



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTOS DEL FLUORURO DE SODIO A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE EL  
CRECIMIENTO DE HUESOS LARGOS EN MURINOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**CIRUJANO DENTISTA**

**P R E S E N T A :**

**ABRAHAM GARCÍA ORNELAS**

**DIRECTOR: DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO**

**ASESORES: DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN**

**C.D. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN**

MÉXICO, D. F.

2008

*ESTE ESTUDIO FUE FINANCIADO POR EL PROYECTO PAPIIT IN228407*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Odontología de la UNAM, en especial al Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero a la Dra. Maria Dolores Jiménez Farfán y al C.D. Luis Fernando Jacinto Alemán, por su total apoyo, comprensión y amistad en la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez (Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la DEPEI Facultad de Odontología, UNAM) por su apoyo en la técnica de microscopia electrónica de barrido.

Al Laboratorio de Materiales Dentales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación por permitirnos utilizar sus instalaciones, en especial al Mtro. Jorge Guerrero Ibarra por su apoyo en la elaboración de las pruebas de resistencia flexural.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	4
2.1 Características Físico-Químicas del Flúor.....	4
2.2 Farmacocinética y Farmacodinamia del Flúor.....	4
2.2.1 Absorción.....	4
2.2.2 Distribución.....	5
2.2.3 Excreción.....	6
2.3 Fuentes de Flúor.....	7
2.3.1 Naturales.....	7
2.3.2 Artificiales.....	8
2.3.2.1 Fluoración del Agua, Sal y Leche.....	8
2.3.2.2 Pastas Dentales, Enjuagues y Geles.....	10
2.3.2.3 Fluoruros Ocultos.....	11
2.4 Toxicología del Fluoruro.....	12
2.4.1 Efectos Tóxicos del Flúor Sobre Tejidos Blandos.....	12
2.4.2 Efectos Tóxicos del Flúor Sobre Tejidos Mineralizados.....	13
3. Planteamiento del Problema.....	15
4. Justificación.....	16
5. Objetivos.....	17
5.1 Objetivo General.....	17
5.2 Objetivo Específico.....	17
6. Hipótesis.....	18
7. Materiales y Métodos.....	19
7.1 Tipo de Estudio.....	19
7.2 Universo o Población.....	19
7.3 Variables.....	20
7.3.1 Variable Dependiente.....	20
7.3.2 Variable Independiente.....	20
7.4 Metodología.....	21
7.4.1 Estudios Morfométricos.....	23
7.4.2 Pruebas de Resistencia Flexural.....	24
7.4.3 Estudios Microscópico.....	24
7.4.4 Microscopia Electrónica de Barrido.....	26
8. Organización.....	28
8.1 Recursos Humanos.....	28
8.2 Recursos Materiales.....	28
8.3 Presupuesto.....	28
9. Resultados.....	29
9.1 Análisis Morfométricos.....	29
9.2 Pruebas de Resistencia Flexural.....	32
9.3 Microscopia Electrónica de Barrido.....	34
9.4 Análisis de depósitos de Calcio y Fosfato.....	35
10. Discusión.....	37
11. Conclusiones.....	41
12. Referencias Bibliográficas.....	42

## RESUMEN

Los fluoruros han sido ampliamente utilizados para la prevención de la caries dental. Sin embargo, su ingesta crónica y excesiva puede inducir efectos adversos en tejidos mineralizados como diente y hueso, provocando fluorosis dental y esquelética, respectivamente. Investigaciones en países endémicos de fluorosis dental como la India y China se ha demostrado una relación con la fluorosis esquelética, combinada con la baja estatura y talla. Estudios *in vivo* en animales han demostrado que diferentes concentraciones de fluoruro de sodio (NaF) son capaces de alterar el metabolismo óseo. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del NaF sobre el crecimiento de huesos largos en ratones de la cepa Balb/c. Para esto se utilizaron ocho hembras Balb/c de 4 semanas de edad asignadas aleatoriamente a 4 grupos: 0ppm (grupo control) 25, 50, y 70ppm *ad libitum*. A la 10ª semana de vida fueron apareadas considerando el tapón vaginal como día 0.5 de gestación. Se seleccionaron aleatoriamente 10 crías machos las cuales consumieron la misma concentración que sus madres. A la 24ª semanas de edad las crías fueron sacrificadas y los huesos largos de ambas extremidades fueron disecados. Las extremidades derechas fueron medidas longitudinal y diametralmente así como determinada su resistencia flexural. Las extremidades izquierdas fueron segmentadas para su estudio histológico y de microscopía electrónica. Los resultados de las mediciones longitudinales mostraron reducción al comparar los grupos experimentales con el control. El hueso más afectado fue la ulna. Los diámetros obtenidos presentaron una particularidad, donde el fémur no presentó la disminución pensada, además de que la tibia en el grupo de 70ppm mostró aumento en relación al grupo control. Los resultados de resistencia flexural indicaron que el humero y la ulna disminuían en base a la administración de fluoruro, no así fémur

y tibia que mostraban un patrón inverso. El análisis del espesor cortical por medio de microscopia electrónica de barrido mostró una reducción significativa en el húmero en base a la concentración administrada. La determinación de nódulos de calcio y fosfato por medio de las tinciones de Alizarina Roja y Von Kossa no mostró cambios importantes entre los grupos control y experimentales.

En base a los resultados obtenidos del análisis longitudinal, diametral, flexural, cortical y la determinación de nódulos de calcio y fosfato podemos decir que el fluoruro de sodio puede afectar el crecimiento y conformación ósea.

## 1. INTRODUCCION

El flúor ( $F^-$ ) es un elemento de la naturaleza catalogado en la tabla periódica como un halógeno y es el más electronegativo de todos, lo que le permite reaccionar o combinarse con la mayoría de los elementos, en particular con los metales formando compuestos denominados fluoruros. El papel del fluoruro en la prevención de la caries dental comenzó desde 1945 con la fluoración del agua. Desde entonces, muchas ciudades del mundo cuentan con agua fluorada y con otras fuentes de fluoruro en la sal, leche, suplementos, pastas dentales, colutorios, geles y barnices. No obstante que numerosos reportes avalan la efectividad de estas medidas. Diversas investigaciones q han demostrado los efectos tóxicos del fluoruro en órganos como el corazón, hígado, pulmones, huesos y dientes. El tema de mayor investigación sobre la toxicidad del flúor es la fluorosis dental, caracterizada por manchas en el esmalte debido a la hipoplasia e hipomineralización. Se ha demostrado que en zonas endémicas de fluorosis dental la talla corporal es menor comparada con zonas no endémicas. Los mecanismos de daño propuestos incluyen entre otros citotoxicidad y muerte celular. Los límites de seguridad en la utilización de fluoruros ha sido un tema de amplia discusión entre investigadores. En el presente estudio se evalúan los efectos óseos por la administración crónica de fluoruro de sodio en ratones. Y las repercusiones en el crecimiento longitudinal, diametral, resistencia felxural, espesor cortical y disposición de los depósitos de calcio y fosfato.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL FLÚOR

El flúor ( $F$ ) es un gas amarillo sumamente tóxico, clasificado dentro del grupo VIIB de la tabla periódica, número atómico 9 y peso atómico 18.9989. Compone alrededor de 0.065% del peso de la corteza terrestre. Este halógeno es el elemento más electronegativo por lo que es capaz de reaccionar con metales y no metales para producir fluoruros. Uno de los fluoruros más conocido es el fluoruro de sodio ( $NaF$ ).<sup>1,2</sup>

### 2.2 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL FLÚOR.

#### 2.2.1 ABSORCIÓN

La absorción del  $F^-$  se realiza en el estómago y en la parte proximal del intestino delgado (duodeno). La ionización de ácido clorhídrico ( $HCl$ ), favorece la formación de ácido fluorhídrico ( $HF$ ), que puede difundirse con mayor facilidad a través de las membranas celulares digestivas. La presencia de cationes como el  $Ca$  y/o  $Al$  evitan la absorción del  $F^-$  al formar compuesto de baja solubilidad. La absorción  $NaF$  se realiza aproximadamente en 30 minutos, aunque esto puede cambiar dependientemente de la edad, dieta alimenticia y altura geográfica.<sup>3</sup> Otra variable que es considerada dentro de la absorción del  $F$  es la forma química del compuesto ( $NaF$  o  $Na_2PO_3F$ ) debido a las



diferencias en la capacidad de ionizar en base a la naturaleza de unión iónica o covalente de este <sup>4</sup>.

### 2.2.2 DISTRIBUCIÓN

La estancia del F<sup>-</sup> en sangre depende de la frecuencia y cantidad de ingesta. Se ha reportado que el fluoruro no se une a ninguna proteína plasmática, por lo que se considera que las concentraciones entre plasma y líquido intersticial son similares (figura 1) <sup>5</sup>.

El F<sup>-</sup> tiene una alta afinidad por la apatita de huesos y dientes debido a su tamaño iónico y electronegatividad <sup>6</sup>. Cuando el flúor se incorpora al trabeculado óseo de los cristales, los iones de flúor remplazan a los iones hidroxilo (OH), esto resulta en la formación de una estructura más estable que la hidroxiapatita (HA) llamada fluorapatita (FA). La unión del F<sup>-</sup> a los iones de Ca adyacentes otorga más fuerza y una estructura cristalina más compacta, confiriéndole a la FA una menor solubilidad (a un pH por debajo de 4.5) que a la HA ( por debajo de 5.5) <sup>7</sup>.

