

Efectos bioquímicos en la ingestión prolongada de fluor en la rata.

MARIA LUZ PITA MARTIN DE PORTELA

Y

JUAN CLAUDIO SANAHUJA

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

RESUMEN

En este trabajo se estudia en la rata, el efecto del fluor contenido en la dieta en concentraciones de 5 p.p.m. (lote control, A), 25 y 100 p.p.m. lotes experimentales B y C) durante un período que se extendió por 7 meses a partir del momento del destete.

Sobre estos animales se determinó:

- 1) El consumo alimenticio y la curva de crecimiento durante toda la experiencia.
- 2) La absorción y retención del fluor ingerido así como la del calcio y magnesio de la dieta, por periodos de 5 días.
- 3) La actividad al finalizar la experiencia, de los siguientes sistemas enzimáticos: a) colinesterasa (en plasma y cerebro), b) fosfatasa (en plasma e hígado), c) enolasa (en cerebro e hígado).
- 4) Al término de la experiencia, el contenido de calcio, magnesio y fluor en hueso, y de fluor en los dientes de los animales.

Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias ni en el aumento de peso ni en el consumo alimenticio, entre los 3 lotes estudiados.

Los estudios referentes a absorción y retención de fluor, calcio y magnesio revelan que la eliminación de fluor por las heces guarda correlación con la cantidad provista en la dieta, correlación que no se observa en la eliminación urinaria.

La absorción del calcio disminuye proporcionalmente con el contenido de fluor en la dieta, en cambio la absorción del magnesio, solo aparece disminuída en el grupo C, lo cual puede explicarse en función de las distintas solubilidades de los fluoruros correspondientes.

En huesos y dientes el contenido en fluor guarda correlación con su contenido en la dieta, correlación que es más estricta en los dientes que en los huesos. El contenido en calcio en los dientes no se halla alterado

en las 3 dietas; en cambio el magnesio óseo aumenta proporcionalmente con el contenido en fluor en la dieta, manteniendo una relación constante con el contenido de fluor en el hueso.

En plasma los niveles de fluor son similares en los tres grupos: la colinesterasa se halla disminuída significativamente en los lotes B y C y la fosfatasa alcalina solo aparece lígeramente aumentada en el lote C.

En cerebro no se observan diferencias significativas ni en su composición ni el contenido en colinesterasa y enolasa entre los 3 grupos.

En hígado, la fosfatasa ácida se halla algo disminuída en los lotes B y C, no observándose en cambio modificaciones en la fosfatasa alcalina. La enolasa hepática aparece aumentada significativamente en el grupo C, con respecto al lote control A.

INTRODUCCION

La acción "in vitro" del fluor sobre diversos sistemas enzimáticos ha sido estudiada por diversos investigadores Heilbron (1) estudió su acción sobre la colinesterasa; Nelson publicó en 1966 (2) sus observaciones en relación con la actividad de las fosfatasas; White (3) hizo referencia posteriormente al efecto del fluor sobre algunas enzimas de la glicolisis y en especial sobre la enolasa.

En cambio es escasa, y en algunos casos no se encuentra en la literatura, la información relacionada con el efecto "in vivo" de este elemento sobre esos sistemas enzimáticos.

Con objeto de contribuir a clarificar ese aspecto, así como el de otros efectos fisiológicos producidos por el fluor ingerido en la dieta, que adquieren importancia en especial frente a las diversas opiniones existentes con referencia a la fluoración de las aguas, hemos realizado las investigaciones que se describen en este trabajo.

Para ello hemos estudiado, en la rata el efecto del fluor contenido en la dieta en concentraciones de 5, 25 y 100 p.p.m. durante un período prolongado de tiempo que se extendió por 7 meses a partir del momento del destete.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar. En el momento del destete se seleccionaron los animales que tenían un peso medio de 38-39 gramos los que fueron agrupados en 3 lotes de 6 animales cada uno, con igual cantidad de machos y hembras en cada lote, que se mantuvieron en jaulas individuales y a los cuales se les ofreció las dietas que luego se detallan y agua destilada "ad libitum".

Durante el período experimental que se prolongó durante 7 meses se controló el peso de los animales y el consumo alimenticio, al menos 1 vez por semana.

Al cabo de los 7 meses y previo un período de ayuno de 12 horas, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por punción cardíaca. De la sangre heparinizada se separó luego el plasma por centrifugación. Inmediatamente fueron extraídos los cerebros, los hígados, los fémures y los dientes incisivos de los animales, que se mantuvieron a -20°C hasta la realización de las determinaciones que luego se indican.

