas-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
Tabla 3. Contenido de flúor en alimentos más consumidos en México-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
Tabla 4. Ingestión Dietética Diaria Segura y Adecuada estimada para Flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Tabla 5. Estudios realizados con evidencia del efecto tóxico del flúor-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
Tabla 6. Concentraciones urinarias y plasmáticas de algunas sustancias de importancia fisiológica-	-	-	-	-	-	-	-	-	27

I. RESUMEN

El consumo de agua con alto contenido de flúor (F^-) es endémico en por lo menos 25 países del mundo, incluyendo México. Se ha demostrado que esta situación es responsable de problemas importantes de salud principalmente como fluorosis esquelética e insuficiencia renal en los casos mas graves. Si bien el papel de la insuficiencia renal sobre la agravación de la toxicidad ósea del flúor ha sido bien descrito, las consecuencias directas de la exposición a flúor sobre la función renal no se han estudiado en detalle. Sin embargo por sus características físico-químicas y por los datos obtenidos durante trabajos preliminares, se puede pensar que el flúor interactúa de manera muy fina con los mecanismos de regulación de la homeostasis. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó la función renal en rata Wistar expuesta de manera subcrónica a 2.5mg flúor/kg/día por vía oral durante 4 semanas. Los resultados obtenidos demuestran que el flúor provoca cambios significativos: 1) desde la primera semana de exposición, en los principales parámetros de la función renal: incremento de la proteinuria, en la excreción fraccional de fosfatos y disminución velocidad de filtración glomerular; 2) en la presión arterial: aumento de la presión arterial a partir de la segunda semana de exposición; 3) en el metabolismo basal de glucosa: incremento en la concentración plasmática de glucosa y disminución de los niveles plasmáticos de insulina desde la primera semana de exposición. En conclusión, las informaciones obtenidas en este estudio son de gran relevancia porque permiten relacionar directamente el consumo de agua contaminada con flúor con la aparición de enfermedades renales, de hipertensión y de un síndrome pre-diabético anunciando el posible desarrollo de diabetes de tipo II. Estos datos podrían explicar la alta prevalencia de estas patologías en numerosas poblaciones del norte de la Republica Mexicana.

Palabras clave: flúor, tóxico, riñón, homeostasis.

SUMMARY

The water consumption with high fluoride content (F-) is endemic in at least 25 countries in the world, including Mexico. It has been shown that this situation is responsible for major health problems, like skeletal fluorosis first and like kidney failure in more severe cases. The role of renal failure on the aggravation of the bone damages during fluoride exposure has been well described, the effect of the exposure to fluoride on the renal function have not been studied into all the details. Nevertheless, viewing its physical and chemical properties and the information collected during preliminary work, it could be proposed that the fluoride subtly interact with the mechanisms responsible for the regulation of homeostasis. Therefore, in this study we studied the renal function in Wistar rats exposed orally to 2.5mg fluoride/kg/day during 4 weeks. Our results demonstrate that fluoride causes significant changes: 1) of the main parameters of renal function: increase in proteinuria, in fractional excretion of phosphates and decrease in glomerular filtration rate since the first week of exposure; 2) of the arterial blood pressure: increase since the second week of exposure, 3) of the metabolism of glucose: increase in the plasmatic concentration of glucose and decrease in plasmatic levels of insulin since the first week of exposure. In conclusion, the information obtained in this study is very important because it allows connecting directly the consumption of contaminated water with fluoride with the appearance of renal diseases, hypertension and pre-diabetic syndrome announcing the possible development of type II diabetes. This data could explain the high prevalence of these pathologies in populations living in the North states of the Mexican Republic.

Key words: fluoride, toxic, kidney, homeostasis.

II. INTRODUCCION

1. Flúor

El flúor (del latín *fluo*, que significa 'flujo') de símbolo F es el decimo tercer elemento químico más abundante, es distribuido generalmente por toda la tierra (Withford, 1989). A concentraciones normales de temperatura y de presión, el flúor se presenta como diflúor (F_2), un gas biatómico de color amarillo pálido a verde, de olor penetrante. El número atómico del flúor es 9 y su peso molecular es 18.9984 g/mol. Se encuentra en la familia de los halógenos (grupo 17) y es el más electronegativo de los elementos de la tabla periódica (Figura 1). Los halógenos que son Flúor, Cloro, Bromo, Yodo, Astató, pueden reaccionar con elementos poco electronegativos o grupos químicos y formar una amplia variedad de compuestos halogenados inorgánicos y orgánicos (Finger, 1961). El flúor no se encuentra en forma libre en la naturaleza; esto ocurre sólo en combinación con otros elementos. Se combina con metales para producir fluoruros tales como el fluoruro de sodio y el fluoruro de calcio, ambos sólidos de color blanco (ATSDR, 2003). El flúor existe como ion fluoruro o como ácido fluorhídrico (HF) en los líquidos del cuerpo (NRC, 1993). Sin embargo, alrededor de 99% del flúor total del cuerpo se encuentra en tejidos mineralizados en forma de fluoroapatita (Nielsen, 2002).

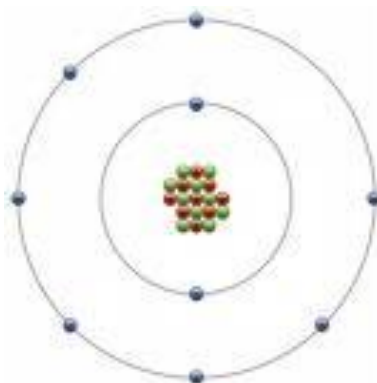


Figura 1. Átomo de Flúor. Número atómico 9, peso molecular es 18.9984, el más electronegativo de los elementos químicos de la tabla periódica.

1.1. Perspectiva histórica

El flúor, como nutrimento atrajo por primera vez la atención durante la década de 1930, cuando su forma iónica, el fluoruro, se identificó como causante de la aparición de manchas en el esmalte de los dientes conocida como “tinción colorado marrón”. Investigaciones durante la primera mitad del siglo XX condujeron a los primeros procesos de fluoración en el agua con fluoruro de sodio como una medida de salud pública iniciado en 1945 (Sognaes, 1979). Durante la década de 1960 se estableció una relación entre ingestión alta de flúor y reducción en la incidencia de osteoporosis. A principios de la década de 1970, los científicos sugirieron que el flúor era necesario para la hematopoyesis, la fertilidad y el crecimiento en ratas y ratones, sin embargo, esta sugerencia se basó en experimentos en los cuales los animales no fueron alimentados con dietas óptimas. Más tarde se concluyó que el flúor afecta la hematopoyesis, fertilidad y crecimiento mediante mecanismos farmacológicos (Nielsen, 2002).

1.2. Unidades comúnmente usadas para medir flúor

Las concentraciones de flúor en fluidos corporales son medidas con un electrodo específico de flúor, este instrumento no puede medir confiablemente concentraciones por debajo de 0.019mg/L y tiende a sobre estimar concentraciones más bajas (Whitford 1996; NRC, 1993).

El valor numérico de las concentraciones de plasma en ayuno de adultos sanos cuya principal fuente de exposición a flúor es la dieta aproximadamente igual a la del agua potable, las concentraciones en plasma siempre será expresado como $\mu\text{mol/L}$ y las concentraciones de agua como mg/L o ppm (Guy y col., 1976). Por lo tanto, las concentraciones de plasma de una persona en ayuno cuyo agua contiene 1.0 ppm podría ser cerca de 1.0 $\mu\text{mol/L}$ si el agua contiene 2.0 ppm, entonces las concentraciones en plasmas podrían ser mas o menos 2.0 $\mu\text{mol/L}$ las variaciones alrededor de estos valores podrían ser debidas en gran parte a diferencias individuales en la velocidad de eliminación del flúor por el riñón y el esqueleto. En la

tabla 1 se muestran las unidades de medida que son usadas para expresar la exposición a flúor.

Tabla 1. Unidades comúnmente usadas para medir flúor.

MEDIO	UNIDAD	EQUIVALENTE
Agua	1ppm	1mg/L
Plasma	1 μ mol/L	0.019mg/L
Hueso	1ppm	1mg/kg

1.3. Biomarcadores de exposición y de daño

Los marcadores biológicos o biomarcadores, en términos generales se definen como indicadores de variaciones en células o en componentes, procesos bioquímicos, en estructuras o en funciones que pueden ser medidos en sistemas biológicos. A menudo son categorizados por que indican exposición a un agente, un efecto de exposición o una susceptibilidad a los efectos de exposición (NRC 1989).

Para estimar las concentraciones de exposición a flúor, se utilizan como biomarcadores un número de tejidos y fluidos, incluyendo dientes, huesos, uñas, orina, sangre o plasma, saliva y leche materna (Vine 1994; Whitford, 1994^a; ATSDR, 2003). Sin embargo, el flúor en orina es generalmente usado como el principal indicador de ingesta y exposición a flúor (Jaramillo y Rodríguez, 2006).

También existen marcadores de daño que pueden ser usados en la identificación del peligro, en la evaluación de la exposición a los xenobióticos y para asociar una respuesta biológica con la probabilidad de que aparezca una enfermedad.

Algunos de estos biomarcadores de daño renal son:

- a) Marcadores funcionales:** concentración de creatinina en sangre y presencia de proteínas de alto y bajo peso molecular en la orina (albúmina, β_2 -microglobulina, transferrina e inmunoglobulina G).

La creatinina es adoptado como un indicador del cambio de velocidad de filtración glomerular o función glomerular (Willis y col., 1976).

b) Marcadores de citotoxicidad: enzimas en la orina (α -glutathion-S-transferasa (α -GST), alanina amino transferasa (ALA), N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y antígenos tubulares.

La α -GST es una enzima citosólica, la cual ha sido probada a ser un marcador de químicos que induce daño tubular, particularmente en el segmento S3 del túbulo proximal (Feinfeld y col., 1976; Khalil-Manesh y col., 1992). La NAG es una de las enzimas lisosomales, la cual ha sido aceptada como un marcador clínico de lesión tubular renal (Wellwood y col., 1975; Khalil-Manesh y col., 1992).

c) Marcadores bioquímicos: excreción urinaria de prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , TXB_2) y actividad de calicreína.

d) Marcadores celulares: presencia de células renales vivas y podocitos en el sedimento urinario (Jaramillo y Rodríguez, 2006).

1.4. Toxicocinética del flúor

La toxicocinética del flúor depende importantemente del pH y de su capacidad de almacenamiento en tejidos duros como son hueso y dientes. El HF difunde a través de la membrana celular mucho más fácilmente que los iones de flúor. Ya que el HF es un ácido débil con pKa de 3.4. Sin embargo, el fluoruro se presenta en forma de HF cuando el pH es menor. Consecuentemente el pH y factores que afectan este juegan un papel importante en la absorción, distribución y excreción de flúor (Whitford, 1996).

1.4.1. Absorción

La cantidad de flúor contenido en el organismo humano oscila entre 2.6 y 4 g en un individuo adulto de 70 kg de peso. La absorción mineral desde la dieta oscila entre 40 y 100%, alcanzándose cifras en plasma de entre 2 y 10 mg/L combinado con albúmina plasmática dependiendo de la forma y el método de administración (Martínez, 2002).

Numerosos estudios tanto en animales como en humanos, han mostrado que la ingesta de flúor es absorbida rápida y fácilmente desde el tracto gastrointestinal, debido a la ausencia de altas concentraciones de ciertos cationes, tal como el calcio, magnesio y aluminio que forman compuestos insolubles con el flúor, alcanzando los niveles máximos de F^- en plasma a los 30 minutos después de la ingestión (Mc Clure y col., 1945; Carlson y col., 1960; Ekstrand, 1977; Ekstrand y Koch G., 1980, Ekstrand y Ehrnebo M., 1983; Spencer y col., 1981; Whitford y Pashley, 1984). Por ejemplo, el hidróxido de aluminio, que se utiliza con frecuencia como antiácido, inhibe notablemente la absorción de flúor (Nielsen, 2002).

En general se considera que la absorción de flúor tiene lugar por difusión pasiva en la forma de molécula no disociada, HF, y guarda una relación inversa con el pH (Singer y Ophaug, 1982; Barbacow, 1983; Whitford y Pashley, 1984) por lo tanto, los factores que promueven la secreción gástrica ácida incrementan la tasa de absorción (Nielsen, 2002). La difusión como HF en el interior del intestino delgado es menos probable debido a su elevado pH. En el intestino delgado, la concentración de HF sería muy baja y el gradiente pequeño. Por el contrario, la concentración y el gradiente de flúor serían altos. Los fluoruros solubles, como el fluoruro de sodio se absorben casi por completo (Nielsen, 2002).

1.4.2. Distribución

Una vez que el flúor es absorbido ya sea por ingestión, inhalación o absorción dérmica, pasa dentro de la sangre para su distribución por todo el cuerpo y para su excreción parcial. Es rápidamente distribuido por circulación sistémica a los líquidos intracelular y extracelular de los tejidos. Más del 90% de la carga corporal total es retenida en huesos y diente. Aunque en menor cantidad el flúor también es acumulado en tejidos como: hígado, riñón, cerebro, testículos, suero y orina (Inkielewicz y Krechniak, 2003).

La concentración máxima depende de la cantidad ingerida, la velocidad de absorción, volumen de distribución y de la velocidad de eliminación del flúor desde el plasma por los riñones y el esqueleto (Whitford, 1994^b).

1.4.3. Biotransformación

Una vez absorbido, una porción del fluoruro es depositado en el esqueleto y los restos son excretados en la orina, heces, sudor y saliva dentro de 24 horas (McClure y col., 1945; Dinman y col., 1976). Este secuestro esquelético y la excreción renal son las dos principales maneras por las cuales el cuerpo previene la circulación de cantidades tóxicas del ión fluoruro (Hodge, 1961). Los fluoruros forman un precipitado insoluble con el calcio (cálculos renales) y disminuyen el calcio del plasma (Dreisbach, 1983). El fluoruro se incorpora en la apatita, un fosfato de calcio básico mineral con una fórmula teórica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, por sustitución de la fracción hidroxilo (OH^-) y posiblemente al ión bicarbonato (HCO_3^-) que ocurre debido a que F^- y OH^- poseen radio iónico similar y comparten la misma carga y número de hidratación primario (Nielsen, 2002) (McCann y Bullock, 1957; Neuman y col., 1950). El material resultante es la hidroxifluorapatita.

Se ha observado una disminución de la biotransformación del metabolismo fundamentalmente en el hígado y posiblemente en otros tejidos en forma de CO_2 , ácidos orgánicos, y como ion flúor libre (F^-) (Dahlgren, 1979; Singer y Ophaug, 1982).

1.4.4. Excreción

La eliminación de flúor de la circulación ocurre de manera principal mediante dos mecanismos: excreción renal y depósito en tejidos calcificados.

Algunos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, han encontrado que la eliminación renal de flúor es directamente relacionado a la velocidad de filtración glomerular (Spak y col., 1985), al pH urinario (Whitford y col., 1976), y bajo algunas condiciones, la velocidad del flujo (Chen y col., 1956). La excreción renal es la ruta predominante para eliminar el flúor inorgánico desde el cuerpo y se relaciona de manera directa con el pH urinario así que una disminución en el pH urinario (acidosis) disminuye la excreción urinaria de flúor, mientras que alteraciones que incrementan el pH (alcalosis) incrementa la excreción urinaria de este (Whitford y col., 1976; Singer y Ophaug, 1982; Jamberg y col., 1983); algunos de estos factores que también han

mostrado afectar el balance metabólico y la concentración de flúor en tejidos son la dieta, fármacos, trastornos metabólicos o respiratorios y la altitud del sitio de residencia. (Nielsen, 2002; Whitford, 1994b; 1989). El flúor es libremente filtrado por capilares glomerulares y entonces sufre un grado variable de re-absorción tubular (Whitford y Johnson, 2003). Aproximadamente 50% de la ingesta diaria de flúor es eliminado por los riñones (Nielsen, 2002). La inhalación de flúor orgánico por medio de anestésicos tal como: metoxiflurano, enflurano, y halotano, son excretados antes que todos (Chenoweth y Hake, 1962). Algunos estudios han mostrado que el flúor también puede ser excretado en otros fluidos corporales, incluyendo sudor, saliva, leche materna y jugos digestivos. La excreción por todas estas rutas es usualmente menor que la eliminación renal, pero la excreción en sudor quizá sea 15-25% del flúor eliminado por el cuerpo; y si el sudor es excesivo por mucho sería un 50% (Van Rensburg, 1979; Ekstrand y col., 1984a, 1984^b).

Se ha demostrado que la excreción fecal de flúor en ratas podría ser incrementada significativamente por dos maneras: primera, por concentraciones elevadas de flúor en plasma; y segunda, por altas concentraciones de calcio en la dieta (Whitford y Augeri, 1993; Whitford, 1994^b).

La depuración renal de flúor es alta comparado con otros halógenos, ya que la eliminación de cloro, yodo y bromo en adultos jóvenes son generalmente menos de 1 o 2 mL/min, mientras que el flúor es mas o menos de 35mL/min (Whitford, 1994^b).

1.5. Medios ambientales de exposición a flúor

Los fluoruros se han identificado en una variedad de medios ambientales como son: aire, aguas superficiales, lixiviados, aguas subterráneas, suelo y sedimento.