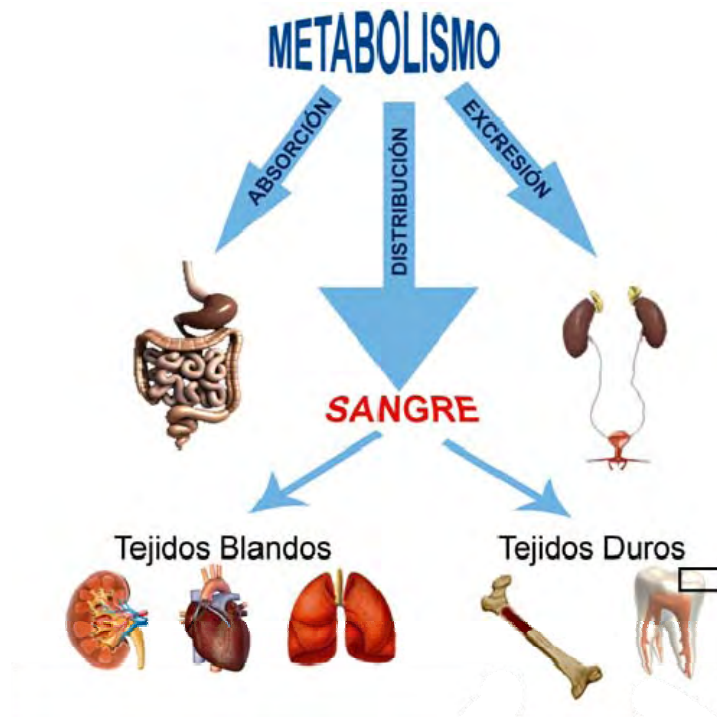


Figura 1. Metabolismo del flúor

### 2.2.3 EXCRECIÓN

La disminución de la concentración de  $F^-$  en plasma se debe a su excreción renal y a la absorción en los tejidos duros (hueso y diente). El  $F^-$  puede filtrar libremente por los capilares glomerulares, experimentando reabsorción variable dependiendo del pH renal, la cantidad de HF y la impermeabilidad de los epitelios a la forma iónica del  $F^-$ . La edad, la dieta y altura geográfica son factores que modifican la reabsorción del elemento<sup>8</sup> (Figura 2).

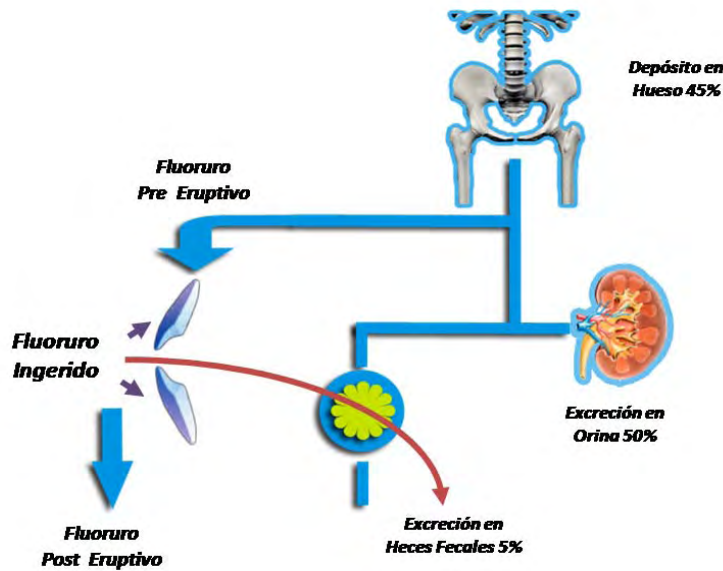


Figura 2. Excreción del flúor

## 2.3 FUENTES DE FLÚOR

El  $F^-$  no se encuentra en forma libre en la naturaleza, sino formando fluoruros, ampliamente distribuidos en el aire, agua y suelo, así como en las plantas y los animales.<sup>9-11</sup>

- Aire: en forma de gases o partículas.
- Agua: principalmente como iones fluoruro o combinados con Al.
- Suelo: principalmente combinados con Ca o Al.

### 2.3.1 NATURALES

En el medio ambiente, los fluoruros están presentes de forma natural debido a la erosión de rocas o a emisiones volcánicas. Considerando las cantidades emitidas y las

concentraciones presentes tanto de forma natural como por los efectos de los organismos vivos, los fluoruros más comunes son el ácido fluorhídrico (HF), el fluoruro de calcio ( $\text{CaF}_2$ ), el fluoruro de sodio (NaF), el hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ) y los fluorosilicatos. <sup>12</sup>

En las aguas de la litosfera, tales como ríos, las concentraciones del fluoruro dependen de la proximidad de las fuentes naturales o artificiales de la emisión, variando su concentración de 0.01 a 0.3 mg/L. El fluoruro en el agua de mar presenta concentraciones de 1.2 a 1.5 mg/L. En áreas rocosas o donde hay actividad geotérmica o volcánica, el fluoruro se presenta en niveles altos (hasta 50 mg/L) también se puede encontrar en el agua subterránea. <sup>13</sup>

En el aire, el fluoruro emitido naturalmente (volcanes) o por actividades humanas en forma gaseosa, se deposita generalmente próximo a la fuente de emisión (niveles de fluoruro de 2-3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). En áreas sin fuentes próximas emisoras, las concentraciones del fluoruro en aire son generalmente menores a 0.1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  <sup>14</sup>.

## **2.3.2 ARTIFICIALES**

### **2.3.2.1 FLUORACIÓN DEL AGUA, SAL Y LECHE**

Los fluoruros son importantes químicos utilizados en la industria. Los más comunes son para la producción de aluminio, la fabricación de químicos especiales

para la refrigeración y el aire acondicionado por fluorocarbonos, la fluoración de agua potable y la fabricación de productos dentales fluorados.<sup>15</sup>

En 1944 la comisión de la ciudad de Grand Rapids, Michigan después de numerosas investigaciones, votaron por agregar NaF al agua potable. En 1945, Grand Rapids se convirtió en la primera ciudad en el mundo con agua fluorada.<sup>16</sup>

Desde esa fecha otras ciudades adoptaron la fluoración del agua potable como medio preventivo de caries. Numerosos estudios son consistentes al demostrar la reducción de caries de 40% a 49% en dentición primaria y de 50% a 59% para dientes permanentes<sup>17,18</sup>.

La concentración considerada óptima de fluoruro en el agua potable es de 0.7-1.2 ppm<sup>19</sup>.

Por otra parte la fluoración de la sal de cocina, fue sugerida por H.J. Wespi<sup>20,21</sup> en 1955, como medida sustitutiva a la fluoración del agua potable. El programa se inició en áreas de Suiza con una dosis de 90mg F<sup>-</sup>/Kg de sal. Al no encontrar resultados estadísticamente significativos en la disminución de la caries dental<sup>22</sup>, se ensayaron concentraciones superiores, hasta llegar alcanzar concentraciones de 250 mg de F<sup>-</sup>/ Kg<sup>23</sup>.

Algunos estudios posteriores en Hungría<sup>24</sup> evidenciaron la dificultad de dosificación del flúor agregado a la sal de cocina, por lo que los mismos autores reconocieron la superioridad de la medida de fluoración del agua.<sup>24,25</sup>

Así en 1991 en México se llevó a cabo el Seminario Internacional de Fluoración de la Sal, proyecto iniciado por el gobierno del Estado de México donde se establece la cantidad de  $250 \pm 50$  mg/kg de ión  $F^-$  en la sal de mesa <sup>26</sup> como medida preventiva de salud pública contra la caries dental.

En 1994 se analizó la posibilidad de la fluoración de la leche, esta medida aún existe en el Reino Unido puesto que se cuenta con una sistema de distribución de leche bien desarrollado y los procedimientos técnicos para producir leche fluorada son seguros. <sup>27</sup>

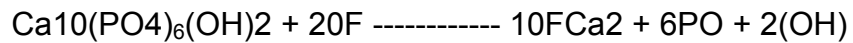
### **2.3.2.2 PASTAS DENTALES, ENJUAGUES, GELES**

Los dentífricos para adultos presentes en el mercado nacional suelen contener fluoruros en concentraciones de 1000 a 1500  $\mu\text{g/g}$ . algunos productos infantiles contienen niveles de 250 a 500  $\mu\text{g/g}$ .

Los fluoruros utilizados en la elaboración de pastas dentales son el NaF y/o el fluoruro de estaño ( $\text{SnF}_2$ ) (por su fácil y rápida disolución) <sup>28</sup>. Otro compuesto utilizado es el monofluorofosfato de sodio (MFP) y algunas aminos orgánicas que poseen el  $F^-$  enlazado mediante un enlace orgánico <sup>29,30</sup>.

Los enjuagues bucales comercializados para uso doméstico suelen contener entre 230 y 500 mg/l de  $F^-$  mientras que los enjuagues destinados a un uso periódico (semanal o quincenal) suelen contener 900-1000 mg.