Dietas

Durante toda la experiencia cada lote de animales recibió una dieta diferente.

Estas 3 dietas, A, B y C que contenían 20% de Caseína diferían solamente en su contenido en fluor (Tabla 1). La dieta A (basal) contenía 5 p.p.m. de fluor; la dieta B, 25 p.p.m. de fluor y la dieta C 100 p.p.m. de fluor. En las dietas B y C el fluor se incorporó como fluoruro de sodio. Los lotes se denominaron A, B y C según la dieta que ingirió cada uno de ellos.

Pruebas de absorción y retención del fluor

Se realizaron sobre 2 animales de cada grupo a los 3 meses de edad que se mantuvieron en jaulas metabólicas durante 5 días. Previamente se los acostumbró, durante un período que duró 3 semanas, a ingerir la totalidad del alimento en un lapso de 3 horas por día. La orina se recogió durante las 24 horas a efectos de conocer el volumen total pero descartando para el análisis por hallarse contaminada con la dieta la recogida en el tiempo que los animales ingerían ésta.

Las heces fueron marcadas con carmín, secadas, pesadas y molidas en un mortero. La determinación de fluor, calcio y magnesio en la orina y heces se realizaron diariamente sobre alícuotas del "pool" de los 2 animales, con esas cifras, referidas a la ingesta, se estableció el porcentaje de absorción y retención por todo el período de 5 días.

Determinaciones realizadas y métodos

Plasma: Sobre los plasmas individuales recogidos en la forma anteriormente indicada se determinó la actividad de la colinesterasas por el método de Augustinsson (5) y de la fosfatasa alcalina por el método de Kind y King (6) (7).

Organos:

—*Cerebro:* En cada uno de los cerebros se determinó la actividad de la colinesterasa por el método de Augustinsson (5) y de la enolasa por el método de Kun (8).

—*Hígado:* Se estableció el contenido de proteínas totales en cada hígado por el método de Marenzi y col. (9). Se determinó la fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida por el método de Kind y King (6) (7) utilizando un homogenato de sucrosa 0.25M (10). La actividad de la enolasa se determinó por el método de Kun (8).

Hueso: Los dos fémures de cada animal fueron secados por 24 horas a 100°C y luego privados del tejido muscular y médula, determinándose en ellos: magnesio por el método de Peres y Zwingelstein (11) y calcio por mineralización con una mezcla de $\text{NO}_3\text{H}/\text{ClO}_4\text{H}$ (1:1) y posterior lectura de la emisión en un espectrofotómetro de llama Beckman DU (con llama de oxígeno y acetileno) a 554 milimicrones.

Fluor: Se determinó su contenido en el plasma, en los dos fémures y en los cuatro dientes incisivos de cada animal por el micrométodo de difusión de Wharton (12) o el semimicrométodo de Büttner y Söyka (13) de acuerdo al contenido de fluor en las muestras, previa incineración a no más de 600°C en los 2 últimos casos.

El contenido de calcio, magnesio y fluor de las dietas y en la orina y heces se determinó por los mismos métodos indicados para su determinación en huesos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Acción sobre el crecimiento:

Los aumentos de peso de los animales de los lotes B y C no mostraron diferencias significativas con respecto al lote control A. El promedio de estos aumentos durante la totalidad del período experimental fue de: 213,0 g, 213,0 y 222,9 g para los lotes A, B y C respectivamente.

Las diferencias en el consumo alimenticio no fueron estadísticamente significativas entre los 3 lotes estudiados.

Estas observaciones concuerdan con las de Simón y Suttie (14) quienes no encuentran modificaciones en el consumo alimenticio y como consecuencia, retardo del crecimiento con cantidades de fluor en la dieta inferiores a 200 p.p.m. Sin embargo

TABLE N° 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS

	g por 100 g de dieta		
Caseína ¹	20.00	20.00	20.000
Vitaminas ²	0.25	0.250	0.250
Cloruro de colina	0.15	0.150	0.150
Aceite de maíz	5.00	5.000	5.000
Minerales ²	5.00	5.000	5.000
Dextrina de maíz	69.60	69.594	69.576
Fluoruro de sodio	—	0.006	0.024
Fluor total (p. p. m.)	5.00	25.000	100.000

1. Con un contenido de proteínas de 80.0% (N. × 6.25).

2. Harper A. H. (4).

en experiencias de 24 horas utilizando animales en depleción proteica y 50 p.p.m. de fluor hemos observado alteraciones en el consumo alimenticio, conjuntamente con modificaciones en los niveles de amino ácidos plasmáticos (15). Eso permitiría suponer la existencia de una rápida alteración del apetito en los animales por la ingestión de fluor con una adaptación posterior cuando la concentración de éste en la dieta es menos de las 200 p.p.m., adaptación que no se produciría con las concentraciones más elevadas.