1.5.1. Aire

El flúor (tanto hidrogeno de flúor, partículas de fluoruros o gas fluoruro) es liberado en la atmósfera por fuentes naturales como volcanes y por numerosas fuentes antropogénicas. En adición a fluoruro de hidrogeno, los gases volcánicos también contienen otros componentes de flúor, como son tetrafluorosilano (SiF₄),

ácido hidrofúosilícico (H_2SiF_6) y diflúor (F_2) (ATSDR, 2003). Los fluoruros también pueden entrar en la atmosfera en polvo y aerosoles procedentes de la fabricación y el uso de plaguicidas tal como fluoruro de sodio, fluorosilicato de sodio, bario fluorosilicato y criolita (NAS, 1971).

1.5.2. Agua

El flúor se encuentra de manera natural en el sistema de agua potable como resultado de residuo líquido contenido en las rocas y en la tierra filtrado desde agua subterránea (EPA, 1980; NAS, 1971). De aproximadamente 10 millones de estadounidenses con suministros de agua pública naturalmente fluorada en 1992, el 67% tiene concentraciones de flúor menor o igual 1.2 mg/L, el 14% tiene concentraciones de flúor entre 1.3 y 1.9 mg/L, otro 14% tiene entre 2 y 3.9 mg/L; 2% (más de 200,000 personas) tiene concentraciones naturales de flúor igual o más de 4 mg/L (CDC, 1993). Y se considera que más de 20 millones de mexicanos ingieren agua con concentraciones de F^- superiores al valor normativo (1.5 mg/L) (Figura 2).

± 20,000,000 mexicanos expuestos a flúor (CNVE, salud, 2003)

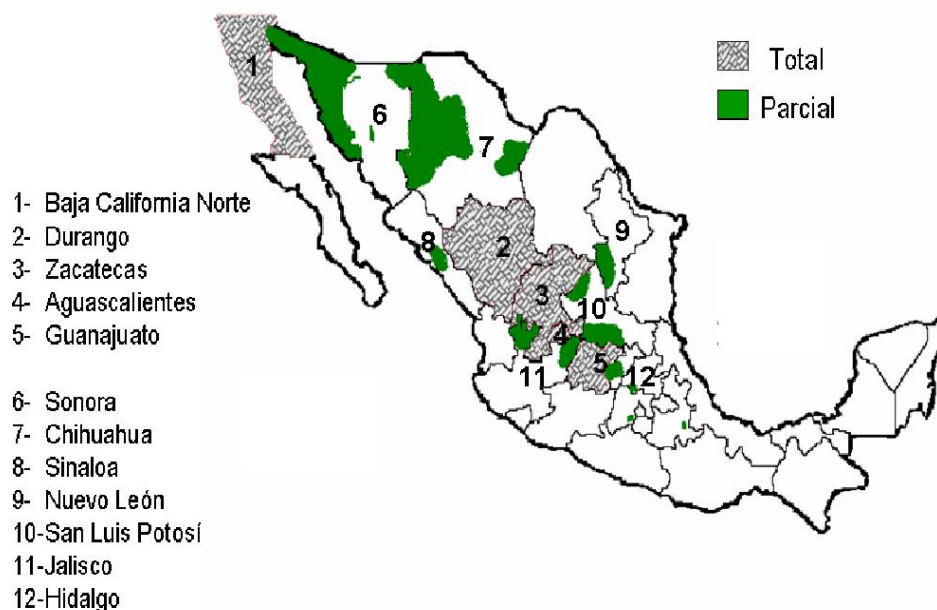


Figura 2. Áreas de exposición a flúor en México. En los estados señalados con color rojo el flúor es un problema para toda la población; en verde son los estados donde el flúor se encuentra solamente en algunos lugares.

La concentración natural del fluoruro en el agua depende de muchos factores en los que se incluyen las características físicas, químicas y geológicas del suelo, la consistencia y porosidad de las rocas, el pH del medio, la acción acomplejante de otros elementos y la profundidad de los niveles de agua cuando se trata de pozos (ATSDR, 1993).

La ingestión de agua contaminada con flúor, es endémica por lo menos en 25 países, incluido México, en los estados de Sonora, San Luis Potosí, Aguascalientes, Chihuahua y la Comarca Lagunera se presentan acuíferos con concentraciones superiores al límite máximo permisible aceptado por el NOM (Vega).

En un estudio realizado en San Luis Potosí, México, se demostró que la prevalencia y severidad de fluorosis dental encontrada en los niños fue debido a un incremento en la concentración de F^- en el agua (Grimaldo y col. 1997). Se ha informado que la ingestión de grandes cantidades de fluoruros (5-20 mg/d) pueden producir severas deformidades en el esqueleto y se ha observado que en concentraciones de 4 mg F^-/L en el agua potable existe un mayor riesgo de fracturas de cadera (WHO, 1996).

1.5.3. Suelo

El flúor en la tierra podría ser una fuente de exposición de ingesta involuntaria, principalmente para niños. Las concentraciones típicas de flúor en la tierra en EU están en un rango que va desde muy bajo (<10 ppm) hasta muy alto de un 3% a 7% en áreas con altas concentraciones de flúor contenidas en minerales (ATSDR, 2003). Algunos minerales que contienen fluoruro incluyen biotita, moscovita, apatita y fluorita (NAS, 1971).

1.6. Usos más frecuentes de flúor

El fluoruro de hidrógeno es el componente más importante del flúor. El anhídrido de ácido fluorhídrico es usado en la producción de algunos químicos que contienen flúor. Este es usado en la producción de refrigerantes, herbicidas, farmacéuticos,

aluminio, plásticos, componentes eléctricos y bombillas fluorescentes (Hance y col. 1997).

El flúor es usado para la producción de varios fluoruros inorgánicos. El producto más importante es el hexafluoruro de uranio (UF_6), el cual es usado en procesos de difusión gaseosa para la producción de uranio-235 para la industria nuclear. Este uso consume de 70-80% de la producción de flúor. Otros usos de flúor incluyen: el tratamiento de contenedores de poliolefina, para reducir su permeabilidad a líquidos orgánicos; en el tratamiento de un polímero de superficie, para la aplicación de un adhesivo o revestimiento y para la producción de algunos compuestos orgánicos fluorados (Guo y col., 2001; Shia 1994).

Los productos químicos más comúnmente utilizados en los abastecimientos de agua en América para la fluoración del agua son: ácido fluorosilícico, silicofluoruro de sodio y fluoruro de sodio (Urbansky, 2002). En adición al uso en la fluoración en los suministros de agua, el NaF es usado como un pesticida para cucarachas y hormigas, como un componente en cristales, glaseado de vidrio, removiendo el HF para reducir la contaminación, como un buen conservante o como un desgasificador de agentes de acero (Budavari, 1989).

1.7. Principales fuentes de exposición a flúor

La fuente de exposición cotidiana más común y abundante de este mineral es el agua potable, tanto por su volumen ingerido como por la posible riqueza en flúor de ciertas aguas de consumo (Loyola y col., 1998). Generalmente, 1.5-2.2 mg de fluoruros de sodio es adicionado por litro de agua cuando el valor normal oscila de 0.7-1.5 mg F-/L (Mueller, 1994). Así mismo es necesario tomar en cuenta que el agua no es ingerida únicamente como bebida, sino también formando parte de los alimentos tras su cocinado y como parte de otras bebidas comerciales (aguas de garrafón, refrescos, cervezas, complementos dietéticos, jugos de fruta industriales, etc.)(Loyola y col., 1998). Un estudio realizado en San Luis Potosí, por Loyola y col., 1998 en donde evaluaron la concentración de fluoruro en jugos de frutas (Tabla 2) que se consumen en esta ciudad mostró que los niveles de flúor tuvieron un rango de

1.32-4.40ppm independientemente de la fruta utilizada para la elaboración del jugo, lo cual indica, que el nivel de flúor no depende del sabor de la fruta y sugiere que el agua usada en la elaboración del jugo tiene altas concentraciones de flúor.

Tabla 2. Niveles de fluoruro en jugos de frutas

Niveles de fluoruro en jugos de frutas. México 1997			
Sabor	n	x ± DE	Rango
Naranja- papaya	5	1.51±0.26	1.32-1.81
Frutas tropicales	5	1.48±0.07	1.48-1.62
Frutas mixtas	5	1.74±0.15	1.57-1.86
Manzana	5	1.81±0.11	1.68-1.90
Uva	5	2.00±0.19	1.81-2.20
Naranja-zanahoria	5	2.16±0.34	1.85-2.53
Naranja- manzana	5	2.13±0.16	1.96-2.28
Naranja	5	2.19±0.77	1.46-3.00
Piña-zanahoria	5	2.50±1.09	1.30-3.42
Uva-manzana	5	3.15±1.00	2.10-4.11
Pera	5	3.43±0.86	2.74-4.40

Loyola, 1998.

También, hervir el agua constituye un riesgo debido a que se incrementa en cerca del 66% la concentración inicial de flúor por la pérdida de volumen durante el proceso de ebullición (Loyola y col., 1998; Grimaldo y col., 1997)

Los alimentos generalmente contienen niveles bajos de fluoruros a menos que sean cultivados en áreas donde los suelos tienen cantidades altas de fluoruros o donde se usaron abonos con fosfatos (ATSDR, 2003). El mayor contenido de flúor de los alimentos corresponde al té y el pescado especialmente si se consume con hueso (Ej. sardinas en lata). En cualquier caso es un elemento, escasamente impreso en muchas de las tablas de composición de alimentos de uso más frecuente, por lo cual los datos sobre contenidos exactos en los alimentos son a menudo poco fiables (Martínez, 2002). La tabla 3, muestra el contenido de flúor en algunos alimentos consumidos en México. Otra fuente de exposición cotidiana a flúor es en productos dentales (pasta de dientes, suplementos de flúor, enjuague bucal, etc.). La

exposición interna a fluoruros también puede ocurrir desde la inhalación (humos de cigarro, emisiones industriales) y absorción dérmica (desde químicos o farmacéuticos) (NRC, 2006).

Un estudio realizado en los altos de Jalisco, México, indica que la fuente principal de flúor para los bebés es el agua de la llave; para los niños los tres factores de riesgo más importantes son el agua de la llave, sal de mesa y las pastas dentales; para los adultos la fuente principal de flúor son la sal de mesa y el agua de la llave (Hurtado y Gardea, 2005).

Tabla 3. Contenido de flúor en alimentos más consumidos en México.

Alimentos	Flúor µg/100g	Alimentos	Flúor µg/100g
Arroz	10-67	Almendras	90
Avena	25	Avellanas	30
Harina de trigo	27-35	Queso	16-160
Berro	100	Carne de res	29-200
Acelgas	20	Carne de cerdo	34-98
Guisantes	60	Cordero	120
Rábano	80	Pollo	140
Zanahoria	40	Ternera	90
Soja	130	Arenque ahumado	350
Ciruela	21	Bacalao fresco	700
Melón	20	Ostras	65
Pomelo	36	Huevo	120
Café	20-160	Té	200

Tabla de composición de alimentos: Jiménez Cruz A, 1990.

1.8. Consideraciones dietéticas

Aunque, en general, el flúor no se considera como un elemento esencial para los humanos, aún se clasifica como benéfico. El Food and Nutrition Board estableció los siguientes ESADDI (Ingestión Dietética Diaria Segura y Adecuada estimada) para flúor (Tabla 4) (Nielsen, 2002).

Tabla 4. Ingestión Dietética Diaria Segura y Adecuada estimada para Flúor

Edad	Cantidad recomendada
Lactantes de 1-6 meses	0.1 a 0.5 mg de flúor
Lactantes de 6 meses a 1 año	0.2 a 1mg de flúor
Niños de 1-3 años	0.5 a 1.5mg de flúor
Niños de 4-6 años	1 a 2.5 mg de flúor
Niños mayores de 7 años	1.5 a 2.5 mg de flúor
Adultos	1.5 a 4 mg de flúor

Nielsen, 2002

1.9. Límite permisible de flúor

A concentraciones elevadas, el flúor tiene efectos nocivos en la salud humana, en consecuencia se establece un valor referencial de la concentración límite que el agua potable puede contener para su uso seguro. En México, este límite máximo permisible se encuentra especificado en la norma de salud ambiental que implanta la calidad del agua potable, “NOM-127-SSAI-1994 Salud Ambiental – agua para uso y consumo humano” que es 1.5 mg/L de agua (Vega) (Hurtado y Gardea, 2005).

1.10. Dosis Letal del flúor

La dosis mortal del fluoruro de sodio es de 5-10 g en el adulto (32-64 mg de F⁻/kg de peso) y 500 mg para niño (Dreisbach, 1983). La LD₅₀ de Flúor en ratones hembra es de 51.6 mg/kg/d (Lakshmi, 2000). Y para ratas es de 52 mg/kg/d (RTECS, 1991).

1.11. Toxicología

Las revisiones acerca de la toxicidad de flúor indican que en muchas partes del mundo se ha reportado intoxicación crónica debida a ingestión excesiva, sobre todo a través del suministro de agua y mediante exposición industrial (Nielsen, 2002). El efecto tóxico de los fluoruros depende no únicamente del tiempo de exposición, sino que también se encuentra asociado a otros factores como son el estado nutricional, la función renal y las interacciones con otros elementos, particularmente el calcio (Grijalva y col., 2001). Se ha visto que la intoxicación por flúor se da principalmente en la mitocondria de célula en humanos (Cittanoval y col., 1996). Se ha descrito que los homólogos tóxicos (flúor, cadmio, platino, arsénico, níquel, mercurio, etc.) podrían utilizar las mismas vías de transporte a nivel renal que los elementos esenciales como el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio, los cloruros o los fosfatos. Así, los tóxicos inducen efectos nocivos propios, pero también entran en competencia con los “no-tóxicos”, para causar a corto plazo deficiencias en oligoelementos y a mediano plazo una insuficiencia renal (Shashi y col., 2002).

Los signos y síntomas de intoxicación aguda con flúor son náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, salivación y lagrimeo excesivo, trastornos pulmonares, insuficiencia cardíaca y debilidad, convulsiones, trastornos sensoriales, parálisis y coma (Laguna y Piña, 1990). En la tabla 5 se muestran las dosis y efectos ocasionados por la toxicidad del flúor, en estudios realizados en animales.

Tabla 5. Estudios realizados con evidencia del efecto tóxico del flúor.

Dosis	Modelo Experimental	Efecto	Referencia
3 mL NaF/kg en 13mL de solución salina. Vía intravenosa. Cerca de 30 min.	- Ratas Wistar machos	-aumento en los niveles de α -GST (α -Glutation peroxidasa).	- Dote y col., 2000.
100 mg	- Ratones	-disminución en niveles de ALA (alanina amino transferasa) y AAT (Aspartato amino transferasa) en hígado y riñón.	- Bogin y col., 1976.
30mg NaF/L en agua. Vía oral. Durante 4 meses.	-Ratas Wistar hembras	-incremento en la peroxidación lipídica en tejido renal.	- Karaoz y col., 2004.
0.5 ml de agua destilada con 25mg F/L/rata/d. Durante 16 semanas.	- Ratas Wistar machos	-necrosis celular en hepatocitos. -necrosis en parte del glomérulo renal.	- Shanthakumari y col., 2004.
20 μ mol/L NaF agudo durante perfusión pancreática in vivo	-Ratas	-inhibe la secreción de insulina.	-Menoyo y col., 2005.
40mg NaF/kg/d. en agua. A partir del día 6 de gestación y durante la lactancia.	- Ratas Wistar hembras	-disminución en niveles de calcio y fósforo en plasma.	-Verma y Guna, 2002.

1.11.1. Daños generales

La exposición aguda o crónica a altos niveles de flúor ha sido asociada con fluorosis dental (Blussry, 1970; Boiving y col., 1989), fluorosis esquelética y discapacidad locomotora en humanos (Gupta y col., 1993) y en ganado (Botha y col.,

1993) debido a la fuerte afinidad que tiene por tejidos calcificados (Kunzel y Fischer, 1997; Krook y Minor, 1998; Bohatyrenicz, 1999).

Recientes estudios han mostrado que la acumulación de flúor en el hipocampo del cerebro causa degeneración de neuronas y disminuye el metabolismo aeróbico (Sharma y Chinogy, 1998) y alteraciones en radicales libres del metabolismo de hígado, riñón y corazón (Sharma y Chinoy, 1998; Patel y Chinoy, 1998; Sun y col., 1998), lo cual quizá interfiere con sus funciones fisiológicas (Lakshmi, 2000). El flúor y los fluoruros actúan como venenos celulares directos interfiriendo con el metabolismo del calcio y los mecanismos enzimáticos (Dreisbach, 1983). Se ha observado que la ingesta excesiva de flúor facilita la cristaluria de oxalato de calcio y promueve la formación de cálculos en vejiga en ratas (Anasuya, 1982).