Los compuestos fluorados en forma de enjuagues, geles, barnices o dentífricos dispensan al medio bucal una concentración mayor de 100ppm de F<sup>-</sup> generando una reacción química en la superficie del esmalte. El cristal de apatita se descompone y el fluoruro se combina con los iones de Ca, dando como resultado la formación de fluoruro de calcio.<sup>2, 31</sup>



Este fluoruro de calcio no se disuelve en la saliva con tanta rapidez como en el agua y se mantiene por un periodo de dos semanas o más, después de una sola aplicación tópica de NaF al 2 %<sup>32</sup>.

Los geles de fluoruro más comunes contienen 0.2% a 1% F<sup>-</sup>. El tratamiento con gel a veces se recomienda para pacientes con alto riesgo de caries, en combinación con clorhexidina. El fluoruro gelificado al 1% no debe usarse en niños<sup>33</sup>.

### 2.3.2.3 FLUORUROS OCULTOS

Prácticamente todos los productos alimenticios de origen natural o industrial contiene cantidades variables de fluoruros. Se pueden encontrar concentraciones elevadas de estas en alimentos como carne de pescado y hojas de té<sup>34</sup>.

La concentración de F<sup>-</sup> en los productos alimenticios aumenta de manera significativa por el uso de fertilizantes superfosfatados, que contienen concentraciones importantes de fluoruros en forma de impurezas (1%-3%). El nivel de fluoruros en los alimentos también depende de su contenido en el agua utilizada en la preparación. Las

bebidas y los productos alimenticios secos como la leche en polvo, productos lácteos, jugos y refrescos representan una parte importante del fluoruro total ingerido <sup>35-37</sup>

## 2.4 TOXICOLOGÍA DEL FLUORURO

### 2.4.1 EFECTOS DEL FLÚOR SOBRE TEJIDOS BLANDOS

Diversos estudios en animales y humanos han demostrado la afección del F<sup>-</sup> a nivel sistémico (Cuadro 1). Estudios recientes indican que el F<sup>-</sup> puede causar estrés oxidativo, apoptosis y alteración en algunos mensajeros y en la expresión de los niveles de glicoproteína en neuronas del hipotálamo <sup>30</sup>.

Análisis histopatológicos en modelos animales han mostrado que el F induce congestión de los alveolos pulmonares, hiperplasia y necrosis de las células alveolares, así mismo, vénulas prominentes, descamación epitelial y presencia de macrófagos en los espacios alveolares, con infiltración inflamatoria peribronquial, perivascular, intraparenquimal y en el lumen del tracto respiratorio <sup>39</sup>.

En algunas zonas endémicas de fluorosis como la India esta patología ha sido relacionada con IQ bajo, sordera y *genu valgum* <sup>40</sup>.

Se ha demostrado que el fluoruro interfiere con las funciones de la glándula tiroides, cambios degenerativos en el sistema nervioso central, así como daño en las funciones cerebrales y desarrollo anormal del niño <sup>41</sup>. A nivel de tubo digestivo, la administración crónica de flúor puede asociarse a la presencia de síntomas dispépticos



<sup>42</sup>, **Waldbott et al**, reportaron también vómitos, dolor abdominal, diarrea y constipación intermitente <sup>43</sup>.

## EFFECTOS TOXICÓS DE FLÚOR EN TEJIDOS BLANDOS

Electrolitos y metabolitos plasmáticos (PO4- ↑, Ca2+↓, Glucemia↓, Urea ↑)	Appleton et al.	1995
Hipocalcemia (arritmia cardiaca y colapso cardiovascular)	Heard et al.	2001
Neuronas de lóbulo temporal (Citotoxico, Perdida de la memoria a corto plazo)	Varner et al.	1998
Hepatocito (Alteraciones en la membrana plasmática)	Wang et al.	2000
Macrófagos alveolares (Muerte celular)	Chen et al.	2001
Células epiteliales pulmonares (Alteraciones en la síntesis de proteínas)	Refsnes et al.	1999
Citotoxicidad Renal	Citanova et al.	1996
Espermatozoides (Aberraciones morfológicas, de maduración y numéricas)	Kumar et al.	1995

CUADRO 1. Efectos Tóxicos del Flúor a nivel Sistémico.

### 2.4.2 EFECTOS SOBRE TEJIDOS MINERALIZADOS

El F<sup>-</sup> es un elemento que tiene una gran afinidad por la hidroxiapatita, lo que favorece su incorporación a la estructura mineralizada de dientes y huesos causando fluorosis dental y/o esquelética respectivamente, ante un consumo elevado del mismo <sup>44</sup>. Los efectos perjudiciales de las altas concentraciones de F<sup>-</sup> en tejidos duros fueron establecidos previamente por **Lantz y Smith (1931)**<sup>45</sup>. Esto es debido a la ingesta excesiva de fluoruro durante los primeros 10 años de vida. Los huesos en el cuerpo humano constantemente se remodelan durante el curso de la vida. Numerosas investigaciones han demostrado que la incidencia de la fluorosis dental y esquelética

ha aumentado durante las tres últimas décadas debido a la amplia gama de fuentes de exposición disponibles <sup>46-49</sup>. Los niños que constantemente se encuentran expuestos a fluoruros muy a menudo presentan problemas de maduración ósea y dental como resultado de la exposición al F<sup>-</sup> en las etapas de desarrollo sensibles ( período prenatal, postnatal y pubertad) <sup>50</sup>. Las altas concentraciones fluoruro aumentan los índices de disposición y resorción ósea afectando la homeostasis del metabolismo de los minerales, principalmente la del calcio <sup>51</sup>. La calcificación de tejidos blandos puede presentarse en ligamentos. La exposición continua y repetitiva a los fluoruros causa la acumulación del F<sup>-</sup> en el cuerpo, trayendo como consecuencia fluorosis esquelética<sup>88</sup>. Este padecimiento afecta comúnmente a las personas de edad avanzada después de un periodo largo de la exposición, aunque en algunas zonas endémicas se puede presentar en niños <sup>52</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Son muchos los estudios que se tienen acerca de los efectos benéficos del F<sup>-</sup> sobre tejidos mineralizados (dientes y Huesos) todos ellos en su mayoría enfocados en la prevención de la caries dental y tratamiento de osteoporosis. Sin embargo pocos son los estudios que se tienen sobre los efectos tóxicos en tejido mineralizados, principalmente etapas de crecimiento y desarrollo.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La exposición a fluoruros no solo altera las interacciones físicas, químicas y biológicas de los tejidos mineralizados (huesos y dientes) en desarrollo, además repercute en el aspecto estético y funcional de los dientes y huesos.

La fluorosis dental endémica es una afección observada especialmente en zonas donde la cantidad de flúor en agua de consumo humano sobrepasa las 2 ppm. Se ha asociado frecuentemente a problemas relacionados con cambios dentales pero no con efectos a nivel sistémico lo cual ha valido su permanencia en los sistemas de salud pública de los países que utilizan la fluoración de agua, o sal de mesa, pues se considera que los cambios metabólicos a nivel de los tejidos dentarios son el estado terminal de los efectos tóxicos del flúor<sup>53</sup>.

Actualmente, México no cuenta con sistemas de regulación adecuados para la aplicación masiva de fluoruros. Pocos dentistas y médicos conocen los efectos tóxicos de flúor en altas concentraciones, tanto en su aspecto clínico como en el histopatológico, creando la necesidad de educar al profesional de la salud y a la población en general respecto del uso adecuado del mismo. En general, poca atención ha sido puesta a las alteraciones morfológicas de huesos largos debida a dosis excesivas de fluoruros. Considerando que durante el proceso de crecimiento y desarrollo óseo el flúor cuenta con participación, es importante determinar cuál es el efecto de este elemento en parámetros tales como el crecimiento longitudinal, diametral, resistencia flexural, así como sus manifestaciones histológicas. Siendo éste un aspecto de considerable importancia en cuanto a la bioseguridad de los fluoruros como agentes preventivos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del  $F^-$  a diferentes concentraciones en los huesos largos de ratones de la cepa BALB/c respecto al patrón estructural, óseo y sus efectos sobre el crecimiento.

### 5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar el efecto en el crecimiento óseo longitudinal y diametral inducido por NaF en ratones de la cepa BALB/c de 24 semanas de edad.
- Determinar las alteraciones de espesor cortical diametral inducida por NaF en huesos de ratones de la cepa BALB/c de 24 semanas de edad.
- Evaluar la resistencia felxural en huesos largos de ratones de la cepa BALB/c de 24 semanas de edad.
- Determinar los depósitos de calcio y fosfato en huesos de ratones de la cepa BALB/c de 24 semanas de edad.

## 6. HIPÓTESIS

La administración de  $F^-$  en forma sistémica altera el crecimiento longitudinal y diametral así como de la estructura mineralizada de huesos largos de ratones BALB/c.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1 TIPO DE ESTUDIO.

Experimental y longitudinal.

### 7.2 UNIVERSO

Ocho hembras Balb/c de 4 semanas de edad fueron asignadas aleatoriamente a diversos grupos donde consumieron diferentes concentraciones de NaF: 0ppm (grupo control) 25, 50, y 70ppm *ad libitum*. Las ratonas fueron apareadas alrededor de la 10<sup>a</sup> semana de vida consumiendo la concentración de NaF asignada. Se seleccionaron aleatoriamente 10 crías machos de primera generación que fueron asignados al mismo grupo de tratamiento al que pertenecieron sus madres. A las 24 semanas de edad, las crías fueron sacrificadas y los huesos largos disecados para su análisis.