Determinaciones en plasma

Los niveles promedio de fluor son similares en los 3 grupos lo que confirma lo señalado por Simon y Suttie (16) que demostraron que el nivel plasmático de fluor se normaliza luego de un ayuno de 8 horas. La actividad de colinesterasa plasmática se encuentra en cambio significativamente disminuída en los 2 lotes experimentales B y C con respecto al lote control A. Esta menor actividad de la colinesterasa, podría explicar la excitabilidad anormalmente elevada que se observó durante toda experiencia en los animales de los lotes B y C.

La concentración de fluor necesaria para lograr una inhibición de la colinesterasa "in vitro", de acuerdo a Cimasoni (17)

TABLA N° 2

CONTENIDO DE FLUOR Y ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA Y FOSFATASA ALCALINA EN EL PLASMA EN LAS RATAS LUEGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL¹

Lote	Fluor	Colinesterasa	Fosfatasa alcalina
	p. p. m.	μ M/ml/h	U. K. ²
A	1.2 \pm 0.28	155.0 \pm 20.8	5.8 \pm 0.86
B	1.1 \pm 0.29	47.0 \pm 12.7 ³	6.3 \pm 1.25
C	1.2 \pm 0.19	46.0 \pm 12.0 ³	8.8 \pm 2.10

1. Los animales tuvieron un período de ayuno de 12 horas previo al sacrificio.
2. Unidades King por 100 ml.
3. Diferencia con el lote control A altamente significativa ($p < 0.001$).

es del orden de 0.15 mM, es decir 2,85 p.p.m. Este nivel es muy superior al encontrado por nosotros en el plasma en esta experiencia, y parece ser muy difícil de alcanzar aún administrando dosis considerables de fluor; Simón y Suttie (16) trabajaron con ovejas no encontrando concentraciones de fluor superiores a 2,6 p.p.m. aún con ingestiones de 2 mg. de fluor por kilo de peso.

La posibilidad existe de que esta disminución de la actividad de la colinesterasa plasmática paralela a bajas concentraciones de fluor en plasma sea quizá secundaria a otra acción metabólica y no consecuencia de un efecto directo sobre la enzima.

Con respecto a la fosfatasa alcalina plasmática se observa un aumento de actividad fundamentalmente en el lote C pero sin que la diferencia alcance a ser estadísticamente significativa.

Esta observación no concuerda con los resultados obtenidos "in vitro" en los que el fluor aparece como inhibidor de las fosfatasas (18). Sin embargo las concentraciones de fluor usadas para las experiencias "in vitro" son mucho más elevadas que las que se encuentran en plasma, aún durante el pico post-absortivo (16).

Este aumento de actividad de la fosfatasa alcalina sería el

responsable de que —como se verá luego— se mantenga una concentración normal de calcio en el hueso, en las dietas que contienen concentraciones elevadas de fluor, pese a estar disminuída en ellos la absorción de éste en el intestino.

La falta de correlación entre el nivel de fluor ingerido y fluor total plasmático, y entre éste y las modificaciones observadas en la actividad de las enzimas, confirma lo señalado recientemente por Taves (19), quien diferencia entre niveles de fluor plasmático total y de fluor plasmático ionizado.

Solo el fluor ionizado, que Taves determina por método fluorométrico sin incineración previa y que se halla en una proporción inferior a la del fluor total, guardaría correlación con el fluor ingerido.

TABLA N° 3
PESO DEL CEREBRO Y ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA Y ENOLASA CEREBRAL EN LAS RATAS LUEGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL¹

Lote	Peso del cerebro g	Colinesterasa cerebral $\mu\text{M/g/h}$	Enolasa cerebral $\gamma/\text{fosfopirúvico/mg/h}$
A	1.815 \pm 0.064	259 \pm 23	16.3 \pm 1.5
B	1.946 \pm 0.056	245 \pm 32	15.8 \pm 3.3
C	1.916 \pm 0.068	250 \pm 40	15.7 \pm 1.9

1. Los animales tuvieron un período de ayuno de 12 horas previo al sacrificio.

Determinaciones en cerebro

Rapaport (20) señaló la existencia de una relación directa entre incidencia de mongolismo y fluoración de las aguas. Buttner y Bixler por su parte han encontrado en cerebro concentraciones de fluor más elevadas que en otros tejidos blandos (21).