1.11.2. Daños renales

Daston y col., 1985 administraron vía intraperitoneal una sola dosis de flúor de 30mg F⁻/kg a ratas de 29 días de edad. Ellos observaron efectos renales transitorios, tal como poliuria, incremento en el pH urinario y necrosis en células del túbulo proximal. Estudios donde ratas consumieron agua con altas concentraciones de 380 mg/L NaF por 6 semanas demostraron necrosis renal en el túbulo proximal y distal (Lim y col., 1978). Otro ejemplo del daño renal fue en un estudio realizado por Taylor y col. (1961) donde administraron a ratas agua potable que contenía 100 mg/L NaF por 6 meses, en el cual se reportó nefritis intersticial y dilatación del túbulo renal en la unión corticomedular. Por otro lado se ha visto que las exposiciones agudas y crónicas a los niveles elevados de flúor tienen efectos negativos en la homeostasis de calcio, incluyendo la función glomerular y tubular del riñón (Borke y Whitford, 1999).

2. Anatomía del riñón

Los riñones son dos órganos del aparato urinario que se encuentran alojados a uno y otro lado de la columna vertebral en su región lumbar. Tienen forma semejante a una semilla de frijol (Kopple, 2002). El tamaño medio de un riñón adulto es de 10-

12cm de longitud, 5-7cm de ancho y 3cm de espesor, y su peso aproximado es de 115-155g en las mujeres y de 125-170g en los hombres (Cachofeiro y col., 1999).

En un corte longitudinal del riñón, se identifican dos regiones: la región externa llamada corteza y la región interna llamada médula. La corteza tiene apariencia granular, y la médula se compone en el humano de 8-18 pirámides renales (Figura 3) (Jaramillo y Rodríguez, 2006). El riñón es el órgano esencial que garantiza el equilibrio hidromineral del organismo. Está implicado en la reabsorción de los iones como el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio, los cloruros o los fosfatos y también de los oligoelementos como el zinc, el cobre, el manganeso o el hierro.

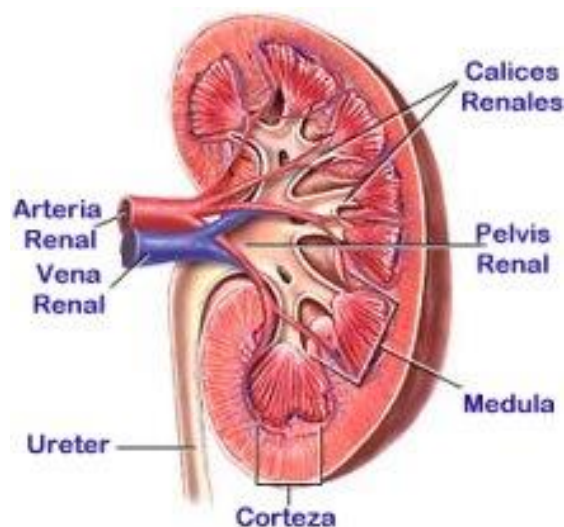


Figura 3. Estructura macroscópica del riñón

La unidad básica estructural y funcional del riñón es la nefrona, la cual consiste de un aparato de filtración o glomérulo conectado a una porción tubular larga que reabsorbe y secreta, determinando la presencia de solutos en el fluido tubular para regular la concentración plasmática de estos mismos solutos (Jaramillo y Rodríguez, 2006).

La porción tubular de la nefrona ha sido dividida en diferentes segmentos que incluyen: túbulo contorneado proximal, asa de henle, túbulo contorneado distal, túbulo colector (Figura 4).

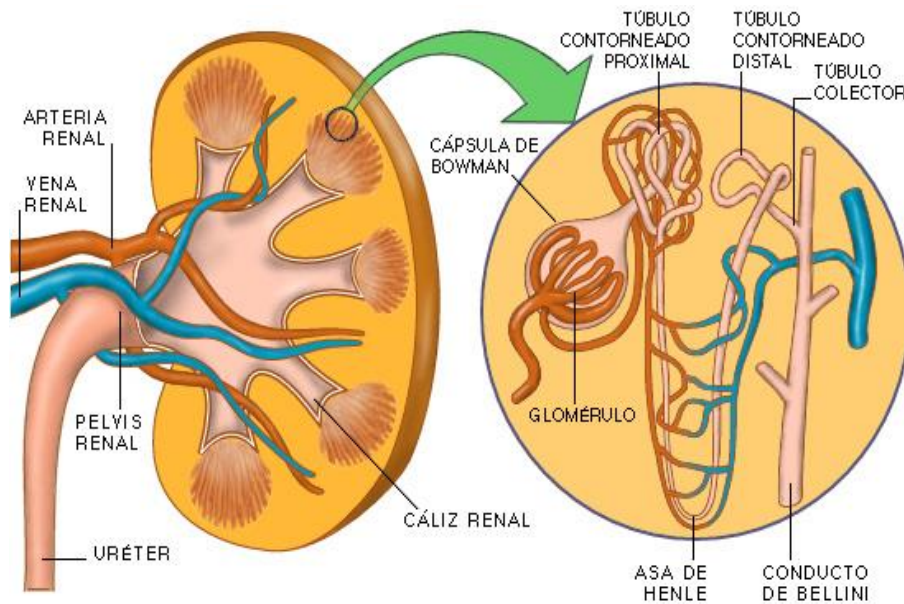


Figura 4. Estructura de la Nefrona

2.1. Función renal y regulación de la homeostasis

La misión fundamental del riñón es estabilizar el volumen y las características fisicoquímicas del líquido extracelular e indirectamente del compartimento intracelular mediante la formación de orina. Mantiene el agua y los osmoles presentes normalmente en el organismo y conserva los electrolitos integrantes de los fluidos de dicho organismo, fundamentalmente el sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro y bicarbonato. Por otra parte elimina el exceso de agua, electrolitos u osmoles procedentes de la ingestión, así como los productos metabólicos de desecho y los productos tóxicos que pueden haber penetrado en el organismo. Además, es capaz de sintetizar diversas hormonas o precursores que desempeñan un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular e incluso en la propia función renal.

Cuando la lesión, necrosis y cicatrización del parénquima renal ocasionan una pérdida de la función renal se reduce la cantidad de sustancias que se filtran a través del riñón. Sin embargo, muchos aspectos de la función renal experimentan cambios que preservan la homeostasis y minimizan los trastornos en el plasma y en los tejidos de las concentraciones de las sustancias que por lo general se excretan a través del riñón (mecanismos de compensación) (Pérez y Eleno, 2001).

Algunas de las funciones fisiológicas realizadas por los riñones son:

- a)** Regulación del contenido de agua y electrólitos corporales y por lo tanto la regulación del volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales.
- b)** Excreción de productos de desecho derivados del metabolismo celular y las sustancias químicas extrañas al organismo.
- c)** Regulación de la presión arterial entre otros mecanismos mediante la regulación del SRAA (sistema renina angiotensina-aldosterona).
- d)** Regulación del equilibrio ácido-base de los líquidos corporales.
- e)** Regulación de la eritropoyesis, al sintetizar y secretar eritropoyetina.
- f)** Regulación de la vitamina D, ya que producen su forma activa.
- g)** Gluconeogénesis, al sintetizar glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores en periodos de ayuno prolongado.
- h)** Eliminación de sustancias extrañas al organismo (xenobióticos) (Cachofeiro, 1999).

En los riñones humanos existen aproximadamente dos millones de nefronas y en la rata existen cerca de 600,000 nefronas; cada una de las cuales realiza la mayoría de las funciones renales.

Para realizar su trabajo, las nefronas realizan tres procesos fundamentales: la filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular.

A medida que el filtrado glomerular fluye en el interior de los túbulos, disminuye su volumen y se modifica su composición mediante los procesos de reabsorción

(retiro de agua y solutos) y de secreción de sustancias en el líquido tubular, para formar finalmente la orina (Jaramillo y Rodríguez, 2006). En la tabla 6 se muestran concentraciones urinarias y plasmáticas de algunas sustancias de importancia fisiológica.

Tabla 6. Concentraciones urinarias y plasmáticas de algunas sustancias de importancia fisiológica.

Sustancia	Concentración en orina	Concentración en plasma	Relación Orina/Plasma
Glucosa	0 mg/100mL	100 mg/100mL	0
Na ⁺	90 mEq/L	150 mEq/L	0.6
Urea	900 mg/100mL	15 mg/100mL	60
Creatinina	150 mg/100mL	1 mg/100mL	150

Ganong, 2000

2.2. Filtración glomerular

La pared de los capilares glomerulares está constituida por tres capas: células endoteliales, membrana basal y células epiteliales.

Hay células que recubren los capilares glomerulares, conocidas como células mesangiales. La sangre llega a los glomérulos renales a través de las arteriolas aferentes y sale de ellos por las arteriolas eferentes. El proceso de filtración glomerular está determinado por las fuerzas de Starling.

La medición de la cantidad de agua plasmática que cruza la membrana basal en la unidad de tiempo (velocidad de filtración glomerular o VFG) se realiza por medio del aclaramiento o depuración de sustancias como la creatinina o la inulina. Existen diversos factores que regulan la VFG, siendo el más importante el flujo plasmático renal (FPR). Además, la contractilidad de las células mesangiales también contribuye a regular la VFG a través de modificaciones del flujo sanguíneo en los capilares glomerulares y en el K_f (coeficiente de permeabilidad) (Jaramillo y Rodríguez, 2006).

2.3. Reabsorción y secreción tubular: manejo renal de agua y electrolitos

Como se mencionó anteriormente, el manejo renal de agua y solutos filtrados es un proceso complejo e integrado durante el cual el volumen del filtrado glomerular y su composición se modifican de manera progresiva, mientras el líquido fluye por los diferentes segmentos tubulares.

En el glomérulo se filtran 120 mL/min con una osmolaridad de 300 mOsm/L. A lo largo del túbulo contorneado proximal se reabsorbe del 60 a 80% del agua y solutos filtrados, se recupera el HCO_3^- (bicarbonato), glucosa, aminoácidos, fosfatos y proteínas del ultrafiltrado. La reabsorción proximal de Na^+ y Cl^- es isohídrica (misma cantidad de agua). Al final del túbulo proximal se ha reducido el flujo a 42 mL/min, manteniéndose la osmolaridad en 300 mOsm/L. En el asa de Henle, se reabsorbe de 15 a 20% del agua, y 20 a 30% de Na^+ y K^+ . A lo largo del asa descendente, hay un proceso de equilibrio osmótico pasivo con el intersticio medular hipertónico. El H_2O sale del asa, reduciéndose progresivamente el flujo y aumentando la osmolaridad. Después de la horquilla del asa, el epitelio es impermeable al agua, por lo que el flujo se mantiene invariable hasta los segmentos corticales. Sin embargo hay un transporte muy activo de Na^+ , Cl^- y K^+ a lo largo de la rama gruesa ascendente del asa, que va progresivamente concentrando el intersticio y diluyendo la orina, hasta alcanzar una osmolaridad mínima de 50-100 mOsm/L. A lo largo del túbulo distal la reabsorción de Na^+ y Cl^- está acoplada con la secreción de calcio, de esta manera, el volumen de líquido tubular se reduce de 20 a 30% durante su paso por los segmentos distales de la nefrona. En el túbulo colector cortical, la reabsorción de Na^+ está acoplada a la secreción de K^+ y H^+ . La secreción de H^+ por el colector medular reduce el pH urinario y permite atrapar un par de NH_3 (amoníaco)/ NH_4^+ (amonio) en forma de NH_4 . El transporte de urea a nivel papilar colabora en aumentar la concentración intersticial a nivel de la horquilla del asa de Henle. La permeabilidad al agua a nivel del túbulo colector es dependiente de ADH (hormona antidiurética). En presencia de ADH, el flujo de diuresis puede reducirse por debajo de 1 mL/min y la osmolaridad subir por encima de 1000 mOsm/L. En su ausencia, pueden llegar a

eliminarse un máximo de 12 mL/min. Con una osmolaridad mínima de 50-100mOsm/L (Figura 5) (Tejedor, 1999; Jaramillo y Rodríguez, 2006).

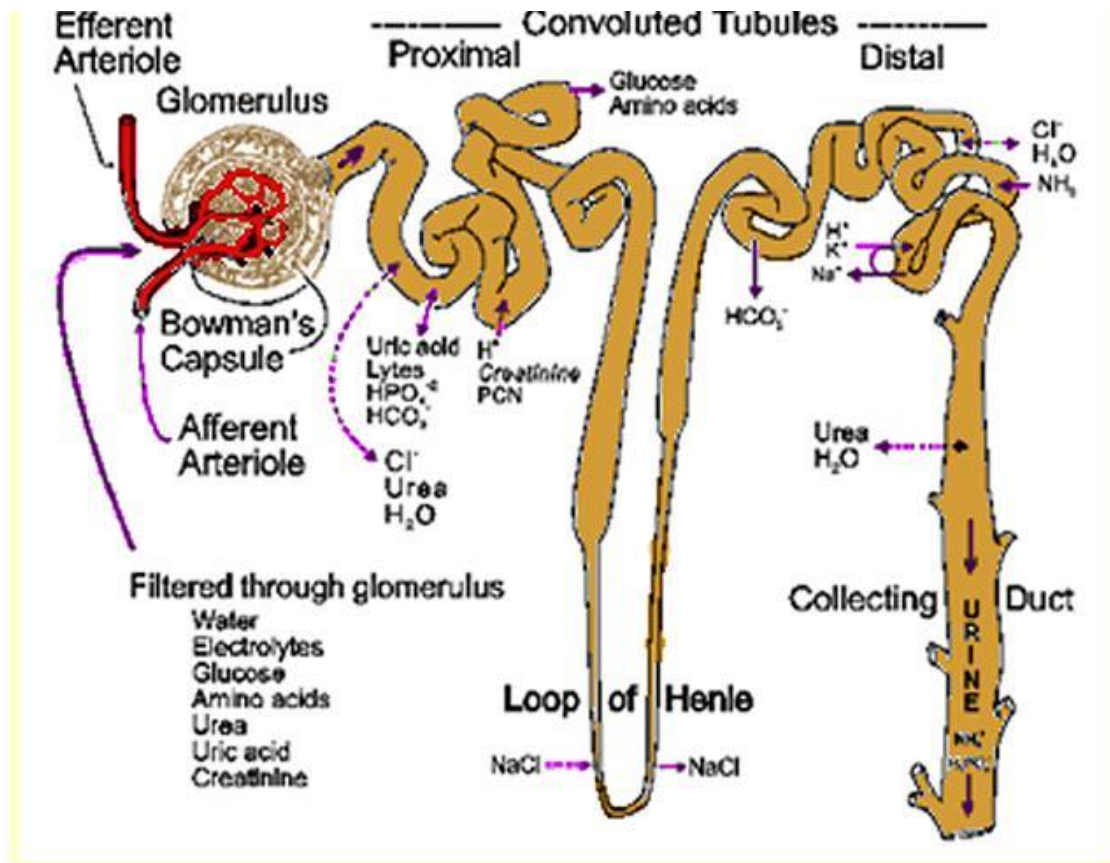


Figura 5. Esquema general de la nefrona

3. Metabolismo de Glucosa e Insulina

3.1. Glucosa

La glucosa es el principal producto que se forma por la hidrólisis de carbohidratos más complejos en la digestión. Se oxida en las células como una fuente de energía y se almacena en el hígado y los músculos en forma de glucógeno. Los principales

monosacáridos libres presentes en los alimentos son glucosa y fructosa. Pueden estar en estructuras de cadenas abiertas o cerradas. (Kathleen y Escote, 1998).

En el proceso de la digestión existe un momento en el que se hidrolizan los oligosacáridos y esto da lugar a una elevada concentración de glucosa, que al ser superior a la de la célula, pasa a través de la membrana sin necesidad de energía. La glucosa que pasa a la sangre es manejada por el hígado y tejidos periféricos, siendo el primer paso la fosforilación. En los tejidos, la fosforilación tiene lugar gracias a la hexocinasa una enzima sujeta a retroalimentación del producto glucosa-6-fosfato (Levin, 2002). La glicólisis es la etapa inicial en el proceso completo de la degradación de la glucosa. En los mamíferos, de acuerdo con el tejido donde ocurre la glicólisis, de la disponibilidad de oxígeno y de las condiciones metabólicas imperantes, el piruvato generado en la vía sigue uno de dos caminos:

- a. Cuando hay suficiente oxígeno y no están satisfechas las necesidades energéticas celulares, el piruvato es descarboxilado, oxidado y se une a la coenzima A para formar acetil coenzima A, cuyo radical acetilo es oxidado y convertido en H_2O , CO_2 y ATP en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs.
- b. Cuando hay déficit de oxígeno, el piruvato se reduce y se convierte en lactato; este último proceso es común en el músculo esquelético donde recibe el nombre de glicólisis anaeróbica. En algunos microorganismos, como la levadura, el piruvato es convertido, en ausencia de oxígeno y por medio de la fermentación alcohólica, en etanol y CO_2 (Figura 6) (Laguna y Piña, 1990).