## **7.3 VARIABLES**

### **7.3.1 VARIABLE DEPENDIENTE**

Alteraciones en el crecimiento, desarrollo y disposición de minerales en huesos largos de murinos Balb/c.

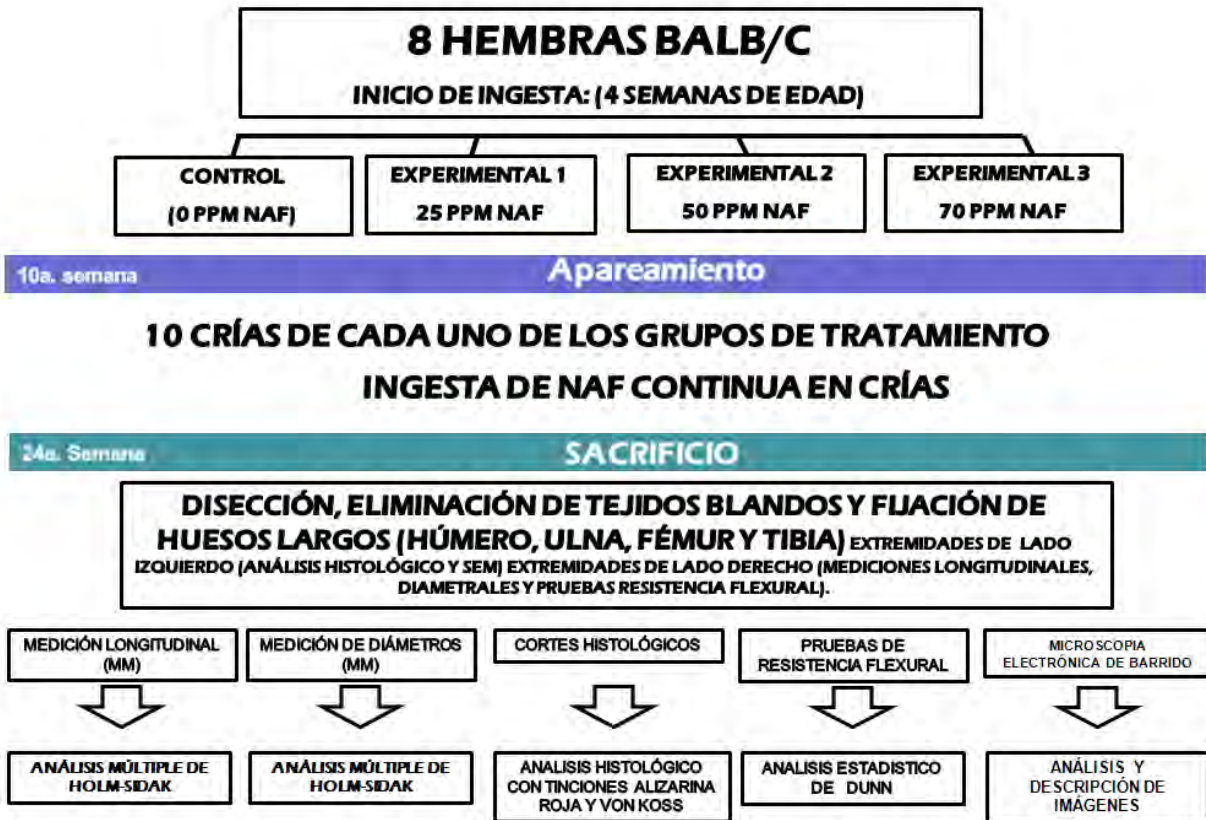
### **7.3.2 VARIABLE INDEPENDIENTE**

Concentraciones de NaF de 25, 50, 70 ppm.



## 7.4 METODOLOGÍA

Para el presente estudio se utilizaron 8 ratones hembras jóvenes (de 4 semanas de edad) de cepa Balb/c tomados del Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la F.O. de la U.N.A.M. Las hembras fueron asignadas aleatoriamente en grupos donde consumieron diferentes concentraciones de NaF: 0ppm (grupo control) 25, 50, y 70ppm “*ad libitum*” en su agua de consumo (Cuadro 2). Desde la 4ª semana todas las hembras experimentales consumieron agua con NaF llevando una dieta de alimento para ratones de laboratorio comercial “*ad libitum*”; al grupo control se le administró agua desionizada. El peso del animal y la ingesta de líquidos se registraron cada tercer día. Alrededor de la 10ª semana de edad las ratonas fueron sometidas a apareamiento. La aparición del tapón vaginal fue considerada como día 0.5 de gestación. Durante la gestación todas las hembras consumieron concentración de NaF correspondiente al grupo asignado. Se seleccionaron aleatoriamente 10 crías macho de cada grupo experimental y control los cuales siguieron consumiendo las concentraciones de fluoruro de sodio del grupo al que pertenecieron sus madres. A las 24 semanas de edad, las crías fueron sacrificadas y los huesos largos de extremidades anteriores y posteriores derechos e izquierdos (húmero, ulna, fémur y tibia) se disecaron, etiquetaron y fijaron en paraformaldehído al 4 %.



CUADRO 2. Metodología.

### 7.4.1 ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS

Los huesos largos derechos fueron medidos en sentido longitudinal (de epífisis proximal a epífisis distal) y diametral (diámetro medio de los huesos largos). Las medidas lineales de huesos largos y diametrales se realizaron con un vernier (Eletronic digital Caliper, Fowler & NSK; modelo MAX-CAL) (Figura 3).

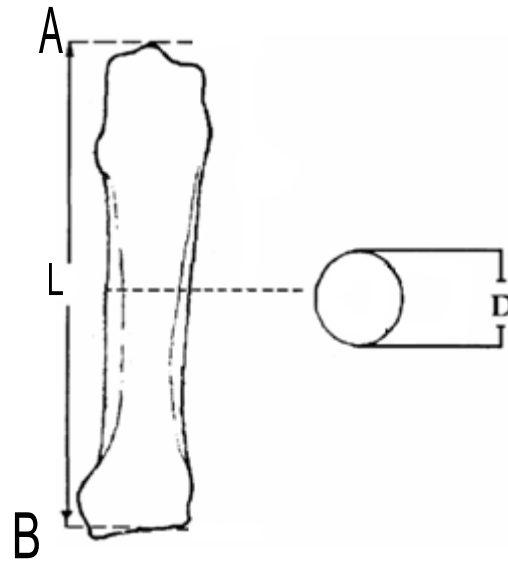


Figura 3. Medición de las distancias de epífisis proximal a epífisis distal en sentido longitudinal de huesos largos. L. longitud A. Epífisis Proximal. B. Epífisis Distal. D) Diámetro.

Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión al igual que ANOVA (Análisis de DUNN).

## 7.4.2 PRUEBAS DE RESISTENCIA FLEXURAL

Las pruebas de resistencia flexural se realizaron con una máquina Universal de Pruebas Mecánicas Instron mod. 5567, (soportes a una distancia de 11 mm) aplicando una fuerza constante a una velocidad de 1 mm/min hasta alcanzar la fractura del hueso (figura 4). Se realizaron medidas de tendencia central, dispersión y ANOVA (análisis de Dunn).

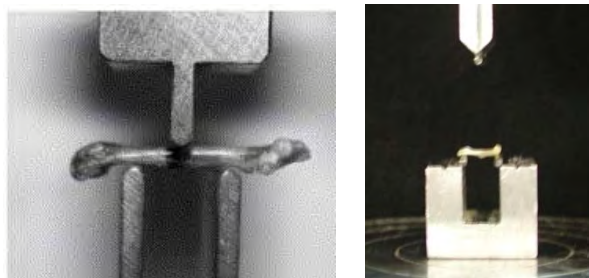


Figura 4. Colocación de hueso largo en máquina Instron para las pruebas de resistencia

## 7.4.3 ESTUDIOS MICROSCÓPICO

De los Grupo control y experimental (70ppm) se tomaron los huesos largos de lado izquierdo realizando dos cortes transversales de la parte media de tres milímetros de grosor se analizó la circunferencia cortical por medio del microscopio estereoscópico. Una de las muestras fue descalcificada con ácido nítrico al 5% y procesada convencionalmente para ser incluida en parafina y se realizaron cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$  (figura 5)

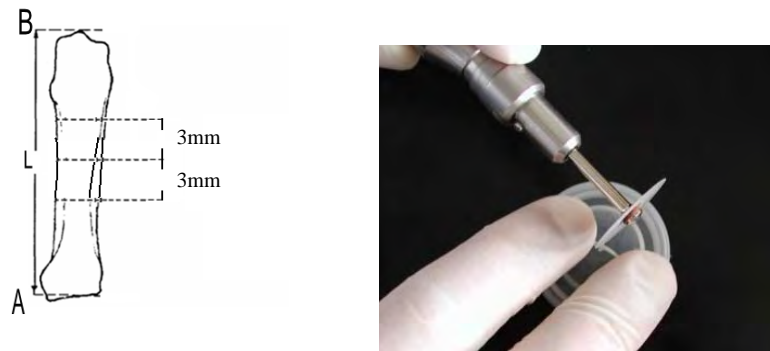


Figura 5. Cortes transversales de 3 mm de longitud para las pruebas de Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis Histológico

La otra muestra que se utilizó para el estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En los cortes incluidos en parafina se realizaron tinciones de Von Kossa (para determinar presencia de nódulos de fosfatos. Y Alizarina Roja (para determinar presencia de nódulos de calcio).

