

32 - Salud humana

Efecto de la administración de una dosis oral de fluoruro sobre el aprendizaje y la memoria en ratas.

Lupión, Patricia M.; Angeloni, Micaela G.; Bazán, Marinela; Chulibert, Maria E.; Henrich, Leandro M; Lehn, Santiago A.

E-mail: patricialupion@gmail.com

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario.

Resumen

El fluoruro (F) es un componente habitual del agua de bebida, alimentos y dentífricos. Se ha descrito descenso del coeficiente intelectual en niños que consumen agua con elevado contenido de F y también se conoce que interfiere en la captación de glucosa en tejidos como el nervioso (SN). Se plantea como hipótesis que la modificación de la homeostasis de la glucosa del SN por el F es una de las causas de los disturbios en el aprendizaje y memoria. El objetivo del trabajo fue evaluar simultáneamente el efecto del F sobre el consumo de glucosa por el SN y el proceso de aprendizaje y memoria en ratas. Para esto se administró una dosis oral de F a 12 ratas hembras Sprague-Dawley de 50 días, divididas en dos grupos: tratadas con F y controles (C). Mediante el test de nado se evaluó la capacidad aprendizaje espacial a través el tiempo de latencia, y la memoria por el tiempo de permanencia. La captación de glucosa por SN se midió por dos métodos *in vivo*: 1- un modelo matemático que utiliza valores de glucemia e insulinemia y 2- perfusión de cerebro *in situ*. No se halló diferencia en el aprendizaje (mediante, [rango]): F: 17 s, [2-90] s, C: [4-90] s, Mann Whitney, $p > 0,05$. La memoria fue significativamente menor en el grupo F: 18 s, [10-38] s, C: 25 s, [14-32] s, $p < 0,05$. La captación de glucosa de grupo F, por ambos métodos fue menor que el grupo C. Podemos concluir que las ratas tratadas con F muestran una disminución de la memoria que podría deberse a un menor metabolismo de glucosa por el SN.

Palabras clave: Fluoruro, Aprendizaje, Memoria, Captación de glucosa

Introducción

El fluoruro (F) es un ion que se encuentra naturalmente en el medio ambiente y el ser humano se expone cotidianamente a él ya que se encuentra en el agua de bebida, alimentos y productos de higiene bucal (Maurer & Day, 1957). Su concentración en agua depende principalmente de su presencia en los suelos y se lo considera un problema a nivel mundial.

Estudios realizados tanto en animales (Basha & Sujitha, 2012) como en niños (Duan, Jiao, Chen, & Wang, 2018; Liu et al., 2000; Wang, Yang, Jia, & Wang, 2008) que consumen agua de bebida con diferentes concentraciones de F demuestran efectos sobre el coeficiente intelectual y la capacidad de aprendizaje, así como también trastornos de ansiedad y depresión (Kivrak Kars, 2012). También se ha observado que el F puede inducir cambios en la fisiología y bioquímica del cerebro que afectan el desarrollo cerebral de los niños durante los procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria específicamente en los primeros 8 años de vida (Mullenix, Denbesten, Schunior, & Kernan, 1995; Seraj et al., 2012). Se ve reflejada dicha alteración en evaluaciones del coeficiente intelectual (IQ), demostrándose que en los niños que

viven en áreas con alto contenido de flúor el IQ es más bajo que el de los niños que viven en áreas con bajo contenido de flúor (Duan et al., 2018; Khan et al., 2015).

La principal fuente de energía de las células del sistema nervioso es la glucosa. Este tejido carece la regulación habitual por la hormona insulina como sucede con otros tejidos que utilizan glucosa para generar energía, como músculo y tejido adiposo. Debido a esta cualidad del sistema nervioso, nos referiremos al consumo de glucosa por este tejido como consumo independiente de insulina.

Diversos efectos que produce el F sobre sistemas biológicos han evidenciado mejoras cuando se realiza ejercicio físico de forma conjunta a la exposición del ion (Basha & Sujitha, 2012) posiblemente por mayor captación de fluoruro por el esqueleto y disminución del mismo en plasma.