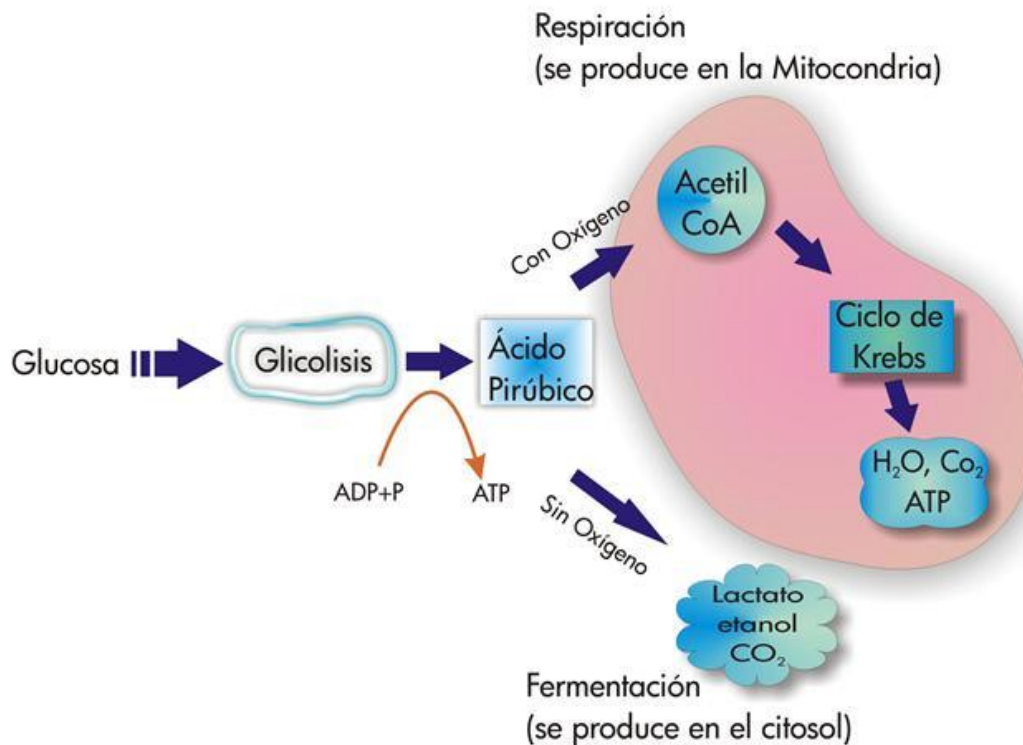


Figura 6. Esquema del metabolismo de glucosa

3.2. Insulina

La insulina es un polipéptido formado por 51 residuos de aminoácidos y fue la primera estructura primaria de proteína que se determinó y la primera proteína sintetizada. Es secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas su principal función es mantener normales los niveles de glucosa en sangre facilitando la entrada de ésta a las células, actúa regulando el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos y promoviendo la división celular (Wilcox, 2005).

Básicamente, la insulina: estimula las vías que dan lugar a la producción de energía a partir de la glucosa a una acumulación de energía en forma de glucógeno y de grasas, estimula la síntesis de diversos tipos de proteínas al mismo tiempo que

interfiere en sus vías de degradación, interfiere en la gluconeogénesis, actúa como antagonista con las acciones mediadas por el AMPc, aumenta la captación celular de sodio, potasio y de fosfato inorgánico, independientemente de la utilización de la glucosa y estimula la síntesis de mucopolisacáridos (Kristiansen, 2000).

3.3. Trastornos del metabolismo de la glucosa

La concentración de glucosa en la sangre controla la liberación de insulina. Cuando el páncreas es incapaz de secretar insulina, o secreta muy poca, se produce un trastorno endocrinológico conocido como diabetes (Levin, 2002). Este trastorno puede producirse por una variedad de condiciones genéticas, metabólicas y adquiridas que culminan en hiperglucemia. Las alteraciones de la glucosa y las anomalías graves del metabolismo de grasas, proteínas y otras sustancias son las características patológicas de la diabetes.

La diabetes se clasifica como:

- a. Diabetes tipo I o insulino dependiente.
- b. Diabetes tipo II o no insulino dependiente.
- c. Diabetes gestacional.
- d. Alteración de la tolerancia a la glucosa (Anderson, 2002; Levin, 2002).

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Si el problema de la insuficiencia renal sobre la gravedad de la toxicidad ósea del flúor ha sido bien descrito, las consecuencias directas de la exposición a flúor sobre la función renal no se han estudiado en detalle.

Por esta razón, se realizó un estudio de la función renal (flujo urinario, filtración glomerular, reabsorción renal de fosfatos y de glucosa, proteinuria, secreción renal y niveles de flúor) en el modelo animal (rata cepa Wistar) expuesto a dosis bajas de flúor en condición crónica para establecer los efectos deletéreos y la cinética de aparición del daño renal inducido por este tóxico.

La documentación de estas modificaciones tempranas tendrá una aplicación directa en la identificación futura de biomarcadores de daño inducido por flúor y dejara montadas la metodología y las técnicas en el laboratorio de toxicología renal de la Sección Externa de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

IV. JUSTIFICACIÓN

Muchos países se enfrentan a los problemas causados por la contaminación del agua potable por sustancias tóxicas como son el cadmio, flúor, cromo, plomo, arsénico, etc. Esta contaminación puede deberse a la industrialización, el tráfico intenso de automóviles o a una presencia natural en los suelos de origen volcánico, como es el caso de México. Una concentración excesiva de flúor en el agua ha sido reportada en 27 países del mundo donde decenas de millones de personas son expuestas y podrían estar afectadas por carencias y/o problemas óseos y renales. Es el caso de 20 millones de mexicanos (20% de la población) quienes viven en zonas distribuidas en toda la República y presentan características clásicas de intoxicación crónica a este elemento como la fluorosis dental.

Como se comentó anteriormente, se sabe poco del efecto renal de pequeñas dosis de flúor ingeridas de forma cotidiana. Sin embargo por sus características físico-químicas y por los datos obtenidos durante trabajos preliminares, se puede pensar que el flúor interactúa de manera muy fina con los mecanismos de regulación de la homeostasis (reabsorción de iones, minerales, oligoelementos, azúcares a nivel de los epitelios intestinales y renales). Estos cambios fisiológicos podrían tener consecuencias graves en el balance mineral del organismo induciendo carencias en poblaciones frágiles (recién nacidos, mujeres embarazadas, adultos mayores) y/o en poblaciones co-expuestas a otros agentes tóxicos (contaminantes en el agua, los productos alimenticios o en el aire que las hacen más sensibles a los efectos tóxicos del flúor).

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar alteraciones en la función renal inducidas por una exposición oral crónica a dosis bajas de flúor en un modelo animal (rata Wistar expuesta a 2.5mg F/kg/día) y evidenciar modificaciones de la homeostasis general y posibles carencias en elementos esenciales (iones y azúcares) en el individuo expuesto.

2. Objetivos específicos

- 1) Determinar los parámetros generales de la función renal (flujo urinario, proteinuria) a los diferentes tiempos de exposición a flúor.
- 2) Determinar la depuración de creatinina para evaluar la filtración glomerular.
- 3) Determinar la depuración osmolal a los diferentes tiempos de exposición a flúor.
- 4) Evaluar las excreciones fraccionales de fosfatos, glucosa, flúor a los diferentes tiempos de exposición a flúor.
- 5) Determinar los niveles plasmáticos de insulina a los diferentes tiempos de exposición a flúor.

VI. HIPÓTESIS

La exposición crónica a dosis bajas de flúor induce modificaciones de la función renal debida a una interacción directa del tóxico sobre los sistemas de transporte de los iones y sustancias a nivel del epitelio renal (canales iónicos, intercambiadores de iones, transportadores activos) desde los primeros tiempos de exposición. Estas alteraciones pueden ser responsables de un cambio en la homeostasis general provocando carencias y trastornos fisiológicos a medio y largo plazo.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Para este estudio se utilizaron ratas hembras cepa Wistar con un peso aproximado de 200-220g, las cuales se obtuvieron y se mantuvieron en el bioterio del CINVESTAV-IPN (UPEAL) de acuerdo con las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM, 1999). Fueron distribuidas aleatoriamente en jaulas de policarbonato que contenían aserrín en su base en grupos de 5. Los animales se mantuvieron en cuartos a una temperatura promedio de 21 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, agua sanitizada, filtrada con carbono activado y alimento (Lab. Diet. 5053, Picolab, rodent diet 20) *ad limitum*, hasta 15h antes del principio de la cirugía.

1. Grupos experimentales e intoxicación subcrónica con flúor.

Las ratas fueron divididas en grupos de 5 animales cada uno, los cuales fueron tratados de la siguiente manera.

- ★ **Grupo control:** Los animales fueron administrados cada 24 \pm 1 horas con agua de garrafón (Bonafont) durante 1 semana.
- ★ **Grupo intoxicado 1 semana:** Los animales fueron administrados cada 24 \pm 1 horas con una solución de fluoruro de sodio (NaF) (Sigma) de 2.5mg/kg/día por vía intragástrica durante 1 semana.
- ★ **Grupo intoxicado 2 semanas:** Los animales fueron administrados cada 24 \pm 1 horas con una solución de fluoruro de sodio (NaF) de 2.5mg/kg/día por vía intragástrica durante 2 semana.
- ★ **Grupo intoxicado 4 semanas:** Los animales fueron administrados cada 24 \pm 1 horas con una solución de fluoruro de sodio (NaF) de 2.5mg/kg/día por vía intragástrica durante 4 semanas.

2. Proceso quirúrgico experimental.

Después de 15 horas en jaulas metabólicas (Nalgene Cat. No. 650-0210), los animales fueron anestesiados con pentobarbital (Nembutal) por vía intraperitoneal y colocados en una mesa termoregulada para mantener su temperatura corporal entre 37 y 38 °C. Se realizó una traqueotomía sin tocar la glándula tiroidea. Se introdujo un catéter (Clay Adams, PE-20) en la vena yugular izquierda para poder perfundir solución salina (NaCl) 0.9% a una velocidad de perfusión de 20 μ L/min. Un segundo catéter (Clay Adams, PE50) fue colocado en la arteria femoral derecha para poder medir la presión arterial conectándolo a un medidor de presión invasivo (Research BP transducer, marca Harvard Apparatus). Después de haber terminado la cirugía se esperó un periodo de estabilización de 30min como recuperación de la cirugía, transcurrido este tiempo se tomó lectura de la presión arterial 6 veces cada 10 minutos. Al finalizar la cirugía se tomó una muestra de sangre para extracción del plasma y se sacrificó al animal con una sobredosis de anestésico. Se extrajeron los riñones para determinar sus pesos respectivos.

3. Obtención de muestras biológicas.

3.1. Obtención y conservación de muestras de orina.

Al final del periodo de intoxicación y 15 horas antes de la cirugía, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas sin alimento pero con libre acceso a agua de bebida. Al término de este tiempo, las muestras de orina fueron alicuotadas en tubos Eppendorf y guardadas a una temperatura de -20°C hasta momentos antes de ser procesadas. Con las jaulas metabólicas también se midió la cantidad de agua ingerida y el volumen de orina.

3.2. Obtención y conservación de muestras de plasma.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico se tomó una muestra de sangre de la arteria femoral la sangre se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) a 4°C

por 10 minutos para separar el plasma de los demás componentes sanguíneos. El plasma obtenido se alicuotó en tubos Eppendorf y se conservó a una temperatura de -20°C hasta momentos antes de ser procesado.

4. Cuantificación de Creatinina (Método Jaffe sin desproteínización).

4.1. Principio:

La creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo colorado. La cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina.

4.2. Procedimiento:

Para la determinación de creatinina se utilizó los siguientes reactivos

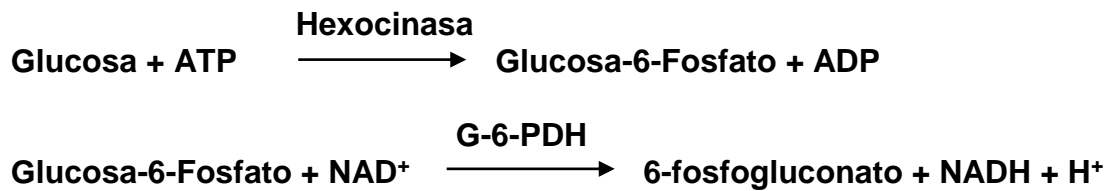
- a) Acido pícrico 0.04M
- b) Hidróxido de sodio 0.75N
- c) Estándar de creatinina

Se elaboró una mezcla proporcional 1:1. Para medir la orina se diluyó 1µL de orina y 49µL de agua desionizada, y para plasma se diluyó 10 µL de plasma y 40 µL de agua desionizada. Después se añadió 450 µL de la mezcla de reactivos a cada muestra posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro (Vitalab Eclipse Merck) a una longitud de onda 505nm.

5. Cuantificación de Glucosa (Método Hexocinasa).

5.1. Principio:

El método es completamente enzimático y utiliza las enzimas hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para determinar en forma indirecta la cantidad de glucosa equimolar a la producción de gluconato-6-P.



La glucosa es convertida a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por la hexocinasa (HK) en presencia del trifosfato de adenosina (ATP). La G-6-P es convertida en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) y dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a 6-fosfogluconato y NADH, y se determina el aumento en la densidad óptica a 340 nm.

La formación de NADH causa un aumento en la absorbancia a 340 nm, la cual es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

5.2. Procedimiento:

Para medir glucosa se utilizó un kit comercial (RANDOX GL 1611 Laboratories LTD) el cual contiene como reactivos:

- a) Regulador pH 7.6 que contiene ázida de sodio, iones de magnesio, ATP y NAD⁺
- b) Enzima (Hexocinasa, G6P-DH, ácido sódico)
- c) Estándar de glucosa (100 mg/dL)

Se realizó una mezcla en la cual se colocaron 100 µL de la enzima en 10mL del tampón. Se preparó un estándar para el cual se ocuparon 10 µL del patrón y 1mL de la mezcla. Posteriormente se pipetearon en tubos eppendorf 500 µL de la mezcla en 5 µL de muestra de plasma. Y se leyeron en un espectrofotómetro (Vitalab Eclipse Merck) a una longitud de onda 340 nm.

6. Cuantificación de Fosfatos (Método de Chen).

6.1. Principio:

Los fosfatos reaccionan con el molibdato amónico en presencia de ácido sulfúrico para transformarse en un complejo de fosfomolibdato que se puede medir por determinación colorimétrica a 340 nm usando un espectrofotómetro de microplacas (Spectromax Plus 384).

6.2. Procedimiento:

Se utilizó el método de Chen 1956. Las soluciones que se ocuparon para preparar el reactivo fueron: vitamina C 10g en 100mL de agua desionizada; molibdato de amonio, 2.5g en 10mL de agua desionizada; ácido sulfúrico, 18mL en 90mL de agua desionizada y agua desionizada. Para preparar las soluciones estándar se utilizó fosfato de potasio 6.8g en 50mL de agua desionizada, se prepararon las soluciones a 1mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM y 10mM. Las muestras de orina se diluyeron 10x antes de precipitar las proteínas.

Para precipitar las proteínas se colocaron 5µL de la muestra tanto de orina como de plasma o estándar más 125 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min.

Posteriormente en tubos de hemólisis de 5 mL se colocaron 100µL del sobrenadante (muestra + TCA) más 1 mL del reactivo, se pusieron a baño maría durante 20 min a 37°C, transcurrido este tiempo se colocaron 150 µl de cada estándar y muestra en una placa de 96 pozos y se leyeron en el lector de placas a una longitud de onda de 820 nm posterior a esto se analizaron los resultados.

7. Cuantificación de Insulina (Método por ELISA).

7.1. Principio:

Se basa en una técnica de sándwich en la que se dirigen dos anticuerpos monoclonales a diferentes determinantes antigénicos de la molécula de insulina. Uno de los anticuerpos primarios, tiene la finalidad de fijar la insulina en las paredes de los pozos de las placas de ELISA, el segundo anticuerpo peroxidado tiene la finalidad de reconocer la insulina y reaccionar con el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) formando complejos de color amarillo.

7.2. Procedimiento:

Los componentes que integran el kit comercial (Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Uppsala, Suecia) para la determinación de la concentración de insulina fueron:

- a)** Solución Stock (Anticuerpo anti-insulina conjugados con peroxidasa)
- b)** Buffer conjugado
- c)** Solución de lavado
- d)** TMB
- e)** Solución para detener la reacción
- f)** Placas multipozos para ELISA (cubiertos con anticuerpos anti-insulina)
- g)** Soluciones estándar de insulina de rata (0, 0.175, 0.45, 1, 2.5, 6.5 µg/L)

Se colocaron 50 µL de cada calibrador y 50 µL de muestra en cada pozo al término de esto, se adiciono 50 µL de enzima conjugada (tanto a muestras como a calibrador), se dejó incubar la placa con agitación (200 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente, al término de este tiempo se lavo con solución de lavado, posteriormente se agrego 200 µL de substrato TMB y se incubo en oscuridad por 30 minutos, para finalizar se adiciono 50 µL de solución stop y se leyeron las muestras a una absorbancia de 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Spectromax Plus 384).

8. Cuantificación de Flúor (Método del potenciómetro con electrodo selectivo).

8.1. Principio:

Se utilizó el método potenciométrico para medir las concentraciones de flúor en plasma y orina utilizando un electrodo selectivo de flúor (Corning No. 476135) que está compuesto por una membrana de fluoruro de lantano y una referencia interna unidos en un cuerpo epóxico.