#### **Procedimiento de la alizarina roja S para sales de calcio.**

1. Desparafinado e hidratado de las muestras hasta agua destilada.
2. Colocar la solución en alizarina roja S, durante 5 minutos.
3. Exanimación microscópica. Cuando aparezca un color rojo-anaranjado sacudir el exceso de colorante.
4. Deshidratar y aclarar rápidamente a través de la solución de acetona, acetona-xileno y xileno por dos minutos cada una.
5. Montar con un medio resinoso.

## Método de Von Kossa para sales minerales

1. Desparafinado e hidratado de las muestras hasta agua destilada.
2. Colocación de las láminas en la solución de nitrato de plata al 5% durante 1 hora.
3. Enjuagar con agua destilada 4 veces por 5 minutos cada uno.
4. Colocación en solución fotográfica reveladora durante 2 minutos.
5. Enjuague con agua destilada, 2 veces por 5 minutos cada uno.
6. Colocación en la solución de trisulfato de sodio durante 5 minutos.
7. Lavado con agua corriente durante 2 minutos.
8. Contrastar con la solución de rojo nuclear resistente durante 5 minutos.
9. Lavado con agua corriente durante 2 minutos.
10. Deshidratación y aclaramiento en alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xileno, 2 veces cada uno, 2 minutos cada uno.
11. Montado con medio resinoso.

Se realizó el análisis microscópico a través de un microscopio Olympus BX-40. La cantidad de nódulos fosfato y calcio fue determinado semicuantitativamente en base al grupo control (-, negativo; +, positivo; ++, moderado y +++, elevado)

### 7.4.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las muestras de fémur y humero de lado izquierdo se deshidrataron en alcohol al 25%, 50%, 75% y 100% durante 5 minutos entre cada enjuague para ser observadas, tanto grupo control como experimental se analizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido marca Cambridge-Leica Microscope Stereoscan 440. El análisis

consistió en obtener micrografías a una ampliación desde un rango de 150X a 200X para garantizar que el diámetro de las muestras de fémur y humero abarcara el área a fotodocumentar. Los barridos de las muestras se realizaron a 20 KevV por un tiempo de 300 segundos para evitar que las muestras se polarizaran con la corriente de electrones y se obtuvieran imágenes contrastadas. Cada análisis se realizó por triplicado y se sacaron medidas promedio de grosor mineral para cada muestra control y experimental de fémur y humero.

## **8. ORGANIZACIÓN.**

### **8.1 RECURSOS HUMANOS.**

Técnico laboratorista.

Especialista en máquina universal de pruebas.

Especialista en microscopia electrónica de barrido.

Auxiliar en pruebas estadísticas

### **8.2 RECURSOS MATERIALES.**

Microscopio estereoscópico. (Nikon, PFX, Japón)

Tijeras para disección.

Fluoruro de sodio (T.J Backer Cat. 3688)

Tubos eppendorf

Tinción de hematoxilina y eosina

Microscopio Olympus BX 40 (Japón)

### **8.3 PRESUPUESTO.**

Esta investigación fue patrocinada por *PAPIIT IN228407* y el proyecto *DGAPA*



## 9. RESULTADOS

Al final del estudio no se registraron muertes a causa de la ingesta de fluoruros el peso de los ratones se registró en promedio en la siguiente tabla.

Control	23.69 gr
Grupo 25ppm	24.32 gr
Grupo 50ppm	24.06 gr
Grupo 70ppm	21.28 gr

Cuadro 3. Promedio de peso corporal de grupos control y experimental en gramos

### 9.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Al realizar la comparación longitudinal de los grupos experimentales contra el control en los 4 huesos analizados se observaron cambios en los huesos de la extremidad anterior. Se observó una reducción longitudinal del 7.25% al 24.25% en húmero y de 13.6% a 17.3% en ulna. En las extremidades posteriores conformadas por fémur y tibia, se encontró una reducción de 12.1% a 13.4% y, de 8.3% a 11.3%, respectivamente. Considerando lo anterior, el hueso que presentó los porcentajes mayores de reducción fue húmero seguido por ulna, fémur y tibia (Cuadro 4).

	Control (X±DE)	Exp25ppm (X±DE)	Exp50ppm (X±DE)	Exp70ppm (X±DE)
<b>TIBIA</b>	19.29±1.04*	17.67±0.79*	17.11±0.97*	17.15± 0.71*
<b>FÉMUR</b>	16.14±0.57*	14.19±0.46*	14.06±1.01*	13.98±0.75*
<b>ULNA</b>	13.29±1.24*	11.47±0.25*	10.78± 0.50	10.99±0.35
<b>HUMERO</b>	15.65±0.50*	14.52±0.55*	13.17±1.04*	11.85±0.61*

CUADRO 4. Resultados de medidas longitudinales de huesos largos de ratones de la cepa Balb/c. en promedio

\*Estadísticamente significativos. DE= Desviación Estándar

El ANOVA de los resultados de la medición longitudinal mostro diferencias estadísticamente significativas entre grupos control y experimentales ( $p \leq 0.001$ ) Al considerar los porcentajes de reducción, el húmero fue el hueso más afectado (Cuadro 5).

### Extremidad Anterior

<b>HUMERO (Proximal)</b>	<b>7.25 - 24.2%</b>
<b>ULNA (Distal)</b>	<b>13.6% - 17.3%</b>



### Extremidad Posterior

<b>FÉMUR (Proximal)</b>	<b>12.1% - 13.4%</b>
<b>TIBIA (Distal)</b>	<b>8.3% - 11.3%</b>



CUADRO 5. Resultados en porcentaje de la reducción longitudinal de huesos largos en los grupos experimentales de ratones de la cepa Balb/c.

Respecto a los diámetros de los huesos largos analizados la tibia y fémur mostraron disminución en los grupos experimentales 25 ppm y 50ppm, no así en 70 ppm. Este último grupo presentó cambios diametrales significativos en el fémur, además de mostrar un ligero aumento en Tibia. Sin embargo estos cambios no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa. Por otra parte la ulna y el húmero mostraron disminución diametral en relación proporcional a la cantidad de NaF ingerido. La ulna mostró significancia estadística en el grupo 25ppm y 70ppm y el humero únicamente en 70 ppm (cuadro 6).

	<b>Control (X±DE)</b>	<b>Exp25ppm (X±DE)</b>	<b>Exp50ppm (X±DE)</b>	<b>Exp70ppm (X±DE)</b>
<b>TIBIA</b>	1.12 ± 0.11	0.98 ± 0.17	1.07 ± 0.15	1.19 ± 0.24
<b>FÉMUR</b>	1.76 ± 0.24	1.47 ± 0.14	1.59 ± 0.22	1.71 ± 0.31
<b>ULNA</b>	1.24 ± 0.24	1.01 ± 0.11*	1.04 ± 0.14	1.01 ± 0.09*
<b>HUMERO</b>	0.76 ± 0.75	0.68 ± 0.68	0.69 ± 0.69	0.65 ± 0.65*

CUADRO 6. Resultados medidas Diametrales de huesos largos de ratones de la cepa Balb/c.  
\*Estadísticamente significativos. DE= Desviación Estándar

Analizando los porcentajes de reducción el hueso más afectado fue ulna, seguido por húmero, fémur y tibia (Cuadro 7).

## PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DIAMETRAL

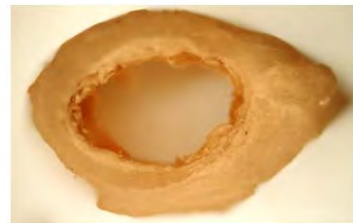
### Extremidad Anterior

<b><i>HUMERO (Proximal)</i></b>	<b>8.7% - 13.58%</b>
<b><i>ULNA (Distal)</i></b>	<b>16.26% - 18.67%</b>



### Extremidad Posterior

<b><i>FÉMUR (Proximal)</i></b>	<b>3.05% - 16.41%</b>
<b><i>TIBIA (Distal)</i></b>	<b>5.6% - 12.95%</b>



CUADRO 7. Resultados en porcentaje de la reducción diametral de huesos largos en los grupos experimentales de ratones de la cepa Balb/c.

## 9.2 PRUEBAS DE RESISTENCIA FLEXURAL

En el húmero se observó disminución de la resistencia en relación a la concentración administrada, presentado significancia entre los grupos experimentales 25ppm y 70ppm contra el control. La ulna presentó un fenómeno único, mostrando reducción únicamente en el grupo experimental 25ppm. En el fémur y la tibia presentaron un patrón inverso a húmero, al incrementar su resistencia en relación a la administración de fluoruro (Cuadro 8).

	<b>Humero</b>	<b>Ulna</b>	<b>Fémur</b>	<b>Tibia</b>
<b>Control</b>	239.42 mPa7/seg	51.03 mPa7/seg	59.62 mPa7/seg	35.84 mPa7/seg
<b>25 ppm</b>	252.81 mPa7/seg	61.03 mPa7/seg	51.58 mPa7/seg	39.14 mPa7/seg
<b>50 ppm</b>	128.74* mPa7/seg	16.73* mPa7/seg	57.46 mPa7/seg	67.88* mPa7/seg
<b>70 ppm</b>	135.25* mPa7/seg	48.96 mPa7/seg	120.33* mPa7/seg	102.91* mPa7/seg

CUADRO 8. Resultado estadístico de la resistencia flexural en huesos largos de ratones de la cepa Balb/c.