Los datos de trabajos anteriores sobre la relación entre el aprendizaje y la memoria fue estudiado en animales y observaciones realizadas en niños con ingesta crónica en agua, sin embargo no existen estudios que demuestren que ocurre luego de cada ingesta. La hipótesis que planteamos es que luego de la ingesta de fluoruro se producirá una disminución de la captación de glucosa y la producción

de energía por células del sistema nervioso, que conducirá a una disfunción del mismo repercutiendo en el proceso de aprendizaje y memoria.

Objetivo

Planteamos como objetivos de este trabajo:

Evaluar el aprendizaje y memoria en ratas luego de una dosis oral de NaF.

Evaluar el consumo de glucosa por el sistema nervioso central luego de una dosis oral de glucosa.

Materiales y Métodos

Todos los experimentos que involucraron animales se llevaron a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio (Animals & Laboratory, 2011). Se utilizaron 12 ratas Sprague Dawley de 50 días de edad. Se las separaron en dos grupos de 6 ratas cada uno: controles (C) y tratados con fluoruro (F). A las ratas del grupo C se les administró agua destilada por sonda orogástrica, y el grupo F se le administró una dosis de 8 mg F/kg de peso corporal diaria a través de sonda orogástrica. A continuación se describen los experimentos realizados y al final de la sección se describen las técnicas utilizadas

Evaluación de aprendizaje y memoria:

Se utilizó el test de nado para evaluar el efecto del tratamiento con F sobre el aprendizaje en referencia espacial y

memoria en ambos grupos de animales (Morris, 1984; Yin et al., 2015; Zhu et al., 2017). El sistema consiste en un tanque de 152 cm de diámetro, 35 cm de profundidad con cargado con agua a una temperatura constante de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. El tanque se divide en cuatro cuadrantes iguales (N, S, E, O) y se lo ubica en una habitación siempre de la misma manera. Consta también con una plataforma de escape de 10 cm de diámetro, que es colocada en un cuadrante constante del tanque, 2 cm por debajo de la superficie del agua. Los ensayos fueron controlados y registrados por una cámara digital que graba un vídeo para su posterior análisis. Se realizaron ensayos de aprendizaje cada 120 minutos 3 veces por día durante 5 días consecutivos. En estos ensayos a las ratas se les administró la dosis de F 15 minutos antes de comenzar el ensayo. Se las colocó siempre en el mismo sitio de un cuadrante que no contiene la plataforma y se les permite nadar 90 segundos para que la rata encuentre la plataforma. En caso de no hallarla, se conduce a la rata sobre la plataforma y se deja 20 segundos en ella para su orientación. Al retirarlas las ratas son secadas con toalla y secador de cabellos de bajo ruido. En cada ensayo se mide el tiempo empleado para encontrar la plataforma, al que llamamos tiempo de latencia. Este tiempo, generalmente, se reduce a medida que se repiten los ensayos por el proceso de aprendizaje

espacial. Al sexto día se retira la plataforma del tanque y se repiten los ensayos 15 minutos después de la administración oral de la dosis de F. En este caso se mide el tiempo que la rata permanece en el cuadrante en el que se hallaba la plataforma al que llamamos tiempo de permanencia y es una medida de memoria espacial. Cuanto más tiempo permanece la rata en el cuadrante se considera mayor memoria espacial.

Evaluación del consumo de glucosa por el tejido nervioso utilizado un modelo matemático:

Se evaluó la captación de glucosa por los tejidos independientes de insulina utilizando un modelo matemático que permite realizar dicha medición de manera mini-invasiva, sin necesidad de anestesia que habitualmente modifican el metabolismo glucídico. (Lombarte, Lupo, Campetelli, Basualdo, & Rigalli, 2013). Para ello se realizaron mediciones de glucosa e insulina plasmática luego de una dosis oral de F. Quince minutos después de la dosis de F se administró glucosa por vía oral (0.06 g/100 g/peso corporal) y se recolectaron muestras de sangre en las que se midió glucosa e insulina a 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min. Con los valores de insulinemia y glucemia se estimaron los parámetros del modelo matemático y luego se realizó la optimización de los mismos utilizando el software Scilab 5.4.4. Las ecuaciones de

estimación y los mecanismos de optimización que se utilizaron han sido descriptos por Lombarte et al.