8.2. Procedimiento:

Para preparar la solución TISAB (Tampón de ajuste de fuerza iónica total) se colocaron 84 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado (36-38% pureza) en 500 mL de agua desionizada, posteriormente se adiciono 242 g de Hidroximetilaminometano (TRIS) y 230 g de tartrato de sodio, agitando hasta disolución total (dejando que dicha solución se enfriara a temperatura ambiente ya que es exotérmica). Se ajustó a pH de 5.5 – 6.0. Se preparó una solución estándar de 1000 ppm (el NaF se seco previamente a 105 °C durante 2 horas). A partir de esta solución, se preparó una solución estándar de 50 ppm, y partir de ésta se prepararon soluciones en un rango de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, y 10.0 ppm. Previo a la determinación potenciométrica en tubos de polipropileno de 50 mL se colocó 1 mL de cada una de las soluciones estándar anteriormente mencionadas, y se les adicionó 1 mL de TISAB, asegurándose que el pH de la mezcla (muestra + TISAB) se encuentre entre 5.1 a 5.4. Las mediciones se efectuaron con un voltaje de conducción inicial al tiempo cero de 215 milivolts (mV), registrándose las lecturas de cada solución en mV, tres minutos después de haber introducido el electrodo. Se preparó un blanco, que consistió en mezclar agua desionizada con TISAB en proporción 1:1.

En el caso de las muestras de orina se utilizó un volumen de 500 µL y posteriormente se le agregaron 500 µL de TISAB (conservando las proporciones 1:1 de muestra y TISAB) se agitó en el vortex y se registraron las lecturas, dejando estabilizar la lectura 3 minutos aproximadamente. La gráfica de calibración se elaboró colocando en el eje de las ordenadas los valores de voltaje (mV) y en las abscisas el logaritmo de la

concentración de las soluciones estándar de flúor, obteniendo la ecuación lineal y a partir de la misma se interpolaron los valores de las muestras, y al valor obtenido se le aplicó el antilogaritmo para tener la concentración correspondiente de flúor.

La concentración de flúor se ajusto considerando el volumen de orina de cada rata. Los resultados se obtuvieron en miligramos totales.

9. Cuantificación de la proteinuria (Método de Bradford).

9.1. Principio:

Este método se basa en el cambio de color que se produce cuando el Azul Brillante de Coomassie (ABC) se une a las proteínas.

9.2. Procedimiento:

Se utiliza el reactivo comercial de Bradford (Biorad. Marsella, Francia). Se prepara la curva de calibración de albúmina con concentraciones crecientes de albúmina. En tubos eppendorf se agrega:

Bradford	Buffer *	Albúmina	Muestra
450µL	50 µL	0	-
450µL	48 µL	2	-
450µL	46 µL	4	-
450µL	44 µL	6	-
450µL	42 µL	8	-
450µL	45 µL	-	5 µL

*es el medio donde la muestra esta suspendida.

Nota: el Bradford tiene que estar diluido 1:5 antes de agregar la muestra.

Se agitan los tubos para homogeneizar y a cada pozo de la placa se le agrega 200 µL.

10. Cuantificación de la osmolalidad (Método del osmometro de presión de vapor).

10.1. Principio:

La osmolalidad es una expresión de la concentración total de partículas disueltas en una solución, sin tener en cuenta el tamaño de las partículas, su densidad, configuración o carga eléctrica. Se basa en una medición de la presión de vapor, posibilitada por la higrometría de termopar.

10.2. Procedimiento:

Para medir la osmolalidad se utilizó un osmometro de presión de vapor (Wescor 5500, Canadá). En el cual se aspira una muestra de 8 μ L en la punta de una micropipeta. La muestra se inocula en un disco de papel sin soluto en el portamuestras, tras lo cual se inserta el portamuestras en el instrumento y se cierra la cámara de muestras. El cierre inicia la secuencia de medición automática. Cuando el procedimiento es finalizado se presenta un sonido y aparece el resultado este es expresado en unidades del sistema internacional, milimol por kilogramo (mmol/Kg).

Para calibrarlo se utilizó 8 μ L de una solución estándar de 290 mOsm para plasma y para orina un estándar de 1000 mOsm.

11. Determinación de los parámetros funcionales renales.

11.1. Depuración de creatinina y aproximación de la velocidad de filtración glomerular (VFG).

La capacidad de eliminación de la creatinina es un examen que compara el nivel de creatinina en la orina con el nivel de creatinina en la sangre, generalmente sobre la base de valoraciones hechas a una muestra de orina de 24 horas y a una muestra de sangre que se toma al final del período de 24 horas. La depuración de creatinina es el parámetro más confiable para medir la velocidad de filtración glomerular. La VFG es la cantidad de ultrafiltrado primario que los riñones producen por minuto, o lo que es igual, la cantidad de plasma que se filtra por minuto.

Para estimar la VFG se utiliza la siguiente formula:

$$\frac{\text{Creatinina urinaria (mg/dL)}}{\text{Creatinina plasmática (mg/dL)}} \times \text{Flujo urinario } (\mu\text{L/min/100g}) = \text{VFG } (\mu\text{L/min/100g})$$

11.2. Flujo urinario.

Es el volumen de orina excretada (evacuada) del cuerpo, la velocidad a la que fue excretada y el tiempo que tomó evacuarla.

Y se estima con la siguiente formula:

$$\frac{\text{Volumen de orina recolectada } (\mu\text{L})}{\text{Duración en jaula metabólica (min)}} / \text{Peso corporal (g)} \times 100 = \text{Flujo urinario } (\mu\text{L/min/100g})$$

11.3. Depuración osmolal.

La osmolalidad del líquido extracelular (280-300 mOsm/L) se mantiene principalmente por regulación de la ingesta (sed) y la excreción de agua por los riñones, la cual esta controlada básicamente por la hormona antidiurética o vasopresina.

$$\frac{\text{Osm Urinaria (osm/L)}}{\text{Osm Plasmática (osm/L)}} \times \text{Flujo urinario } (\mu\text{L/min/100g}) = \text{Depuración Osmolal } (\mu\text{L/min/100g})$$

11.4. Excreción fraccional de fosfatos y de flúor.

La excreción fraccional es la proporción de una sustancia, filtrada a nivel glomerular, que es finalmente excretada por la orina.

$$\frac{\text{Depuración renal de fosfatos}}{\text{Depuración renal de creatinina}} \times 100 = \% \text{ Fraccional de fosfatos}$$

$$\frac{\text{Depuración renal de flúor}}{\text{Depuración renal de creatinina}} \times 100 = \% \text{ Fraccional de flúor}$$

12. Análisis estadístico.

Para evaluar la diferencia entre los diferentes grupos control y experimentales, se realizó un análisis de varianza unifactorial (One Way ANOVA). Utilizando el software GraphPad InStat 3.05.

VIII. RESULTADOS

1. Estado general de los animales y peso corporal.

El crecimiento y las variaciones de peso corporal de los animales no presentaron diferencias significativas y estuvieron en los rangos normales descritos por la literatura y por las autoridades responsables de la UPEAL del CINVESTAV-IPN (3-10 g por semana para ratas Wistar hembras de 200-220 g) tanto para las ratas del grupo control como para los animales de los grupos expuestos a 2.5 mg NaF/kg/día durante 1,2 y 4 semanas.

2. Volumen de agua ingerida.

La figura 7 muestra el volumen de agua ingerida expresada en ml/h por las ratas tanto controles como intoxicadas. Se puede observar un incremento significativo de ingesta de agua a la primera (+41% de incremento) y segunda semana de intoxicación (+42%) y siendo ligeramente menor a las cuatro semanas (+27%).

3. Presión Arterial.

En la figura 8 se grafica la media de la presión arterial (media de las presiones sistólicas y diastólicas) expresada en mm de Hg, tanto en ratas controles como en intoxicadas. No se observa ningún cambio en la primera semana pero un inicio de hipertensión aparece a partir de la segunda semana de exposición cuando la presión arterial empieza a incrementarse de forma significativa (+21%) y sigue siendo elevada a la cuarta semana de exposición (+20%).

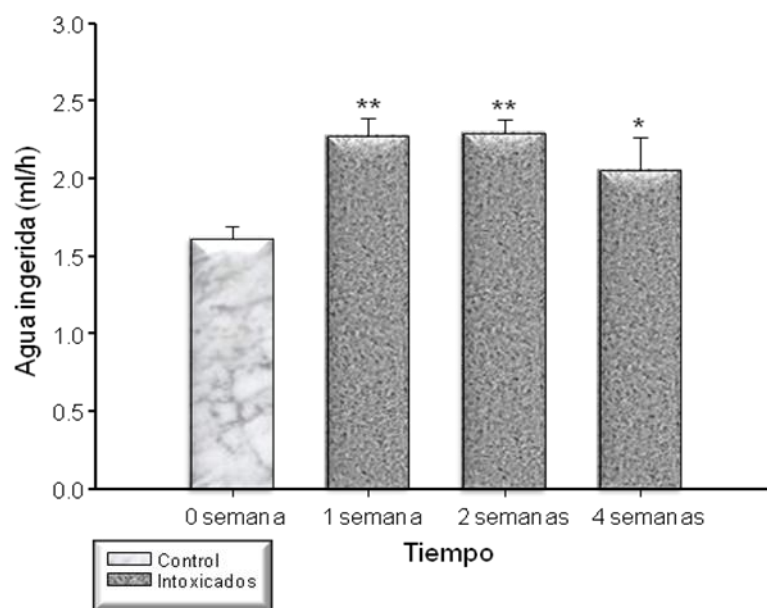


Figura 7. Volumen de agua ingerida expresado en mL/h y determinado en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

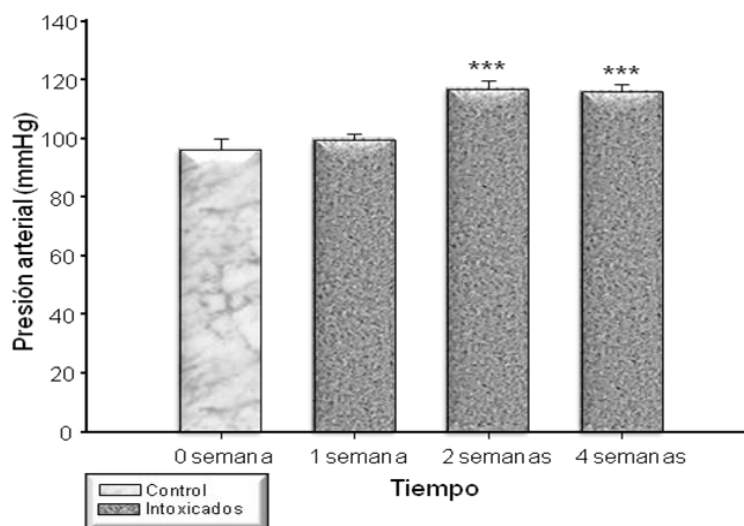


Figura 8. Media de la Presión Arterial expresada en mmHg y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).

*** $p < 0.001$.

4. Flujo urinario.

La figura 9 indica el promedio de los valores de flujo urinario tanto de ratas controles como de ratas intoxicadas con flúor durante diferentes tiempos de exposición. Se observa que el flujo urinario expresado en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ va incrementando de forma significativa desde la primera semana de exposición (+49% de incremento). Este aumento perdura después de 2 y 4 semanas de exposición (respectivamente +65% y +49% de incremento) demostrando un posible efecto diurético del flúor.

5. Creatinina plasmática y Velocidad de Filtración Glomerular.

5.1. Creatinina Plasmática.

En la figura 10 se grafica la concentración de creatinina plasmática expresada en mg/dl , determinada en ratas controles e intoxicadas. Se observa un incremento significativo de los niveles de creatinina en plasma, desde la primera semana de exposición a flúor (+17%). Estos cambios de los niveles de la creatinina plasmática presentan un aumento drástico después de 2 y 4 semanas de exposición a flúor (incremento de +98% y +117% respectivamente) e indican la aparición de un daño renal importante.

5.2. Velocidad de Filtración Glomerular (VFG).

En la figura 11 se grafica la velocidad de filtración glomerular expresada en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ tanto en ratas controles como en intoxicadas, donde se puede observar que la VFG disminuye de manera significativa en cada grupo experimental: 1 semana (-15%), 2 semanas (-31%) y 4 semanas (-23%). La disminución de la VFG confirma el diagnóstico de daño glomerular sugerido por el incremento de la creatinina plasmática antes observado.

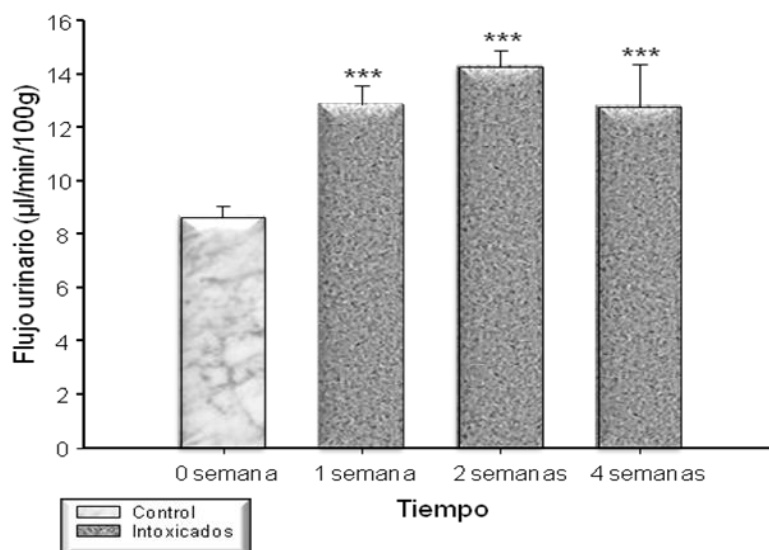


Figura 9. Flujo urinario expresado en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ y determinado en los animales control y en los animales expuestos a $2.5\text{mg NaF}/\text{kg}/\text{día}$ durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles $n=8$; 1 semana $n=9$; 2 semanas $n=9$; 4 semanas $n=5$). *** $p<0.001$).

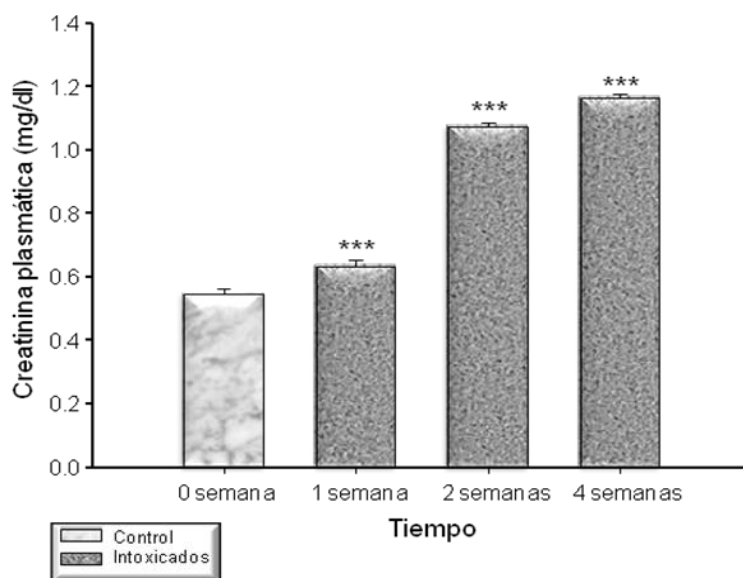


Figura 10. Concentración plasmática de creatinina expresada en mg/dL y determinada en los animales control y en los animales expuestos a $2.5\text{mg NaF}/\text{kg}/\text{día}$ durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles $n=8$; 1 semana $n=9$; 2 semanas $n=9$; 4 semanas $n=5$). *** $p<0.001$).

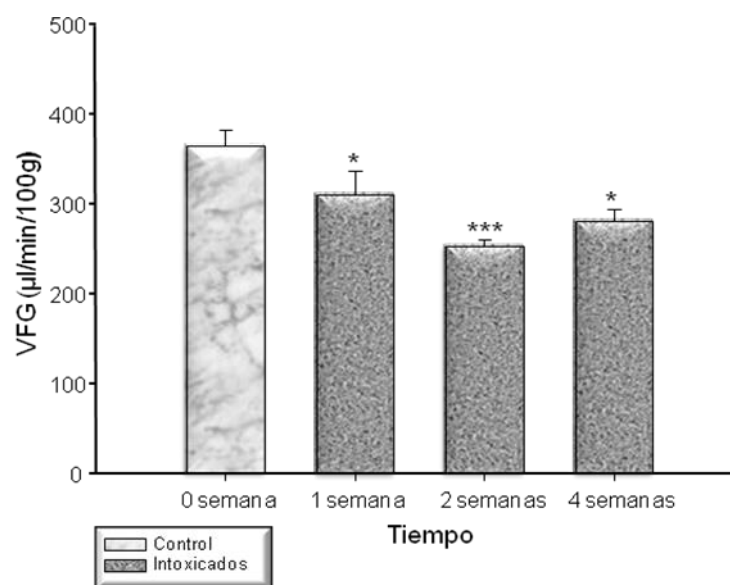


Figura 11. Velocidad de filtración glomerular expresada en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ y determinada en los animales control y en los animales expuestos a $2.5\text{mg NaF}/\text{kg}/\text{día}$ durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles $n=8$; 1 semana $n=9$; 2 semanas $n=9$; 4 semanas $n=5$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

6. Depuración Osmolal (C_{osm}).

La figura 12 muestra la depuración osmolal expresada en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ tanto en ratas controles como en intoxicadas. Se observa que la C_{osm} no se encuentra significativamente modificada después de 1 semana de exposición a flúor pero que aumenta en la segunda y la cuarta semana de exposición (+43% y +53% respectivamente) indicando una pérdida urinaria de osmolitos.