Sobre esta base tratamos de estudiar algunos aspectos del metabolismo cerebral a través de la actividad de 2 enzimas —colinesterasa y enolasa— que “in vitro” han demostrado ser inhibidas por el fluor. Nuestros resultados señalan que no hay diferencias significativas ni en el peso total del cerebro

ni en la actividad de estas enzimas entre los tres grupos de animales utilizados.

De cualquier manera debe puntualizarse que en estas experiencias la ingestión de las dietas con fluor comenzó a partir del destete; en ese momento el cerebro de la rata ya ha alcanzado su máxima maduración (22) por lo cual resulta, desde ese instante menos vulnerable a la acción de agentes que eventualmente podrían producir modificaciones permanentes si actuaran durante el período fetal o aún durante el desarrollo de dicho proceso de maduración.

TABLA N° 4

PESO, CONTENIDO EN PROTEINAS Y CONCENTRACION DE FLUOR, DEL HIGADO DE LAS RATAS LUEGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL¹

Lote	Peso del hígado	Proteínas hepáticas	Proteínas hepáticas totales	Fluor
	g	%	g	p.p.m.
A	6.574 ± 0.858	20.9 ± 0.93	1.374	3.6 ± 0.5
B	6.692 ± 0.692	23.3 ± 0.80	1.559	3.9 ± 1.0
C	6.346 ± 0.815	20.3 ± 0.96	1.288	4.7 ± 1.3

1. Los animales tuvieron un período de ayuno de 12 horas previo al sacrificio.

Determinaciones en hígado

En hígado si bien se encuentra un pequeño aumento del porcentaje de proteínas así como de la cantidad de proteínas totales en el lote B, con respecto a los otros 2 lotes, las diferencias no alcanzan a ser significativas.

La actividad de la fosfatasa ácida se encuentra ligeramente disminuída en los lotes B y C con respecto al control A, acentuándose las diferencias entre los lotes A y B al expresar los resultados como actividad específica de la enzima pero sin que dichas diferencias lleguen tampoco a ser estadísticamente significativas. No se observan en cambio modificaciones con respecto a la actividad de la fosfatasa alcalina.

Está claramente demostrado que "in vitro" el fluor inhibe

TABLA Nº 5

ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA Y ACIDA Y DE LA ENOLASA HEPATICA EN LAS RATAS, LUEGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL¹

Lote	Fosfatasa alcalina		Fosfatasa ácida		Enolasa	
	mg fenol /g/h.	mg fenol/g/h.	mg fenol/g/prot/h	γ fosfopirúvico/mg/h.	γ /fosfopirúvico/g.prot./h.	
A	0.72 \pm 0.08	38.9 \pm 4.6	181.1 \pm 19.0	10.4 \pm 1.31	49.7 \pm 6.4	
B	0.73 \pm 0.15	36.9 \pm 5.0	158.3 \pm 7.1	11.9 \pm 1.70	51.0 \pm 6.8	
C	0.74 \pm 0.07	35.2 \pm 1.5	173.3 \pm 18.7	14.30 \pm 2.90	78.9 \pm 13.7 ²	

1. Los animales tuvieron un período de ayuno de 12 horas previo al sacrificio.

2. Diferencia probablemente significativa con el lote control A ($P < 0.05 > 0.01$).

la enolasa debido a la formación de un complejo Magnesio-Fluor-Fosfato que impide la activación de este sistema por el Magnesio.

Nosotros encontramos que la actividad de la enolasa hepática no se halla modificada en el lote B con respecto al control A, pero en el grupo C por el contrario se encuentra un aumento de la actividad, diferencia que es probablemente significativa si se expresa como actividad específica de la enzima (Tabla 5).

Este efecto sobre la actividad de la enolasa, encontrado en esta experiencia podría englobarse entre los llamados efectos paradójicos del fluor (23) que han sido señalados en la literatura, en un intento de explicar algunos efectos cuyas características difieren según se estudien "in vitro" ó "in vivo" o que se manifiestan como antagónicos a distintas concentraciones de fluor.

En general puede afirmarse que el mecanismo de acción del fluor sobre el metabolismo de la glucosa "in vivo" no se halla aún aclarado, debido principalmente a que las concentraciones en que éste se halla en los tejidos son muy inferiores a las que "in vitro" ejercen efectos inhibitorios sobre los sistemas enzimáticos involucrados en dicho proceso.