\* Estadísticamente significativas  $p \leq 0.001$ \*. mPa/seg = Mili Pascales sobre segundo

### 9.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

A través de la técnica de microscopia electrónica de barrido se obtuvieron las medidas de grosor cortical óseo de los huesos húmero y fémur.

El humero presentó reducción de 39.57%, 28.62% y 42.56% entre lo grupos de 25ppm 50ppm y 70ppm, respectivamente (Cuadro 9).

HÚMERO	Control (X±DE)	25 ppm (X±DE)	50 ppm (X±DE)	70 ppm (X±DE)
Promedio	264,5 $\mu\text{m}$ $\pm$ 92.6	159,8 $\mu\text{m}$ $\pm$ 10.2	188,8 $\mu\text{m}$ $\pm$ 56.6	151,9 $\mu\text{m}$ $\pm$ 3.6
Reducción	0%	>39,57%	>28,62%	>42,56%

CUADRO 9. Resultado del análisis de las mediciones corticales del húmero a través de Microscopia Electrónica de Barrido.

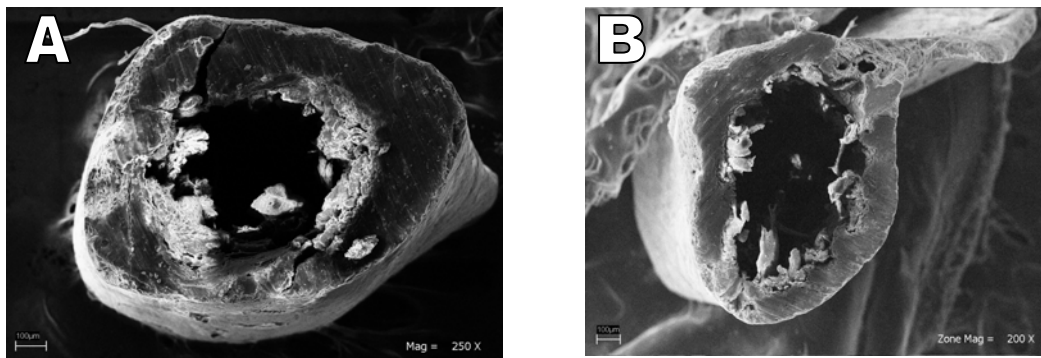


Figura 6..Grupo Contro de Humero, B. Grupo experimental de Húmero a 70ppm

El fémur mostró una reducción de 30,16% y 36,22% en los grupos de 25ppm y 50ppm respectivamente sin embargo en el grupo de 70ppm se encontró un aumento de 6,99%.

<b>FÉMUR</b>	<b>Control (X±DE)</b>	<b>25 ppm (X±DE)</b>	<b>50 ppm (X±DE)</b>	<b>70 ppm (X±DE)</b>
Promedio	292,2µm ± 66.0	203,9µm ± 36.3	63,78µm ± 13.6	312,4µm ± 70.8
Porcentaje	100%	>30,16%	>36,22%	<6,99%

CUADRO 11. Resultado del análisis de las mediciones corticales del fémur a través de la técnica de Microscopia Electronica de Barrido.

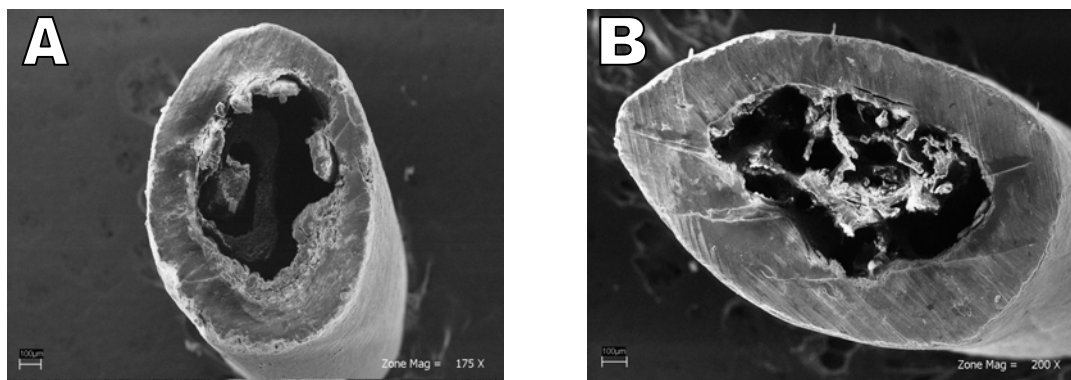


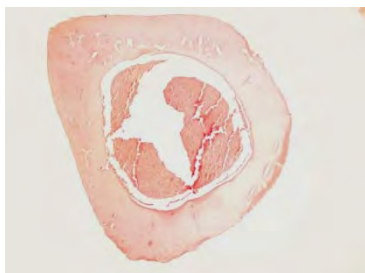
Figura 7 A. Grupo Contro de Fémur, B. Grupo experimental de Fémur a 70ppm

## 9.4 ANÁLISIS DE DEPÓSITOS DE CALCIO Y FOSFATO

Al realizar análisis histológico de las muestras teñidas con Hematoxilina y Eosina se observó disminución del contenido medular de los huesos experimentales respecto a los controles. El análisis de nódulos de calcio y fósforo por medio de las tinciones de Alizarina roja y Von Kossa respectivamente; no mostraron cambios considerables entre el grupo control y el experimental respecto al contenido de estos minerales.

### Fémur

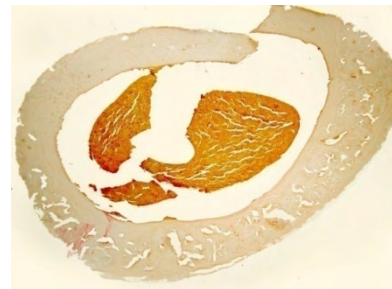
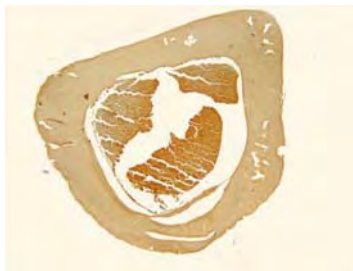
Grupo Control



Grupo Experimental 70ppm



Tinción de Alizarina Roja



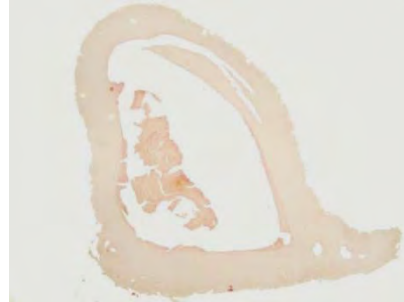
Tinción de Von Kossa

# Húmero

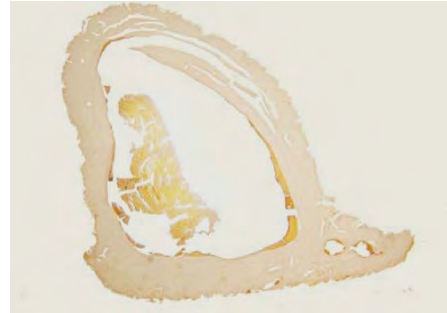
Grupo Control



Grupo Experimental 70ppm



Tinción de Alizarina Roja



Tinción de Von Kossa



## 10. DISCUSIÓN

El crecimiento es un proceso biológico complejo que consiste en el incremento progresivo de talla y peso del individuo, es decir, aumento del tamaño de los órganos y tejidos. El crecimiento longitudinal óseo da como resultado un aumento de la estatura, que acompaña la maduración del esqueleto relacionado con la edad. El crecimiento en los huesos largos se realiza principalmente en las placas epifisarias o centros de crecimiento y termina con la osificación de los mismos. Diversos factores pueden modificar este crecimiento, tales como; el medio ambiente y la genética del individuo. Los modelos animales han sido utilizados con la finalidad de aprender más acerca de las variables que afectan este proceso <sup>54</sup>.

El crecimiento y desarrollo de huesos largos en ratón fue estudiada por **Patton y Kuffman** observando que el húmero y el ulna presentaban un sólo centro de crecimiento primario, en cambio el fémur y la tibia cuentan además, con un centro de crecimiento secundario. El desarrollo y osificación de estos huesos comienza en tiempos diferentes a partir de sus centros de crecimiento. El primero en iniciar es el húmero, seguido por la tibia, el fémur y la ulna <sup>55</sup>.

En el presente estudio el fémur y la tibia mostraron un porcentaje menor de reducción de su longitud, posiblemente debido a la presencia de centros secundarios de crecimiento y al inicio del desarrollo y osificación más tardío del los mismos <sup>56</sup>. Coincidentemente la ulna y el húmero que sólo cuentan con un centro de crecimiento mostraron una mayor reducción porcentual de su longitud. Además la ulna es un hueso cuyo crecimiento toma más tiempo, comparado con los otros huesos largos.