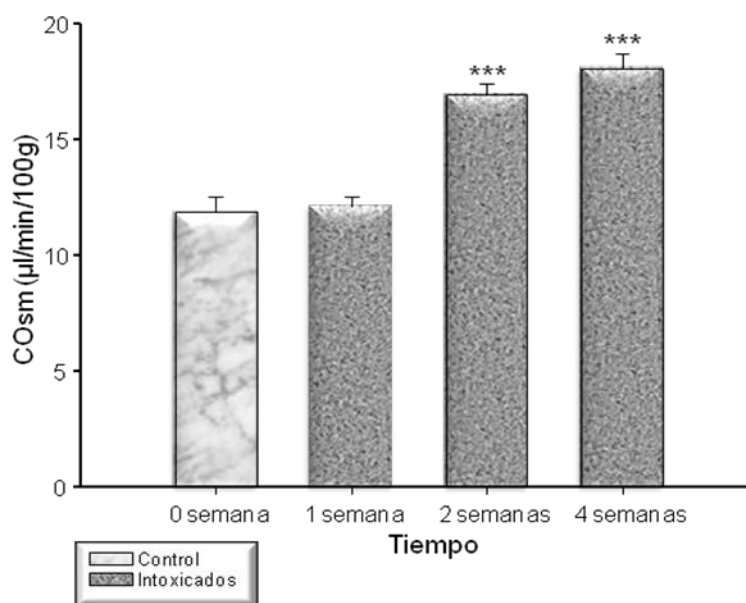


Figura 12. Depuración Osmolal expresada en $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).

*** $p < 0.001$.

7. Glucosa e Insulina.

7.1. Glucosa plasmática y urinaria.

En la figura 13.A se grafican los valores de glucosa plasmática expresadas en mg/dL, determinadas en ratas controles e intoxicadas, donde podemos observar como van incrementado significativamente los niveles de glucosa desde la primera semana (+16%), siendo mayor a las 2 y 4 semanas de intoxicación (+26% y +43% respectivamente). Estos datos demuestran que el flúor afecta fuertemente el metabolismo de la glucosa.

La figura 13.B muestra los valores de glucosa urinaria expresadas en mg/dL, tanto en ratas controles como en intoxicadas. Se puede observar que los niveles de glucosa urinaria presentan una tendencia a aumentar durante la dos primeras semanas de exposición sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo. A la cuarta semana, se observa una excreción urinaria de glucosa significativamente aumentada (+62%) indicando un daño renal a nivel del túbulo proximal contorneado o una saturación de los sistemas celulares responsables de la reabsorción renal de glucosa.

7.2. Insulina

En la figura 14 se grafican los valores de insulina en plasma expresados en mU/L, determinados en ratas controles e intoxicadas, donde se puede observar una disminución significativa de insulina en la primera (-54%), la segunda (-31%) y la cuarta semana de exposición a flúor (-33%). Esta disminución podría explicar el incremento en la concentración plasmática de glucosa descrito anteriormente.

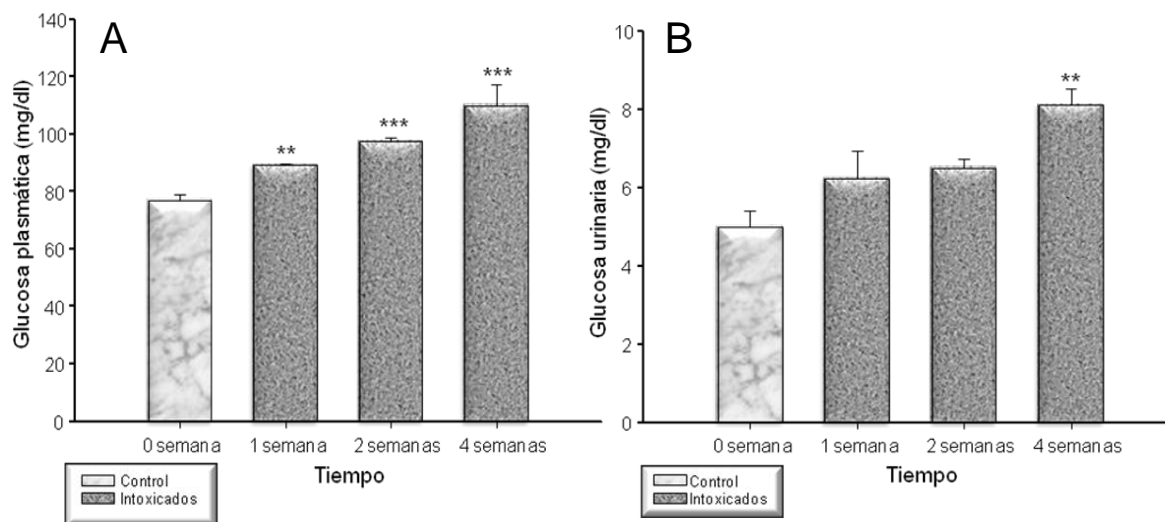


Figura 13. Concentración plasmática (A) y urinaria (B) de glucosa expresadas en mg/dL y determinadas en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5). ** p<0.01; *** p<0.001.

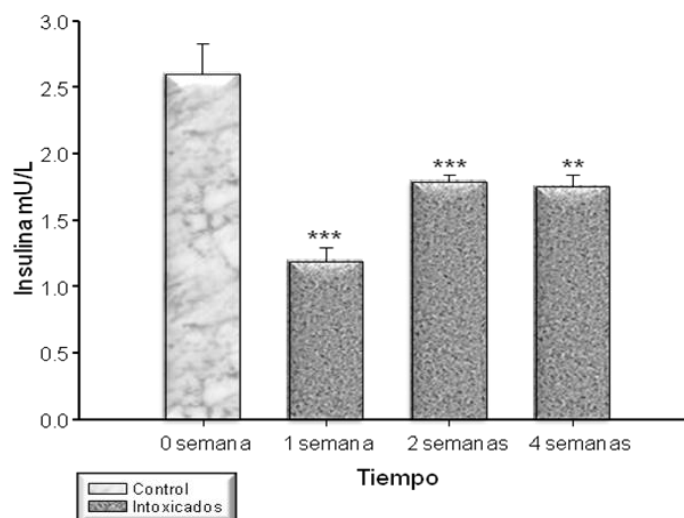


Figura 14. Concentración plasmática de insulina expresada en mU/L y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5 mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5). ** p<0.01 *** p<0.001.

8. Fosfatos

8.1. Fosfatos en plasma y orina

La figura 15.A muestra los valores de fosfatos plasmáticos expresados en mmol/L tanto en ratas controles como en las ratas intoxicadas. Se puede observar un incremento regular y significativo de la concentración plasmática de fosfatos desde la primera hasta la segunda y la cuarta semana de exposición (+25%, +38.5% y +43% respectivamente).

La figura 15.B muestra los valores de fosfatos urinarios expresados en mmol/L determinados en ratas controles como intoxicadas. Los resultados indican que no se encuentran modificaciones en las concentraciones urinarias de fosfatos ni a la primera ni a la cuarta semana de intoxicación pero que se puede observar una disminución a la segunda semana (-44%).

8.2. Excreción fraccional de fosfatos

En la figura 16 se grafican los valores de excreción fraccional de fosfatos expresados en % y determinados en animales controles e intoxicados. Los resultados indican que desde la primera semana la excreción fraccional de fosfatos aumenta (+64%). El incremento se sigue observando después de dos (+61%) y cuatro (+61%) semanas de intoxicación indicando que el flúor disminuye la reabsorción renal de los fosfatos.

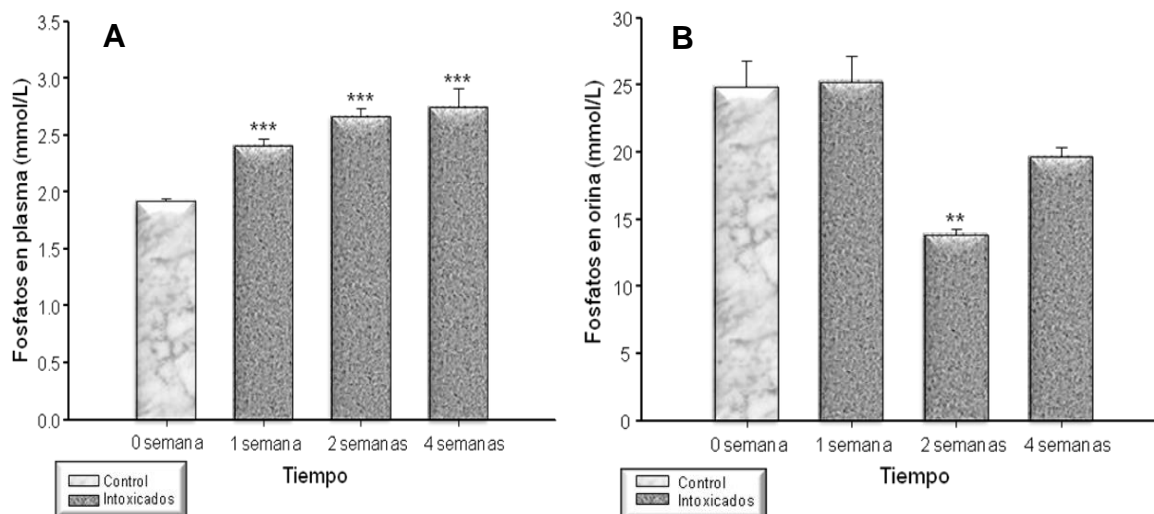


Figura 15. Concentración plasmática (A) y urinaria (B) de Fosfatos expresada en mmol/L y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5 mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5). ** p<0.01; *** p<0.001.

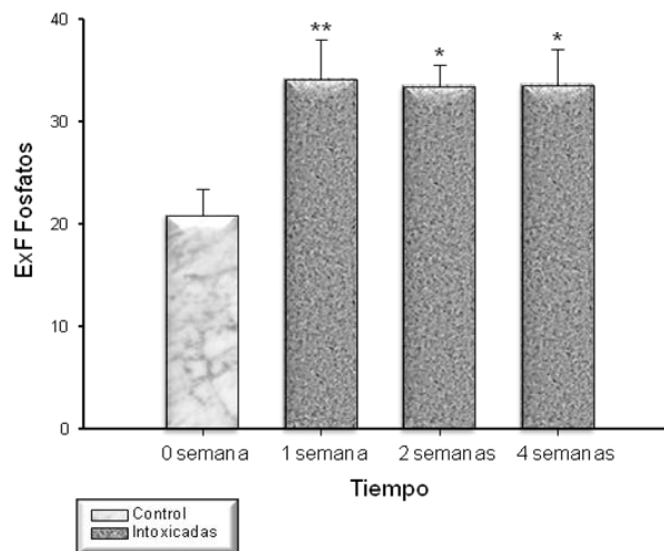


Figura 16. Excreción fraccional de Fosfatos expresada en % y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5 mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).

* p<0.05; ** p<0.01.

9. Niveles de Flúor

9.1. Flúor en plasma y en orina

La figura 17.A muestra las concentraciones de flúor en plasma expresadas en mg/L determinadas tanto en ratas controles como intoxicadas. Se puede observar que los niveles plasmáticos no aparecen modificados en la semana 1, siendo iguales a los que se observan en los animales controles (0.01 ± 0.00 mg/L es decir el limite de detección del equipo de medición). Sin embargo, estos niveles van aumentando a partir de la segunda semana (0.022 ± 0.001 mg/L), para llegar a niveles más altos a las 4 semanas (0.164 ± 0.007 mg/L).

La figura 17.B indica las concentraciones de flúor en orina expresadas en mg/L tanto en ratas controles como intoxicadas. Los resultados indican niveles de flúor arriba del limite de detección del equipo de medición en la orina del grupo control (0.39 ± 0.02 mg/L), de la primera (0.84 ± 0.05 mg/L), de la segunda (1.63 ± 0.07 mg/L) y de la cuarta semana de exposición (23.28 ± 2.94 mg/L).

9.2. Excreción fraccional de flúor

La figura 18 muestra los valores de excreción fraccional de flúor expresados en % y determinados en ratas controles como intoxicadas. Se puede observar que en los grupos controles y experimentales, los valores de excreción fraccional son superiores al 100% indicando que el flúor sufre una secreción tubular además de ser filtrado por el glomérulo (control: 113.63 ± 10.56 %; 1 semana: 521.32 ± 44.09 %; 2 semanas: 480.09 ± 18.97 % y 4 semanas: 428.94 ± 39.15 %).

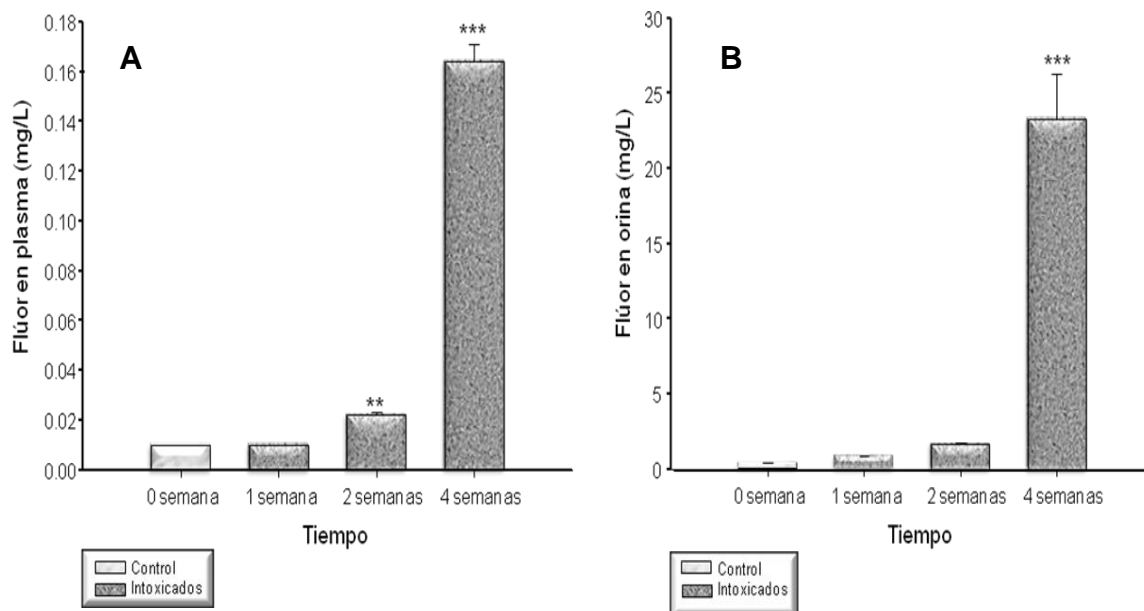


Figura 17. Concentración plasmática (A) y urinaria (B) de flúor expresadas en mg/dl y determinadas en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5). ** p<0.01; *** p<0.001.

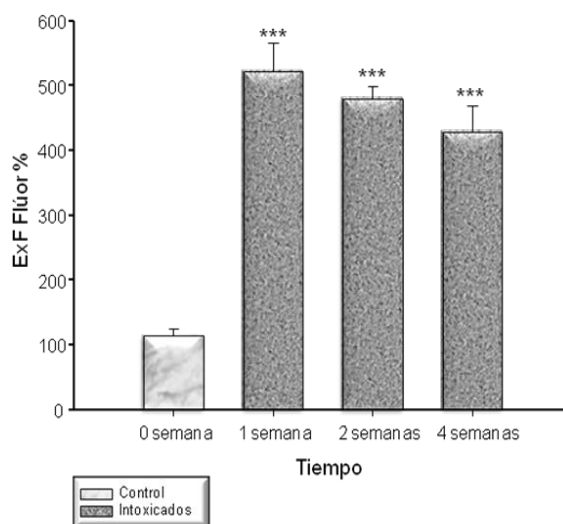


Figura 18. Excreción fraccional de flúor expresada en % y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).

*** p<0.001.

10. Proteinuria

La figura 19 presenta la proteinuria expresada en $\mu\text{g}/24\text{h}$ determinada en ratas controles y ratas intoxicadas. Se puede observar que desde la primera semana de exposición, la proteinuria aumenta (+44%). El incremento se sigue observando a la segunda (+46%) y a la cuarta semana (+132%) confirmando la agravación del daño renal a lo largo de la exposición.