Zebrowski y Suttie (24) en estudios "in vivo" en ratas alimentadas con dietas que contenían glucosa marcada y 450 p.p.m. de fluor, encontraron una mayor actividad específica del CO₂ espirado la que atribuyen más a una ventilación pulmonar disminuída que a una utilización aumentada de la glucosa. Los mismos autores no encontraron ninguna relación entre la ingestión de fluor y el contenido de glucógeno hepático. Sin embargo frente a la observación de que la radioactividad se incorporaba a mayor velocidad en los animales control, sugieren que en éstos el glucógeno hepático está en un estado de mayor "fluidez" que en los alimentados con la dieta fluorada.

Absorción y retención del fluor, calcio y magnesio

La eliminación del fluor por las heces, expresada porcentualmente en relación a la cantidad ingerida en la dieta, aumenta en forma lineal con el aumento de ésta. (Tabla 6). Consecuentemente el fluor absorbido disminuye en relación inversa al porcentaje de fluor en la dieta.

La eliminación del fluor por orina, en cambio no mantie-

TABLA N° 6
ELIMINACION Y RETENCION DE FLUOR DURANTE UN PERIODO
DE 5 DIAS

Lote	Fluor eliminado		Fluor retenido	
	en heces	en orina	% ¹	ug /día/rata
	% ¹	% ¹		
A	25.0	19.5	55.5	26
B	30.0	29.0	41.0	108
C	48.5	27.5	24.0	190

1. Porcentaje con respecto al ingerido.

TABLA N° 7
ABSORCION DE CALCIO, MAGNESIO Y FLUOR DURANTE UN
PERIODO DE 5 DIAS

Lote	Calcio	Magnesio	Fluor
	% ¹	% ¹	% ¹
A	64.0	40.0	75.0
B	56.0	40.0	70.0
C	42.0	9.0	51.5

1. Porcentaje con respecto al ingerido.

ne la correlación que se observa en el fluor fecal: si bien el lote B, elimina una mayor cantidad porcentual que el A, no existen diferencias apreciables en la eliminación urinaria entre los lotes B y C.

Como consecuencia, el porcentaje de fluor retenido, es decir, fluor ingerido menos el eliminado por heces y orina, expresado en función del porcentaje de fluor en la dieta tiende a nivelarse a medida que aumenta éste último. Esa misma tendencia se observa en las cifras que expresan los valores absolutos de fluor retenido en el organismo (Tabla 6).

Estos resultados confirman lo que sugiriera Stookey (25),

en el sentido de que la absorción intestinal actuaría como mecanismo regulatorio de la concentración de fluor en el organismo, y que sería el nivel de fluor almacenado en el esqueleto, el que ejercería el control de dicho mecanismo.

Las curvas de eliminación fecal de calcio revelan que su absorción disminuye proporcionalmente al contenido de fluor en la dieta; en cambio la absorción del magnesio no acusa diferencias porcentuales entre los lotes A y B pero disminuye marcadamente en el grupo C. (Tabla 7).

La menor absorción del calcio podría explicarse en función de la solubilidad del fluoruro de calcio que puede formarse en el tracto digestivo: la solubilidad de este compuesto es muy baja (16 p.p.m.) y cuantitativamente su formación guarda relación con el contenido de fluor en el medio. La mayor concentración de fluor en las dietas B y C provocaría consecuentemente una mayor precipitación de F_2Ca con lo cual ambos minerales se hacen menos aprovechables para el organismo.

La menor utilización digestiva del magnesio puede explicarse sobre la misma base: pero aquí la mayor solubilidad del F_2Mg que es de 76 p.p.m. explicaría a la vez, el porqué recién la menor absorción aparece con una mayor concentración de fluor en la dieta, cuando se compara con el calcio.

Determinaciones en hueso y dientes

El estudio de la composición de los huesos y dientes revela que:

- 1º) El contenido de fluor de ambos tejidos duros aumenta en función del porcentaje de fluor de la dieta siendo este aumento lineal para los dientes hasta 100 p.p.m. de fluor de la dieta y en el fémur lineal solo a una concentración aproximada de 60 p.p.m. en la dieta. El contenido porcentual de fluor es siempre mayor en el hueso que en los dientes (Fig. 1). para un mismo porcentaje de fluor en la dieta.
- 2º) El contenido en calcio en los huesos no está alterado en forma apreciable pese a que la disminución observada en el lote B es estadísticamente significativa.
- 3º) El magnesio en el hueso aumenta proporcionalmente con el aumento de fluor en la dieta manteniendo una relación constante con el contenido de fluor en el hueso (Fig. 2 y 3).