Los cambios óseos provocados por el  $F^-$  también se observaron en el diámetro. El análisis indicó resultados contrastantes debido a que en la ulna y húmero presentaron disminuciones diametrales en todos los grupos experimentales, no así la tibia y el fémur, que presentaron un incremento en el grupo experimental de 70 ppm<sup>57</sup>. *Liu y Baylink (1977)*<sup>58</sup> en un estudio con ratas de la cepa Sprague-Dawley administraron 90ppm de NaF en agua de beber. El índice de formación de hueso en periostio aumentó un 8% más que el grupo control, además de que, en la cavidad medular, la formación de hueso se disminuyó un 43%. El incremento significativo del área, provocó un ensanchamiento de cavidad medular. En base a lo anterior podemos suponer que el diámetro óseo de nuestro estudio pudo incrementarse. El análisis por microscopía electrónica de barrido mostró un diámetro óseo mayor y una cavidad medular más amplia.

Se ha demostrado que el  $F^-$  tiende a aumentar el ancho del cristal mineral de hidroxiapatita, al convertirlo en fluorapatita. Además, puede alterar la unión electrostática entre la base inorgánica (minerales) y orgánica (colágeno) alternando las propiedades físicas y químicas de los huesos<sup>59</sup>.

Diversos estudios en animales de laboratorio que hablan sobre los efectos del fluoruro en la resistencia ósea, han encontrado que el fluoruro tiene un efecto negativo en la resistencia flexural en la mayoría de los casos.

El flúor aumenta la densidad ósea en el hueso trabecular principalmente en huesos del esqueleto axial, sin embargo, disminuye la densidad ósea en el hueso cortical del esqueleto apendicular<sup>60</sup>. En humanos de igual forma ha sido documentada esta misma propiedad y en comunidades endémicas de fluorosis dental y

esquelética con 3.8 a 4 ppm de flúor en el agua <sup>61</sup>, la reducción de la densidad ósea cortical es un importante factor de riesgo de fractura principalmente en cadera (cuello de fémur) y muñeca, huesos que están conformados en un 95% por hueso cortical <sup>102,103</sup>. Otro dato peculiar es que la reducción de la resistencia ósea esta presente antes que la fluorosis esquelética <sup>62-63</sup> situación presente en nuestro resultado al cual mostró una reducción en la resistencia flexural. Esto puede estar relacionado en gran medida a la vinculación entre su componente orgánico (colágeno) y su contenido inorgánico (mineral). Cuando éste vínculo se altera la resistencia del hueso puede variar. Se ha encontrado que el F<sup>-</sup> puede dañar esta vinculación (sin inducir fluorosis esquelética necesariamente) <sup>64, 65</sup>. Junto con la posibilidad de alterar o dañar la interfaz inorgánico-orgánica.

El daño que el fluoruro pueda hacer a la colágena tipo I puede ser resultado del efecto citotóxico sobre las células propias y anexas a hueso. Este componente juega un muy importante el mantenimiento de la resistencia a la tracción (frente a la compresión) de hueso, por lo que cualquier alteración de los huesos puede hacerlos más propensos a la fractura <sup>67</sup>.

Diversos estudios han demostrado que el flúor puede modificar la cantidad de calcio y fosfatos a nivel sérico. En base a esto, en nuestro estudio se determinó la presencia de estos minerales por medio de las tinciones de Alizarina Roja y Von Kossa que nos indican la presencia de nódulos de Calcio y Fosfato respectivamente <sup>68</sup>. Los resultados de este estudio mostraron que no existieron diferencias entre el grupo control y el experimental. En un estudio realizado por *Montherrat-Carret et al*, se mostró que la cantidad de fluoruro no afecta la concentración de calcio y fosfatos en los huesos de

fetos, al igual que con los de Whitford (1991)<sup>69</sup>, donde se mostró que el flúor en animales adultos no afecta la cantidad de calcio y fosfato. Los efectos que puede tener el flúor sobre las células óseas son amplios y diversos. A algunos autores establecen efectos estimulantes y sobrevida, sin embargo, otros muestran los efectos que puede tener al inducir estrés oxidativo,<sup>70</sup> generando la aparición de radicales libres debido a la alteración de la mitocondria a consecuente inducción de apoptosis. Así mismo, otros estudios demuestran que los fluoruros provocan disminución en la proliferación celular inhibiendo la mitosis, afección en la síntesis de proteínas, alteraciones en la colágena tipo I e incremento en la actividad osteoclástica<sup>67</sup>. Todos estos resultados previamente reportados por otros investigadores podrían explicar la reducción en el crecimiento longitudinal y diametral, así como la disminución de su resistencia flexural y cambios estructurales y varían en relación al estadio de desarrollo, tipo celular, tiempo de exposición y etapa del ciclo celular.

## 11. CONCLUSIONES

Todos los grupos experimentales mostraron diferencias debido a la administración de fluoruros (grupo control vs. experimentales) en el crecimiento longitudinal y diametral.

Nuestros resultados indican que la exposición a NaF afecta el crecimiento longitudinal y diametral y la resistencia flexural de huesos largos de ratón, dependiente de la dosis administrada. Así mismo, las extremidades anteriores (húmero y ulna) presentaron un menor crecimiento comparado con las extremidades posteriores (tibia y fémur). Los cambios mencionados anteriormente, así como las alteraciones en el grosor cortical, forma y diámetro de la cavidad medular, podrían traducirse en un mayor riesgo de fractura y estar asociados a alteraciones en el patrón de formación, depósito, resorción y bioquímica del hueso.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Víctor W. Rodwell. *Bioquímica de Harper. El Manual Moderno*. 1997.
2. N.N. Greenwood and A. Earnshaw in *Chemistry of the Elements*, 2nd edition, Butterworth, UK, 1997.
3. Whitford GM. *The Metabolism and Toxicity of Fluoride Monogr. Oral Aci.* 1996;16 Rev' 2:1-153.
4. Dunipace AJ, Kelly SA, Wu M, Stookey GK. A comparative study on a human model of the in situ absorption by enamel of fluorine obtained from the NaF and Na<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>F contained in tooth pastes. 1994 Apr-Jun; 73(2):12-4.
5. Whitford GM *The Metabolism and Toxicity of Fluoride Monogr. Oral Aci.* 1996;16 Rev' 2:1-153.
6. Boivin G Chapu MV, Baud CA, Meunier PJ, Fluoride content in human iliac bone; results in controls, patients with fluorosis and osteoporotic patients treated with fluoride, *J. Bone Miner Res.* 1988 oct:3 (5):497-502.
7. Shellis RP & Duckworth RM Studies on the cariostatic mechanism of fluoride. *Int Dent J* 1994; 44:263-73.
8. Whitford WG, Conley MI. Oxygen consumption and water metabolism in a carnivorous mouse. *Comp Biochem Physiol A.* 1971 Nov 1;40(3):797-803.
9. Weinstein and Davison, 2003 L.H. Weinstein and A. Davison, *Fluorides in the Environment: Effects on Plants and Animals*, CABI Publishing, Wallingford (2003) pp. 320
10. T. Otnyukova; Epiphytic lichen growth abnormalities and element concentrations as early indicators of forest decline *Environmental Pollution Volume 146, Issue 2, March 2007, Pages 359-365*
11. M A Lennon, H Whelton, D O'Mullane, J Ekstrand. *Rolling Revision of the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*. World Health Organization September 2004.
12. Belisle J. Organic fluorine in human serum: natural versus industrial sources. *Science.* 1981 Jun 26;212(4502):1509-10.
13. Chae GT, Yun ST, Mayer B, Kim KH, Kim SY, Kwon JS, Kim K, Koh YK. Fluorine geochemistry in bedrock groundwater of South Korea. *Sci Total Environ.* 2007 Jul 25.
14. Eom YS, Hong JH, Lee SJ, Lee EJ, Cha JS, Lee DG, Bang SA. J Emission factors of air toxics from semiconductor manufacturing in Korea. *Air Waste Manag Assoc.* 2006 Nov;56(11):1518-24.
15. Gujian L, Liugen Z, Duzgoren-Aydin NS, Lianfen G, Junhua L, Zicheng P. Health effects of arsenic, fluorine, and selenium from indoor burning of Chinese coal. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2007; 189:89-106.
16. *The Story of Fluoridation*. National institute of Dental and Craniofacial Research) <http://www.nidcr.nih.gov/HealthInformation/DiseasesAndConditions/Fluoride/Story/Fluoride.htm>)
17. *Fluorides and oral health; WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use*, WHO Technical Report Series, 846, 1994.
18. Browne D Whelton H, O'mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent.* 2005 mar; 33(3) 177-86 Epub 2004 dec 9.