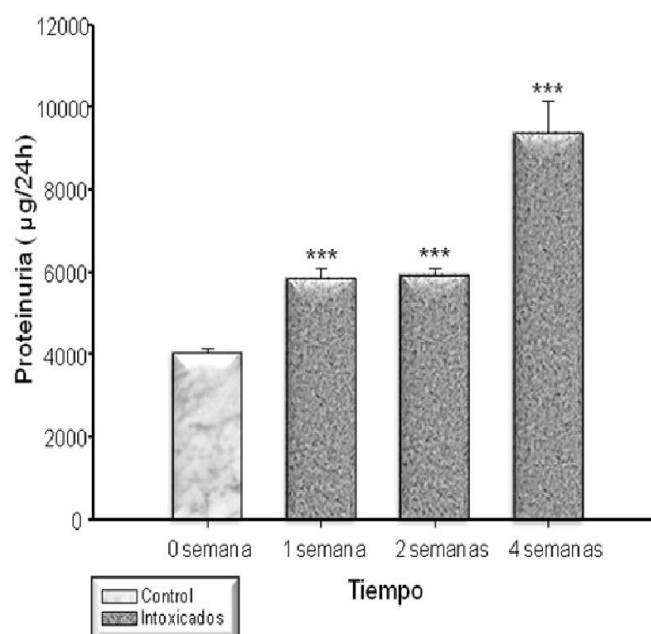


Figura 19. Proteinuria expresada en $\mu\text{g}/24\text{h}$ y determinada en los animales control y en los animales expuestos a 2.5 mg NaF/kg/día durante 1, 2 y 4 semanas. Las barras representan la media estadística \pm el error estándar de la media (controles n=8; 1 semana n=9; 2 semanas n=9; 4 semanas n=5).
*** $p < 0.001$.

IX. DISCUSIÓN

El flúor se encuentra presente en cantidades variables en el aire, agua y alimentos, y concentraciones elevadas tienen efectos tóxicos tanto en animales como en humanos, causando desordenes como fluorosis endémica o fluorosis industrial. La fluorosis causa daño a muchos órganos principalmente en el sistema esquelético y en dientes, también en la estructura y función de órganos como: cerebro, hígado, riñón y medula espinal. En la republica mexicana, los niveles de flúor en acuíferos se han detectado en concentraciones por arriba de los límites que marcan los correspondientes criterios de calidad del agua sobre todo en los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas. Se considera que más de 20 millones de mexicanos ingieren agua con concentraciones de F^- superiores al valor normativo (1.5mg/l) (CNVE, salud 2003). Esta situación ha tenido como resultado que la concentración de fluoruro aumente debido a la precipitación de este ion en las profundidades de las fuentes de suministro de agua que abastece a la población, provocando problemas importantes de salud como fluorosis esquelética y/o insuficiencia renal, aunado a estas patologías se ha visto que existe un mayor índice de personas con hipertensión y diabetes en estos lugares sobre todo que son de las enfermedades crónicas mas frecuentes. Por las características físico-químicas del flúor y por los datos obtenidos durante trabajos preliminares, se puede pensar que el flúor interactúa de manera muy fina con los mecanismos de regulación de la homeostasis (reabsorción de iones, minerales, oligoelementos, azucares a nivel de los epitelios intestinales y renales). Estos cambios fisiológicos podrían tener consecuencias graves en el balance mineral del organismo induciendo carencias en poblaciones frágiles (recién-nacidos, mujeres embarazadas, adultos mayores) y/o en poblaciones co-expuestas a otros agentes tóxicos (contaminantes en el agua, los productos alimenticios o en el aire que las hacen más sensibles a los efectos tóxicos del flúor). Sin embargo no se han hecho suficientes estudios donde relacionen la toxicidad del flúor con el desarrollo de patologías antes mencionadas. Es por esto que es importante hacer énfasis en el

flúor como un tóxico y realizar más estudios tanto en animales como humanos. Por esta razón el principal objetivo de este trabajo fue exponer a ratas Wistar a 2.5mg F-/kg/día de manera subcrónica para evaluar las alteraciones en la función renal y evidenciar modificaciones de la homeostasis en el modelo expuesto.

Elección de la dosis de exposición subcrónica a flúor.

Se ha demostrado que altas dosis agudas y crónicas de fluoruros provocan daños renales, (Usuda y col, 1998; Dote y col., 2000; Bogin y col., 1976; Karaoz y col., 2004; Shanthakumari y col., 2004; Menoyo y col., 2005; Verma y Guna, 2002) sin embargo, no se había estudiado el desarrollo del daño durante una exposición subcrónica (1, 2 y 4 semanas) a una dosis intermedia (2.5 mg F-/kg/día) administrada por vía oral. La dosis escogida para nuestro estudio corresponde a una realidad en el campo de la contaminación ambiental ya que equivale al nivel de exposición de varias poblaciones mexicanas expuestas a fluoruros en el agua de bebida como es el caso de San Luis Potosí y el norte de Sonora (Grimaldo, 1997; Grijalva, 2001). Así, en nuestro modelo, una semana de exposición a 2.5 mg F-/kg/día equivale a 6 semanas de exposición para un adulto de 70 kg o 3 semanas de exposición para un niño de 35 kg de peso corporal tomando 1.5 litros de agua con niveles de 20 ppm de F- como en el estado de Jalisco por ejemplo (Hurtado y Gardea, 2005).

Estado general de los animales y peso corporal.

En el presente trabajo el crecimiento y las variaciones de peso corporal de los animales no presentaron diferencias significativas y estuvieron en los rangos normales descritos por la literatura, aunque en algunos estudios se ha visto que la intoxicación con flúor a una dosis de 25 mg/L vía oral disminuye el peso corporal en los animales expuestos en comparación con los controles indicando una pérdida de peso debido a disminución de proteína en tejido (Chatterjea y Shinde, 2002).

Volumen de agua ingerida.

Reportes anteriores han mostrado que la ingesta en cantidades excesivas de flúor causa polidipsia (aumento anormal de sed) (Sauerbrunn y Ryan, 1965). Esto también fue reportado por Dote y col. (2000) donde administro vía oral 2.86 mg F⁻/kg flúor a ratas de laboratorio. En este trabajo también se observó que la cantidad de agua ingerida fue mayor en las ratas tratadas en la primera, segunda y cuarta semana de intoxicación en comparación con los controles, concluyendo que efectivamente el flúor produce polidipsia. Este fenómeno se encuentra en un marco más general de modificación del equilibrio hídrico durante la exposición a flúor: también el flujo urinario se encuentra aumentado de forma significativa a los diferentes tiempos de exposición. Este fenómeno fue notado en un estudio realizado por Usuda y col. (1998) donde administraron 135mg F⁻/kg en una sola dosis oral. Sin embargo, estudios complementarios son necesarios para saber exactamente si el aumento del consumo de agua esta debido a un efecto diurético del flúor (compensación de las perdidas hídricas) o si al contrario el aumento del volumen urinario esta debido al aumento a la polidipsia. En 1982, Rush y Willis demostraron que ratas expuestas a fluoruros (20 µg/min/kg en perfusión aguda), presentaban un incremento del flujo urinario justificado por los autores por una inhibición de la reabsorción renal de agua vía la inhibición de un mecanismo implicando el AMPc y normalmente activado por la vasopresina. Este dato, el más reciente de la literatura, sugiere que el efecto diurético del flúor suele ser el responsable del aumento de consumo de agua de los animales expuestos a flúor pero queda a confirmar en condiciones de exposición subcrónica y crónica.

Creatinina plasmática, velocidad de filtración glomerular y proteinuria.

Desde la primera semana de exposición, el incremento de la creatinina plasmática y la disminución de la velocidad de filtración glomerular (depuración de creatinina) que traduce la capacidad funcional de los glomérulos, indican que el flúor afecta la función renal en general y la función glomerular en particular. Sin embargo no genera todavía un daño renal moderado hasta la cuarta semana. El diagnostico

de daño leve para las semanas uno y dos y de daño moderado para la cuarta semana esta confirmado por los niveles de proteinuria observados. Estos datos son importantes porque uno de los objetivos del presente trabajo no era de inducir una insuficiencia renal grave sino de observar si el flúor podía afectar el funcionamiento renal alterando de forma fina los mecanismos de transporte e inducir cambios fisiológicos.

Presión Arterial.

Después de 2 semanas de exposición a flúor, se pudo observar que la presión arterial de los animales aumenta de manera importante (+ 20%). No existen reportes en la literatura que hayan descrito anteriormente esta información. Sin embargo, este tipo de alteración se puede esperar cuando se presencia un daño renal de origen glomerular ya que el aparato yuxtaglomerular, un conjunto de células localizado entre el glomérulo y el túbulo contorneado distal, es el responsable de la síntesis de muchas hormonas, enzimas y péptidos vasoactivos encargados de la regulación funcional del sistema cardiovascular (síntesis de renina, regulación de los niveles de angiotensina II y sus precursores).

Poliuria y daños tubulares.

Como lo explicamos anteriormente, si el flúor afecta la filtración de forma leve, muchos de los cambios en el manejo renal de solutos observados en nuestro estudio podrían tener un origen tubular ya sea debido a un efecto directo sobre los transportadores membranales o a un efecto indirecto consecuencia de la modificación de los movimientos hídricos en el riñón (efecto diurético del flúor). El incremento de la depuración osmolar, es decir de la porción de orina que se excreta en forma isotónica, a partir de la segunda semana de exposición demuestra la existencia de una poliuria ya mencionada en la literatura como consecuencia de la exposición a flúor (Dote y col., 2000). Sin embargo, el aumento de la excreción fraccional de fosfatos sin aumento de la concentración urinaria de estos aniones demuestra que lejos de ser un fenómeno general inespecífico, esta poliuria depende

de parámetros muy diferentes según el soluto observado. En presencia de flúor, no se observan cambios en el manejo renal de fosfatos hasta la segunda semana de exposición, cuando la reabsorción de fosfatos se encuentra entonces disminuida, posiblemente por una inhibición de los transportadores tubulares (NAPi2 principalmente). Esta inhibición de los transportadores renales de fosfatos es una explicación muy realista dado los ejemplos ya publicados de interacción entre F⁻ y el transporte de otros iones como el calcio (Borke y col., 1999).

Por lo que se refiere a los efectos del flúor sobre los fosfatos, los datos obtenidos sugieren también un efecto sobre el metabolismo de los fosfatos en general independientemente de su regulación renal. Así el aumento importante de la eliminación renal de fosfatos debería tener por consecuencia una disminución de su concentración plasmática (Barbier y col, 2004; Jacquillet y col, 2006); sin embargo observamos un aumento del contenido plasmático de estos aniones, significando que existe una fuente suplementaria de liberación de fosfatos hacia el plasma. Uno de los compartimentos principales de almacenaje de fosfatos, y en el cual se sabe que los fluoruros pueden actuar de forma importante, es el compartimento óseo (Knochel, 2002), por lo tanto se sugiere que los huesos podrían participar en este fenómeno de liberación plasmática de fosfatos.

Glucosa plasmática y niveles de Insulina

Pudimos observar como la intoxicación con flúor aumenta los niveles de glucosa en plasma desde la primera semana de intoxicación. En otros estudios publicados, se ha visto glucosuria e hiperglicemia en ratas experimentales expuestas a F⁻ y quizá debido a un incremento en la actividad en hígado de glucosa-6-fosfato (Suketa, 1985). El objetivo principal de este trabajo era de determinar los parámetros renales durante la exposición a flúor. Sin embargo, observando las modificaciones de los niveles de glucosa plasmática, nos pareció interesante determinar los niveles de insulina en nuestro modelo experimental. Determinando estos niveles, pudimos demostrar que al mismo tiempo que aumenta la glucosa plasmática, la insulina sufre una disminución significativa a cada uno de los tiempos de exposición. Estos

resultados demuestran que la modificación de la actividad de glucosa-6-fosfato no es la única responsable de los cambios observados sino que también la modificación de la secreción de insulina puede jugar un papel importante. En un estudio realizado por Rigalli y col. (1990), se noto también que una dosis oral aguda de 40 μ mol de NaF/100g de peso corporal produce la inhibición de la secreción de insulina seguida de una hiperglicemia. Es importante enfatizar que nuestros datos son los primeros que demuestran que la exposición subcrónica a flúor puede ser responsable de un síndrome pre-diabético, lo cual podría llevar a desencadenar enfermedades del metabolismo de la glucosa mas graves como es diabetes. Trivedi y col. (1993) realizo un estudio en pacientes que tenían fluorosis esquelética y dental y que han consumido desde el nacimiento agua con niveles de flúor por arriba del límite aceptable (2-13 mg/L), los cuales mostraron mayor intolerancia a la glucosa en comparación con aquellas personas que consumían agua con niveles de flúor menores 1 mg.

A la cuarta semana de intoxicación, se observa una excreción urinaria de glucosa significativamente aumentada, indicando la agravación del daño renal a nivel del túbulo proximal contorneado. Se podría también pensar en un efecto sobre los transportadores de glucosa de este segmento de la nefrona vía una saturación de los sistemas celulares responsables de la reabsorción renal de glucosa (GLUT-2, SGLT-1 o 2) por causa de la alta concentración plasmática y tubular de este azúcar. Sin embargo, la cinética de aparición de las alteraciones observada en el caso de los fosfatos orienta más la explicación en la dirección del daño tubular agravado.

Eliminación renal de flúor.

En este estudio se pudo observar un incremento de los niveles de flúor en plasma y orina a lo largo de la exposición siendo más notorio a las cuatro semanas. La importante diferencia de concentraciones plasmáticas y urinarias entre la semana dos y la semana 4 se debe seguramente a que en este intervalo el flúor llega a un cierto equilibrio en todos los compartimentos del organismo, saturando los órganos en los cuales se acumula (huesos principalmente y algunos tejidos blandos como los

riñones o el hígado por ejemplo). El cálculo de la excreción fraccional de flúor nos permitió determinar valores de la orden de 450 - 500 % en los animales expuestos a este tóxico. La excreción fraccional (ExF) representa la cantidad de una sustancia excretada por el riñón en relación a la cantidad filtrada de esta sustancia. Si la cantidad excretada es igual a la cantidad filtrada, entonces la ExF será de 100% (la sustancia no sufre ni reabsorción, ni secreción a nivel renal). Si la ExF es inferior a 100% entonces la cantidad excretada es menor a la cantidad filtrada: la sustancia sufre una reabsorción. Por fin, si la ExF es superior a 100% significa que la cantidad excretada por el riñón es superior a la cantidad filtrada y entonces la sustancia sufre una secreción desde el compartimento sanguíneo hacia la luz tubular difundiendo a través del epitelio renal. Así en nuestro estudio, aparece que el flúor, en condiciones saturantes, puede sufrir una secreción tubular. Esta información es también de gran importancia ya que hasta la fecha se pensaba que el flúor solo podía ser reabsorbido por el epitelio renal en grados muy variables (10 – 70% sea del lado apical como del lado basolateral) pero no se tenían pruebas de su secreción (Schiffel y Binswanger, 1982; Whitford, 1990).

En resumen, en este estudio de la exposición subcrónica a flúor se confirmaron datos existentes en la literatura pero obtenidos en condiciones experimentales muy diferentes así como se obtuvieron datos nuevos, complementando los conocimientos del tema y motivando nuevos estudios de interés mayor en el campo de la salud pública y ambiental de nuestro país (papel de los fluoruros en el desarrollo de patologías como la insuficiencia renal, la diabetes o la hipertensión).

Además este proyecto de tesis permitió la implantación de una nueva línea de investigación con perspectivas interesantes en el Laboratorio de Toxicología Renal de la Sección Externa de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

X. CONCLUSIÓN

La exposición a 2.5mg/kg/día de flúor durante una, dos y cuatro semanas, incrementa el flujo urinario, los niveles de creatinina en plasma, los valores de glucosa en plasma, disminuye los niveles de insulina, aumenta la excreción de fosfatos, aumenta la excreción de flúor y los niveles de proteínas en orina, además de aumentar significativamente los valores de presión arterial a partir de la segunda semana de intoxicación y aumentar significativamente los valores de glucosa en orina a partir de la cuarta semana de exposición a este tóxico.

XI. REFERENCIAS

- Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. 2003. Resumen de Salud Pública. Fluoruros, Fluoruro de Hidrogeno y Flúor. Departamento de salud y servicios humanos de E.U. Servicio de Salud Pública. Atlanta, EU.
- Anasuya A. 1982. Role of fluoride in formation of urinary caculi: studies in rats. *Journal of Nutrition*. 112(9):1787-1795.
- Anderson W. J. 2002. Tratamiento nutricional de la diabetes mellitus. En: nutrición en Salud y enfermedad. pp: 1578.
- Barbacow F. 1983. Intake, absorption and excretion of dietary fluoride. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 25:83-94.
- Barbier O., Jacquillet G., Tauc M., Poujeol P. y Cougnon M. 2004. Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 287:1067-1075.
- Blussry B.R. 1970. Chronic toxic effects in enamel organ. In: *Fluoride and Human Health*. World Health Organization. Geneva. pp: 230-238.
- Bogin E., Abrams M., Avidar Y. y Israeli B. 1976. Effect of fluoride on enzymes from serum, kidney, skeletal and heart muscles of mice. *Fluoride*. 9(1):42-46.
- Bohatyrenicz A. 1999. Effects of fluoride on mechanical properties of femoral bone in growing rats. *Fluoride*. 32:47-54.
- Boiving G., Chavassieux P., Chapuy M.C., Baud C.A. y Meunier P.J. 1989. Skeletal fluorosis: histomorphometric analysis of bone changes and bone fluoride content in 29 patients. *Bone*. 10:89-99.
- Borke J.L. y Whitford G.M. 1999. Chronic fluoride ingestion decreases ⁴⁵Ca uptake by rat kidney membranes. *Journal of Nutrition*. 129:1209-1213.
- Botha C.J., Nande T.W., Minnar P.P., Van-Amstel S.R. y Jansevan-Rensberg S.O. 1993. Two outbreaks of fluorosis in cattle and sheep. *Journal of the South African Veterinary Association*. 64:164-169.
- Budavari S. 1989. *The merck index*. 11th ed. Merck, Rhaway, NJ. pp: 1361-1362.