TABLA N° 8
CONTENIDO EN FLUOR DE LOS DIENTES Y DE FLUOR, CALCIO Y MAGNESIO DE LOS HÚESOS DE LAS
RATAS LUEGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL¹

Lote	Diente ²		Hueso ³	
	Fluor	Fluor	Calcio	Magnesio
	p. p. m.	p. p. m.	%	%
A	65.8 ± 1.3	158 ± 3.3	13.6 ± 0.18	0.352 ± 0.015
B	539.0 ± 11.9 ⁴	1174 ± 53 ⁴	12.7 ± 0.17 ⁵	0.397 ± 0.009 ⁶
C	1776.0 ± 80.0 ⁴	1760 ± 62 ⁴	13.1 ± 0.30	0.503 ± 0.002 ⁴

1. Los animales tuvieron un período de ayuno de 12 horas previo al sacrificio.
2. Incisivos.
3. Fémures.
4. Diferencia altamente significativa con respecto al lote control A. ($P < 0.001$).
5. Diferencia altamente significativa con respecto al lote control A. ($P < 0.01$).
6. Diferencia probablemente significativa con respecto al lote control A. ($P < 0.05 > 0.01$).

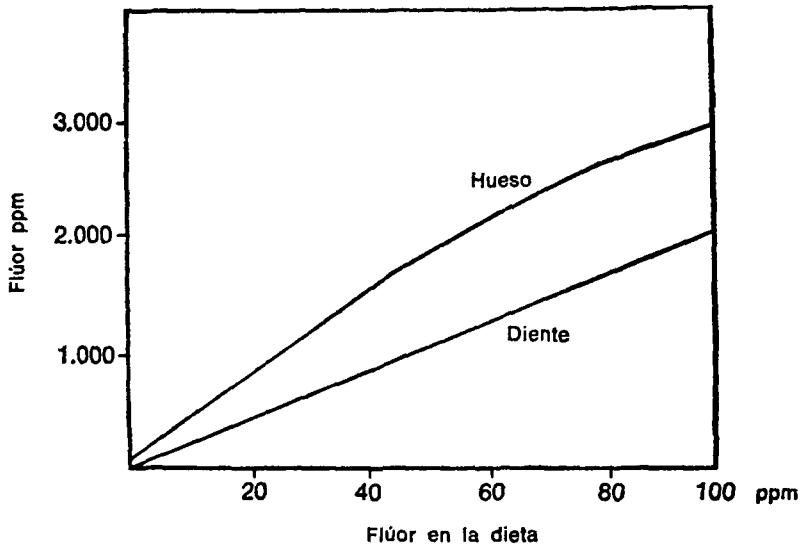


Figura 1

Contenido de fluor en hueso (fémur) y dientes (incisivos) en función del contenido en fluor de la dieta.

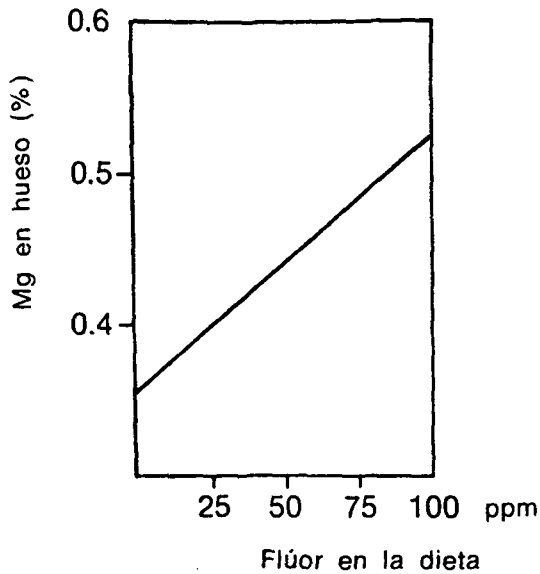


Figura 2

Contenido en magnesio en hueso, en función del fluor de la dieta.