19. A van Nieuw Ameronpn , E C I Veerman , H S Brand , A Vissink Ned Tijdschr Tandheelkd. Saliva: more than just a factor in oral health; 2006 May ;113 (5):176-81
20. Wespi, HJ. Gedanken zur Frage der Optimalen Ermahruhg in der Schwangerschaft Saltz und brot als Trager Zusatzlicher Nahrungsstoffe. Schweiz Med Wschr 1948; 78: 153-155.
21. Wespi, HJ. Fluoriertes Kochsalz zur Caries Prophylaxes. Schweiz Med Wschr. 1950; 80: 561-564.
22. Wespi, HJ. Fluor- Jodsolz zur Krofp-und Caries bekampfung. Schweiz Med Wschr. 1954; 84: 885-890.
23. Marthaler, TM. Schenardi, C. Inhibition of Caries in Children alter 5 1/2 years Use of Fluoridated Table Salt. Helv Odontol Acta, 1962; 6: 1-6.
24. Toth, K. A Study of 8 Years Domestic Salt Fluoridation for Prevention of Caries. Community Dental Oral Epidemiol 1976; 4(3): 106-110.
25. Toth K. Some Economic Aspects of Domestic Salt Fluoridation. Quintessence Intern 1980; 3: 81-83. )( Marthaler, TM. Parctical Aspects of Salt Fluoridation. Helv Odont Acta 1983; 27: 1197-1214.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993.
27. Fluorides and oral health; WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use, WHO Technical Report Series, 846, 1994.
28. Dtsch Zahnarztl Z. Clinical studies on a sodium monofluorophosphate toothpaste in school children. 1975 Aug;30(8):513-7.
29. Dunipace AJ, Kelly SA, Wu M, Stookey GK. A comparative study on a human model of the in situ absorption by enamel of fluorine obtained from the NaF and Na<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>F contained in tooth pastes. 1994 Apr-Jun; 73(2):12-4.
30. Wu M, Stookey GK. A comparative study on a human model of the in situ absorption by enamel of fluorine obtained from the NaF and Na<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>F contained in tooth pastes. 1994 Apr-Jun;73(2):12-4.
31. L.C. Chow, S. Takagi, S. Frukhtbeyn, B.A. Sieck, E.E. Parry, N.S. Liao, G.E. Schumacher, M. Markovic Remineralization Effect of a Low-Concentration Fluoride Rinse in an Intraoral Model; Caries Research 2002;36:136-141 Vol. 36, No. 2.
32. B.A. Sieck, E.E. Parry, N.S. Liao, G.E. Schumacher, M. Markovic Remineralization Effect of a Low-Concentration Fluoride Rinse in an Intraoral Model; Caries Research 2002;36:136-141 Vol. 36, No. 2.
33. Maria Borysewicz-Lewicka, Justyna Opydo-Szymaczek and Jadwiga Opydo Fluoride Ingestion After Brushing with a Gel Containing a High Concentration of Fluoride Biological, 3 January 2007. Trace Element Research Humana Press Inc, 0163-4984
34. Hallanger Johnson JE, Kearns AE, Doran PM, Khoo TK, Wermers RA. Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. Mayo Clin Proc. 2007 Jun; 82(6):719-24. Erratum in: Mayo Clin Proc. 2007 Aug; 82(8):1017.
35. Loyola-Rodríguez, J.P., De Jesús Pozos-Guillén, A., Hernández-Guerrero, J.C., Hernández-Sierra, J.F. . Dental fluorosis in primary dentition in an endemic hydrofluorosis area [Fluorosis en denticion temporal en un area con hidrofluorosis endemica] 2000, Salud Publica de Mexico 42 (3), pp. 194-200.
36. Loyola-Rodríguez JP, Pozos-Guillén A, Hernández-Guerrero JC. Bebidas embotelladas como fuentes adicionales de exposición a flúor. Salud Pública Mex 1998; 40:438-441.

37. Loyola-Rodríguez JP, Pozos-Guillén A, López-Moctezuma S, San Martín-López A. Fluoruros ocultos como factor de riesgo a fluorosis dental en San Luis Potosí, México. *Rev ADM* 1998; 6:272-276.
38. Ming Zhang, Aiguo Wang, Weihong He, Ping He, Bayi Xu, Tao Xia, Xuemin Chen, Kedi Yang; Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons; *Toxicology* 236(2007)208-216.
39. Aydin G, Cicek E, Akdogan M, Gokalp O.; Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations; *J Appl Toxicol*; 2003;23(6);437-46.
40. Susheela AK, editor. *Treatise on fluorosis*. 2nd ed. Dehli, India: Fluorosis Research & Rural Development Foundation; 2003.
41. Xiang Q, Liang Y, Chen L, Wang C, Chen B, Chen X, et al. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride* 2003; 36(2): 84-94.
42. Susheela AK, Das TK. Chronic fluoride toxicity: a scanning microscope study of duodenal mucosa. *Clin Toxicol* 1988; 26:467-476. Waldbot TJ. Incipient chronic fluoride intoxication from drinking water: report of 52 cases. *Acta Med Scand* 1956; 156:157-168.
43. Waldbot TJ. Incipient chronic fluoride intoxication from drinking water: report of 52 cases. *Acta Med Scand* 1956; 156:157-168.
44. Fordyce FM, Vrana K, Zhovinsky E, Povoroznuk V, Toth G, Hope BC, Iljinsky U, Baker J. A health risk assessment for fluoride in Central Europe. *Environ Geochem Health*. 2007 Apr;29(2):83-102
45. Smith MC, Lantz EM, Smith HV. The Cause of Mottled Enamel. *Science*. 1931 Sep 4; 74(1914):244.
46. Mascarenhas AK, Mashabi S. High fluoride concentration in drinking water may increase the prevalence and severity of dental fluorosis, and decrease occurrence of caries. *J Evid Based Dent Pract*. 2008 Mar;8(1):15-6.
47. Mann J, Tibi M, Sgan-Cohen HD. Fluorosis and caries prevalence in a community drinking above-optimal fluoridated water. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987 Oct; 15(5):293-5. Szpunar SM, Burt BA. Dental caries, fluorosis, and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. *J Dent Res*. 1988 May; 67(5):802-6.
48. Bruns J, Rosenbach B. Osteochondrosis dissecans tali and sports. *Sportverletz Sportschaden*. 1988 Dec; 2(4):153-7.
49. Vyeltishchyevev, Y. (1995). Ecopathology in childhood. *Paediatrics*, 4, 26–33.
50. Krishnamachari, K. (1986). Skeletal fluorosis in humans—a review of recent progress in the understanding of the disease. *Progress in Food and Nutrition Science*, 10(3–4), 279–314.
51. Geneva: World Health Organisation. Guidelines for drinking water quality. WHO. (1996b).
52. Geneva: World Health Organisation. Trace elements in human nutrition and health. (1996a).
53. Warren J, Michel J, Kanellis J, Levy S. Fluorosis of the primary dentition: What does it mean for permanent teeth? *J Am Dent Assoc* 1999; 130:347-356.
54. Grimaldo M, Borja-Aburto V, Ramírez A, Ponce M, Rosas M, Díaz-Barriga F. Endemic fluorosis in San Luis Potosi, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environ Res* 1995; 68:25-30.



55. J T Patton and M H Kaufman; The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *J Anat.* 1995 February; 186(Pt 1): 175–185.
56. Rich, C. and Ensink, F. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature* 191:184 –185; 1961.
57. Liu CC, Baylink DJ. Stimulation of bone formation and bone resorption by fluoride in thyroparathyroidectomized rats. *J Dent Res.* 1977 Mar;56(3):304-11
58. Turner CH, Garetto LP, Dunipace AJ, Zhang W, Wilson ME, Grynpas MD, Chachra D, McClintock R, Peacock M, Stookey GK. Fluoride treatment increased serum IGF-1, bone turnover, and bone mass, but not bone strength, in rabbits. *Calcif Tissue Int.* 1997 Jul; 61(1):77-83. Erratum in: *Calcif Tissue Int* 1997 Oct; 61(4):349.
59. Phipps KR, Burt BA. Water-borne fluoride and cortical bone mass: a comparison of two communities. *J Dent Res.* 1990 Jun; 69(6):1256-60.
60. Sowers M, Zobel D, Weissfeld L, Hawthorne VM, Carman W. Progression of osteoarthritis of the hand and metacarpal bone loss. A twenty-year followup of incident cases. *Arthritis Rheum.* 1991 Jan; 34(1):36-42.
61. Danielson C, et al. (1992). Hip fractures and fluoridation in Utah's elderly population. *Journal of the American Medical Association* 268: 746-748.
62. Cooper C, et al. (1991). Water fluoridation and hip fracture. *Journal of the American Medical Association* 266: 513-514.
63. Li Y, et al. Effect of long-term exposure to fluoride in drinking water on risks of bone fractures. *Journal of Bone and Mineral Research.* (2001).
64. Alarcon-Herrera MT, et al. (2001). Well Water Fluoride, Dental fluorosis, Bone Fractures in the Guadiana Valley of Mexico. *Fluoride* 34(2): 139-149.
65. Fratzl P, et al. (1996). Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs: a small-angle x-ray scattering and backscattered electron imaging study *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 248-253.
66. Turner CH, et al. (1993). A mathematical model for fluoride uptake by the skeleton. *Calcified Tissue International* 52: 130-138.
67. Miao Q, Xu M, Liu B, You B.; In vivo and in vitro study on the effect of excessive fluoride on type I collagen of rats] *Wei Sheng Yan Jiu.* 2002 Jun;31(3):145-7.
68. Montherrat-Carret L, Perrat-Mabilon B, Barbey E, Bouloc R, Boivin G, Michelet A, Magloire H.; Chemical and X-ray analysis of fluoride, phosphorus, and calcium in human foetal blood and hard tissues. *Arch Oral Biol.* 1996 Dec;41(12):1169-78.
69. Whitford GM. Fluoride, calcium and phosphorus metabolism in the rat: comparison of 'natural ingredient' with semipurified diets. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(4):291-7.
70. Ming Zhang, Aiguo Wang, Weihong He, Ping He, Bayi Xu, Tao Xia, Xuemin Chen, Kedi Yang; Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons; *Toxicology* 236(2007)208-216.