- Cachofeiro V., Lahera V. y Tresguerres A.F.J. 1999. Aspectos anatomofuncionales del riñón. En: Fisiología Humana. 2da. Edición. McGraw Hill interamericana. Madrid. pp: 378-388.
- Carlson C.H., Armstrong W.D. y Singer L. 1960. Distribution and excretion of radiofluoride in the human. The Society for Experimental Biology and Medicine. 104:235-239.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1993. Fluoridation Census 1992. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Prevention Services, Division of Oral Health. Atlanta, GA: U.S.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CNVE), salud, 2003.
- Chatterjea M.N y Shinde R. 2002. Text book of medical biochemistry, fifth ed. Jaypee Brothers, Medical Publishers Ltd., New Delhi. pp: 317.
- Chen P.S., Smith F.A. y Gardner D.E. 1956. Renal clearance of fluoride. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 92:879-883.
- Chenoweth M.B. y Hake C.L. 1962. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. Annual Review Pharmacology. 2:363-398.
- Cittanoval M.L., Lelongt B., Verpot M.C., Geniteau L.M., Wahbe F., Prie D., Coriat P. y Ronco P.M. 1996. Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. Anesthesiology. 84(2):428-435.
- Dahlgren B.E. 1979. Fluoride concentrations in urine of delivery ward personnel following exposure to low concentrations of methoxyflurane. Journal Occupational Medical. 21:624-626.
- Daston G.P., Rehnberg B.F., Carver B. y Kavlock R.J. 1985. Toxicity of sodium fluoride to the postnatally developing rat kidney. Environmental research. 37:461-474.
- Dinman B.D., Backenstos D.L. y Carter R.P. 1976a. A five year study of fluoride absorption and excretion. Journal Occupational Medical. 18:17-20.

- Dote T., Kono K. y Usuda K. 2000. Acute renal damage dose response in rats to intravenous infusion of sodium fluoride. *Fluoride*. 33(4):210-217.
- Dreisbach H.R. 1983. Corrosivos. En: manual de toxicología clínica. Ed. Manual Moderno S.A. de C.V. México. pp: 198-201.
- Ekstrand J. 1977. Fluoride Concentrations in saliva after single oral doses and their relation to plasma fluoride. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 85:16-17.
- Ekstrand J. y Ehrnebo M. 1983. The relationship between plasma fluoride, urinary excretion rate, and urine fluoride concentrations in man. *Journal Occupational Medical*. 24:745-748.
- Ekstrand J. y Koch G. 1980. Systemic Fluoride absorption following fluoride gel application. *Journal Dental Research*. 59:1067.
- Ekstrand J., Hardell L.I. y Spak C.J. 1984a. Fluoride balance studies on infants in a 1ppm water fluoride area. *Caries Research*. 18: 87-92.
- Ekstrand J., Spak C.J. y Flach J. 1984b. Distribution of fluoride to human breast milk following intake of high doses of fluoride. *Caries Research*. 18:93-95.
- Environmental Protection Agency. 1980. Reviews of the environmental effects of pollutants: IX. Fluoride. Cincinnati, OH: Health Effects Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. EPA-600/1-78-050.
- Feinfeld D.A., Levine R.D., Fleischner G. y Levine S.D. 1976. Detection of ligandin in perfusates from transplanted kidney as a test for tubular necrosis. *Kidney International*. 10:606.
- Finger G.C. 1961. Fluorine Resources and Fluorine Utilization. *Advance Fluorine Chemistry*. 2:35-54.
- Ganong W.F. 2000. Formación y excreción de la orina. En: *Fisiología Médica*. 17va. Edición. Manual Moderno.
- Grijalva H.MI., Barba L.ME. y Laborín A.A. 2001. Ingestión y excreción de fluoruros en niños de Hermosillo, Sonora, México. *Salud Pública de México*. 43(2):127-134.

- Grimaldo M., Turrubiarres F., Milan J., Pozos A., Alfaro C. y Díaz-Barriga F. 1997. Endemic fluorosis in San Luis Potosí, México III. Screening for fluoride exposure with a geographic information system. *Fluoride*. 30(1):33-40.
- Guo Z., Moisley R.B. y Wasson S.J. 2001. Dissociation of sulfur hexafluoride tracer gas in the presence of an indoor combustion source. *Journal of the Air and Waste Management Association*. 51:616-622.
- Gupta S.K., Gambhir S., Mittal A. y Das B.K. 1993. Skeletal scintigraphic findings in endemic skeletal fluorosis. *Nuclear Medicine Communication*. 14:384-388.
- Guy W.S., Taves D.R. y Brey W.S. 1976. Organic fluorocompounds in human plasma: prevalence and characterization. *American Chemical Society*. 28:117-134.
- Hance C.D., Solomon P.A. y Salmon L.G. 1997. Hydrofluoric acid in the southern California atmosphere. *Environmental Science and Technology*. 31:956-959.
- Hodge H.C. 1961. Metabolism of fluorides. *Journal of the American Medical Association*. 177:313-316.
- Hurtado J.R. y Gardea T.J. 2005. Estimación de la exposición a fluoruros en Los Altos de Jalisco, México. *Salud Pública de México*. 47(1):58-63.
- Inkielewicz I. y Krechniak J. 2003. Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride*. 36(4):263-266.
- Jacquillet G., Barbier O., Cougnon M., Tauc M., Namorado MC., Martin D., Reyes JS y Poujeol P. 2006. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 290: 127-137.
- Jamberg P.O., Ekstrand J. y Ehrnebo M. 1983. Renal excretion of fluoride during water diuresis and induced urinary pH-changes in man. *Toxicology Letters*. 18:141-146.
- Jaramillo J.F. y Rodriguez V.M.L. 2006. Toxicología renal. En: *Toxicología Básica. Textos Universitarios. Ciencias Biomédicas*. México. pp: 137-166.
- Jiménez C.A. 1990. *Tablas de composición de alimentos*. Barcelona: Wander.
- Karaoz E., Oncu M., Gulle K., Kanter M., Gultekin F., Karaoz S. y Mumcu Ethem. 2004. Effect of Chronic Fluorosis on Lipid Peroxidation and Histology of Kidney

- Tissues in First and Second Generation Rats. *Biological Trace Element Research*. 102:199-208.
- Karaoz E., Oncu M., Kanat G., Kanter M., Gultekin F. Karaoz S. y Mumcu E. 2004. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first and second generation rats. *Biological Trace Element Research*. 102:199-208.
 - Kathleen M.L. y Escote S.S. 1998. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 9na edición. McGraw Hill Interamericana. México. pp: 33-36.
 - Khalil-Manesh F., Gonick H.C., Cohen A.H., Alinovi R., Bergamaschi E., Mutti A. y Rosen V.J. 1992. Experimental model of lead nephropathy. 1. continuous high dose lead administration. *Kidney International*. 41:1192-1203.
 - Knochel J.P. 2002. Fosforo. En: *Nutrición en Salud y Enfermedad*. 9° ed. McGraw Hill Interamericana. México. pp:183-194.
 - Kopple J.D. 2002. Trastornos renales y nutrición. En: *Nutrición en Salud y Enfermedad*. 9° ed. McGraw Hill Interamericana. México. pp: 1669-1670.
 - Kristiansen S. *Práctica de la infertilidad del primero ministro de Houston's*. <http://www.biopsicologia.net/inicio.php4>
 - Krook L. y Minor R.R. 1998. Fluoride and alkaline phosphatase. *Fluoride*. 31:177-182.
 - Kunzel W. y Fischer T. 1997. Rise and fall of caries prevalence in German towns with different fluoride concentrations in drinking water. *Caries Research*. 31:166-173.
 - Laguna J. y Piña G.E. 1990. metabolismo de los carbohidratos. En: *Bioquímica*. JGH editores. Latinoamérica, S.A. de C.V. México. pp: 1990.
 - Lakshmi V.M. y Pratap R.K. 2000. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. 33(1):17-26.
 - Levin J.R. 2002. Carbohidratos. En: *Nutrición en salud y enfermedad*. 9na edición. McGraw Hill Interamericana. pp: 66.
 - Lim J.K., Renaldo G.J., Chapman P. 1978. LD₅₀ of SnF₂, NaF and Na₂PO₃F in the mouse compared to the rat. *Caries Research*. 12:177-179.

- Loyola J.R.P., Pozos G.A.J. y Hernandez G.J.C. 1998. Bebidas embotelladas como fuentes adicionales de exposición a flúor. *Salud publica*. 40(5):438-441.
- Martínez A.JR. 2002. El problema del flúor en Bélgica: ¿Una nueva alarma alimentaria en Europa?. *Nutrición hospitalaria*. 6:259-261.
- Mc Clure F.J., MitchellH.H. y Hamilton T.S. 1945. Balances of fluorine ingested from various sources in food and water by five young men. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*. 27:159-170.
- McCann H.G. y Bullock F.A. 1957. The effects of fluoride ingestion on the composition and solubility of mineralized tissues of the rat. *Journal Dental Research*. 36:391-398.
- Menoyo I., Rigalli A. y Puche C.R. 2005. Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittel Forschung Drug Research*. 8:455-460.
- Mueller W.H. 1994. Sodium fluoride. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, eds. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 4th Edition, Vol. 11. New York, NY: Jhon Wiley and Sons, 429-428.
- National Academy of Sciences. 1971. Biologic effects of atmospheric pollutants: Fluorides. National Academy of Sciences, National research Council, Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants. Washington, DC. pp: 239.
- National Research Council, Bernard Meyer Wagner, National Research Council (U.S.), Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, Subcommittee on Health Effects of Ingested Fluoride. 1993. *Health Effects of Ingested Fluoride*. National Academies Press. Washington. pp: 181.
- National Research Council. 1989. Recommended dietary allowances. 10th ed. Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy of Science. National Academy Press. Washington, DC. pp: 235-239.
- National Research Council. 2006. *Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA'S Standards*. Ed. National Academies.

- Neuman W.I., Neuman M.W. y Mair E.K. 1950. The surface chemistry of bone: II. Fluoride deposition. *Journal of Biological Chemistry*. 187:655-661.
- Nielsen H.F. 2002. Minerales ultratraza. En: *Nutrición en salud y enfermedad*. 9° ed. McGraw Hill. México. pp: 333-335.
- Norma Oficial Mexicana NOM -062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- Patel D. y Chinoy N.J. 1998. Influence of fluoride on biological free radical reactions in ovary of mice and its reversal. *Fluoride*. 31(3):S27.
- Pérez B.F y Eleno B.N. 2001. Insuficiencia renal. En: *Fundamentos de Fisiopatología*. McGraw Hill Interamericana. Madrid. pp: 375.
- Rigalli A., Ballina J.C., Roveri E. y Puche R.C. 1990. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcified Tissue International*. 46:333-338.
- RTECS. 1991. Registry of Toxic effects of chemical Substances. Dept. of Health and Human Services, National Institute for Occupational Safety and Health. U.S.
- Rush G.F. y Willis L.R. 1982. Renal tubular effects of sodium fluoride. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 223(2):275-279.
- Sauerbrunn B.J. y Ryan C.M. Chronic fluoride intoxication with fluorotic radiculomyelopathy. *Annals of Internal Medicine*. 63(6):1074-1078.
- Schiffl H.H. y Binswanger U. 1982. Renal handling of fluoride in healthy man. *Renal Physiological* 5:192-195.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana: NOM 127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación DVIII 13, 18 de enero; 1996:41.
- Shanthakumari D., Srinivasalu S. y Subramanian S. 2004. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*. 204:219-228.
- Sharma A. y Chinoy N.J. 1998. Role of free radicals in fluoride-induced toxicity in liver and Kidney of mice and its reversal. *Fluoride*. 31(3):S26.

- Shashi A., Singh J.P. y Thapar S.P. 2002. Toxic effects of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride*. 35(1):38-50.
- Shia G. 1994. Fluorine. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, eds. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 4ta. Edition vol 11 New York NY: John Wiley and Sons. 241-267.
- Singer L. y Ophaug R.H. 1982. Ionic and nonionic fluoride in plasma (or serum). *CRC Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 18:111-140.
- Sognaes R.F. 1979. Historical Perspectives. En: *Continuing Evaluation of the Use of Fluorides*. Waterview Press, Boulder, CO. pp: 159-186.
- Spak C.J., Berg U. y Ekstrand J. 1985. Renal clearance of fluoride in children and adolescents. *Pediatrics*. 75:575-579.
- Spencer H., Osis D. y Lender M. 1981. Studies of fluoride metabolism in man. A review and report of original data. *Science of the Total Environment*. 17:1-12.
- Suketa Y., Asao Y., Kanamoto Y., Shakashita T. y Okada S. 1985. Changes in adrenal function as a possible mechanism for elevation of serum glucose by single large dose of fluoride. *Toxicology Applied Pharmacology*. 80:199-205.
- Sun G., Qiu L., Ding G., Qian C. y Zheng Q. 1998. Effects of β -carotene and SOD on lipid peroxidation induced by fluoride: An experimental study. *Fluoride*. 31(3):S29.
- Taylor J.M., Scott J.K., Maynard E.A., Smith F.A. y Hodge H.C. 1961. Toxic effects of fluoride on the rat kidney, I Acute injury from single large doses. *Toxicology Applied Pharmacology*. 3:278-289.
- Tejedor A. 1999. Manejo tubular del filtrado glomerular. En: *Fisiología Humana*. 2da edición. McGraw Hill Interamericana. Madrid. pp: 398.
- Trivedi N., Mithal A., Gupta S.K., Godbole for the Fluoride Collaborative Study Group. 1993. Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. *Diabetologia*. 36:826-828.
- Urbansky E.T. 2002. Fate of fluorosilicate drinking water additives. *Chemistry Review*. 102:2837-2853.

- Usuda K., Kono., Dote T., Nishiura K., Miyata K., Nishiura H., Shimahara M. y Sugimoto K. 1998. Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Archives of toxicology*. 72:104-109.
- Van Rensburg B.G. 1979. Metabolism of fluorides. *Tydskr Tandheelkd Ver S Afr*. 34:163-166.
- Vega G.S. Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México. Comisión nacional del agua. Gerencia de saneamiento y calidad de agua. México DF.
- Verma R.J. y Guna S.D.M. 2002. Hypocalcaemia in parental and F₁ generation rats treated with sodium fluoride. *Food and Chemical Toxicology*. 40:551-554.
- Vine M.F. 1994. Biological markers: Their use in quantitative assessment. *Advances in Dental Research*. 8(1):92-99.
- Wellwood J.M., Ellis B.G., Price R.G. y Hammond K. 1975. Urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase activities in patients with renal disease. *British Medical Journal*. 3:408-411.
- Whitford G.M. 1989. Plasma ion concentrations associated with acute fluoride toxicity. *Journal Dental Research*. 68:335.
- Whitford G.M. 1994a. Effects of plasma fluoride and dietary calcium concentrations on GI absorption and secretion of fluoride in the rat. *Calcified Tissue International*. 54:421-425.
- Whitford G.M. 1994b. Intake and Metabolism of Fluoride. *Advances Dental Research*. 8(1):5-14.
- Whitford G.M. 1996. The metabolism and toxicity of fluoride. 2da edición. Basel:Karger AG.
- Whitford G.M. y Augeri J.M. 1993. Net secretion of fluoride into the GI tract: effect of calcium in rats (abstract). *Caries Research*. 27:212.
- Whitford G.M. y Johnson N.A. 2003. Comparison of fluoride metabolism when administered as NaF or silicofluorides to rats. *Journal Dental Research*. 82 (Special Issue) Abst.81.

- Whitford G.M. y Pashley D.H. 1984. Fluoride absorption: The influence of gastric acidity. *Calcified Tissue International*. 36:302-307.
- Whitford G.M., Pashley D.H. y Stringer G.I. 1976. Fluoride renal clearance: A pH dependent event. *American Journal Physiology*. 230:527-532.
- Whitford G.M. 1990. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *Journal Dental Research*. 69:539-549.
- Whitford GM. 1989. The metabolism and toxicity of fluoride. In: *Monographs in oral science*. Myers HM. Editor. Basel: Karger. pp: 159.
- Wilcox G. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews*. 26:19-39.
- Willis L.R., McCallum P.W. y Higgins J.T. 1976. Exaggerated natriuresis in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 87:265-272.
- World Health Organization. 1996. Fluoride. En: WHO. *Trace elements in human nutrition and health*. Ginebra: WHO. 187-194.