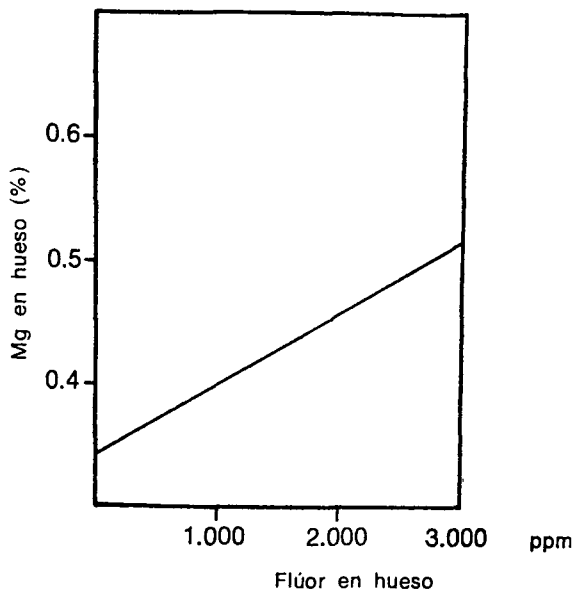


Figura 3

Contenido en magnesio en hueso en función del fluor del hueso.

Es sabido que los cristales de hidroxapatita incorporan iones fluor por un mecanismo de intercambio iónico aumentando su estabilidad y su tamaño a medida que aumenta su contenido de fluor (26). Debido a este mecanismo el hueso se convierte en un reservorio de fluor difícilmente movilizable en condiciones normales y que según algunos autores sería el mecanismo que el organismo utilizaría para evitar la toxicidad de cantidades elevada de fluor (27).

Este aumento de la estabilidad ósea ha sido la base del tratamiento a base de fluor de los pacientes que sufren osteoporosis (28).

Rich y Ensink (28) encuentran que pese a que la absorción de calcio está disminuída por acción del fluor el balance de calcio mejora en los pacientes con osteoporosis, debido a una menor eliminación urinaria.

En la presente experiencia puede observarse que pese a estar disminuída la absorción del calcio en las dietas B y C, su concentración en el hueso se mantiene dentro de un rango apenas variable sobre todo en los lotes A y C pudiéndose ello atribuir en este último a la actividad aumentada de la fosfata-

sa alcalina plasmática (Tabla 2), como se señaló al comienzo.

Con respecto al magnesio son distintos los autores que concuerdan en que la ingestión de fluor produce un aumento de su contenido en hueso. Recientemente Griffith (29) sugiere que se forma un complejo entre el fluor, el magnesio y el fosfato.

Singer y Armstrong (30) encuentran que el contenido de magnesio disminuye con la edad como consecuencia de una aparente dilución a medida que progresa la maduración del hueso y suponen que el fluor limitaría esta dilución.

En las figuras 2 y 3 se ha representado el porcentaje de magnesio óseo en función del contenido en fluor tanto de la dieta como del hueso. Ambas relaciones son lineales, resultados que estarían de acuerdo con la teoría de Griffith de formación de un complejo fluor-magnesio-fosfato cuya existencia por otra parte ha sido demostrada "in vitro" por Warburg y Christian (31).

SUMMARY

Biochemical effects of prolonged fluoride ingestion in the rat.

This work was undertaken to determine the effect of fluoride containing diets, at levels, at 5 p.p.m. (control group A), 25 p.p.m. (group B) and 100 p.p.m. (group C) in rats after a period of 7 months beginning at weaning.

The results obtained showed changes in some plasma and liver enzymes. In plasma, cholinesterase activity was significantly increased only in group C.

In liver, acid phosphatase was slightly decreased in diets B and C, being hepatic enolase significantly increased in group C.

Brain enzymes did not show changes between the 3 groups after feeding the experimental diets.

Bone and teeth analysis showed that their fluoride content correlate well with concentration of fluoride in diet. The percentage of magnesium in bone showed the same correlation. On the contrary, calcium contents in teeth do not show differences between the 3 groups.

Calcium and magnesium absorption were both affected by the fluoride concentration in the diet, presumably owing to the formation of the corresponding fluorides, that have a low solubility.

No differences between the 3 groups were observed neither in food intake or in weight gain after the 7 months period.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Heilbron, E. Action of fluoride on cholinesterase. I. On the mechanism of inhibition. *Acta Chem. Scand.*, 19: 1333-1346. 1965.
- (2) Nelson, B. D. Rat liver acid phosphatase: differences in lysosomal and cytoplasmic forms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 998-1001. 1966.
- (3) White, A., P. Handler, E. Smith and D. Stetten. Principles of Biochemistry. Mc Graw. Hill Book Company. New York, p. 394. 1959.
- (4) Harper, A. E. Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, 68: 405. 1959.
- (5) Augustinson, K. B. Assay methods for cholinesterases. *Methods of Biochemical Analysis*, 5: 43-46. 1957.
- (6) King, E. J. and A. R. Armstrong. Convenient method of determining serum and bile phosphatase activity. *Canad. Med. Assm. J.* 31: 376-381. 1934.
- (7) Kind, P. R. N. and E. J. King. Estimation of plasma phosphatase by determination of hidrolized phenol with amino antipyrine. *J. Clin. Pat.*, 7: 322-326. 1954.
- (8) Kun, E. Conversion of 3-Phosphoglycerate to phospho enol piruvate by tissue homogenates. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, 75: 68-71. 1950.
- (9) Marenzi, A., J. Moglia y F. Vilallonga. Estudio comparativo de algunos métodos de valoración de las proteínas del suero. I. Proteínas totales. *Am. Cent Invest. Tis.*, 9: 133-143. 1945.
- (10) Ross, M. H., J. O. Ely and J. G. Arches. Alkaline phosphatase activity and pH optima. *J. Biol. Chem.*, 192: 561-568. 1951.
- (11) Péres, G. et G. Zwingelstein. Contribution a l'étude du dosage du magnesium dans les tissus animaux. *Bulletin de la Société des Sciences Veterinaires de Lyon*, 64, N° 3, 347-351. 1962.
- (12) Wharton, H. W. Isolation and determination of microgram amounts of fluoride in materials containing calcium and orthophosphate. *An. Chem.*, 34: 1296-1298. 1962.
- (13) Büttner, V. W., S. Schülke und S. Soyka. Eine Einfache Bestimmungg Kleiner Mengen Von Fluor (5-30 ug) in Knochen und Zahnhartgeweben Durch Diffusion. *Deutsche Zahanortzliche Zeitschrift. Helft 1*: 25-33. 1963.
- (14) Simon G. and J. W. Suttie. Effect of dietary fluoride on food intake and plasma fluoride concentration in the rat. *J. Nutr.*, 96: 152-156. 1968.
- (15) Portela, M. L. and J. C. Sanahuja. Influence of dietary fluoride on food consumption and plasma amino acid in the rat. *Nutr. Rep. Intern.*, 2: 193-201. 1970.
- (16) Simon, G. and J. W. Suttie. Effect of method of fluoride administration on plasma fluoride concentrations. *J. Nutr.*, 94: 511-515. 1968.
- (17) Cimasoni, G. Inhibition of cholin esterases by fluoride in vitro *Biochem. J.* 99: 133-137. 1966.
- (18) Belfanti, S., A. Contardi and A. Ercoli. Researches on the phosphatases. II. Inactivation and reactivation of the phosphatases of animal organs. *Biochem. J.*, 29, 842. 1935.

- (19) Taves, D. R. New approach to the treatment of bone diseases with fluoride. *Fed Proc.*, 29: 1185. 1970.
- (20) Rapaport, J. Mongolism and fluoridated drinking water. *Bull. Nat. Med.*, 140: 529-531. 1956.
- (21) Büttner, W. and Bixler, D. Fluorine and dental health. J. C. Muhler and M. K. Hime eds, Staples, London. 1960.
- (22) Guthrie, H. A., and M. L. Brown - Effect of severe under nutrition in carty life on growth brain - *J. Nutr.* 94: - 419 - 426. 1968.
- (23) Gómez de Uribe, F. y Lambert D'Arasay. El fluor como oligoelemento. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, Vol 36, N^o 2, 285. 1970.
- (24) Zebrowski, E. J. and J. W. Suttie. Glucose oxidation and glycogen metabolism in fluoride-fed rats. *J. Nutr.*, 88: 267-272. 1966.
- (25) Stookey, G. K., Crane, D. B. and Muhler, J. C. Role of skeleton and kidney in fluoride absorption in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 115: 295-298. 1964.
- (26) Neil Jenkins G. Fluoride world review of nutrition and dietetics, Vol. 7, 145. S. Karger, Basel, New York. 1967.
- (27) Possner, A. S. Relationship between diet and bone mineral ultrastructure. *Fed. Proc.*, 26, 1717-1722. 1967.
- (28) Rich C. and Ensink J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature*, 191, 184-185. 1961.
- (29) Griffith, F. D., H. E. Parker and J. C. Rogler. Effects of dietary magnesium and fluoride on the magnesium content of tissues from growing chicks. *J. Nutr.*, 83: 15-19. 1964.
- (30) Vogel, J. J., L. Singer and W. D. Armstrong. Skeletal magnesium changes in the rat during varying dietary fluoride intake and growth. *J. Nutr.*, 93: 425-428. 1967.
- (31) Warburg O. and W. Christian. Isolierung und kristallisation des Gärungs-ferment; enolase. *Biochem. Z.*, 310: 384. 1942.