Medición de consumo de glucosa por cerebro in situ

Se realizó perfusión de cerebro para evaluar *in situ* la captación de glucosa por sistema nervioso. Se midió la concentración de glucosa en el buffer de perfusión al ingreso de carótida y a la salida de yugular y por diferencia entre la concentración de ingreso y salida se evaluó la cantidad de glucosa consumida. Se utilizó una solución amortiguadora conteniendo glucosa a una concentración de 1 g/l. Ésta se dividió en dos fracciones donde a una se le agregó NaF de manera de fijar la concentración en 40 $\mu\text{mol/l}$. Para realizar la perfusión de cerebro se cateterizó la arteria carótida izquierda y vena yugular derecha, obturando otros vasos para circunscribir el territorio perfundido. Se recolectó en tubos Eppendorf el perfusato proveniente de la vena yugular. La solución amortiguadora de perfusión fue impulsada por medio de una bomba peristáltica con control de presión entre valores de 80 a 110 mmHg y un flujo de 0,4 ml/min. Sobre el perfusato se realizó la medición de glucosa. Durante un período de 15 minutos se perfundió cada animal con buffer sin fluoruro (-F) e inmediatamente se cambió a buffer con fluoruro (+F). Los resultados se analizaron

comparando la media de las glucemias en el período +F con -F.

A continuación se describen las técnicas utilizadas a lo largo del trabajo.

Sonda orogástrica:

Para la administración de sustancias por vía oral y en dosis única se utilizó una sonda de polietileno K35 para animales de menos de 200 g o K31 para animales de más de 200 g. La sonda se conecta a una jeringa y se carga la solución, se seca con papel absorbente y se sellan los orificios con vaselina sólida, de manera la solución a administrar que no entre en contacto con vías aéreas y digestivas superiores, por las características irritantes de la solución utilizada (Lupo, Di Loreto, & Rigalli, 2009)

Extracción de sangre:

La sangre se extrajo en capilares heparinizados de la vena lateral de la cola (Lupo, Di Loreto, Pera; Laura, & Rigalli, 2009) se centrifugó a 5000 g y luego son cortados a la altura de la separación plasma-glóbulos para la utilización del plasma en las determinaciones de glucosa e insulina.

Medición de insulina:

La medida de la concentración de insulina plasmática se realizó con un contador de centelleo sólido Alfa nuclear modelo Cmos utilizando un kit de radioinmunoensayo específico para insulina de rata (Rat insulin Millipore, USA).

El ensayo se fundamenta en la competencia entre la insulina de la muestra con insulina marcada con ¹²⁵I por anticuerpos específicos contra insulina de rata. El manejo del material radiactivo se realizó de acuerdo a las normas establecidas por la Autoridad Regulatoria Nuclear Argentina (norma ARN 10.1.1 de seguridad radiológica). La determinación está sujeta a controles de calidad descriptos en la sección de técnicas estadísticas y control de calidad.

Medición de glucosa:

La determinación de glucosa se realizó con un kit comercial (Glicemia enzimática Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina). El método utiliza glucosa oxidasa y el color desarrollado es proporcional a la concentración de glucosa que se encuentra en la muestra. La absorbancia se midió a 505 nm con un lector de microplacas Rayto RT- 6000 y se procesan simultáneamente testigos de glucosa de 0,5, 1, 2 y 3 g/l. La determinación está sujeta a controles de calidad descriptos en la sección de técnicas estadísticas y control de calidad.

Anestesia.

Se realizó preanestesia por inyección subcutánea de 0,05 ml de azepromacina/ 100g de peso corporal. Luego de alcanzado un grado adecuado sedación se coloca la rata en una cámara con buen cierre para proceder con la anestesia inhalatoria con isofluorano hasta alcanzar

un nivel de narcosis que elimina el reflejo podal. Por último se inyecta uretano a nivel intraperitoneal en una concentración 1ml/100g de peso corporal. Durante la anestesia, la temperatura corporal se mantuvo a 32-34°C (De Candia, Rigalli, & Di Loreto, 2009).

Cateterismo arterio-venoso.

Se utilizó esta técnica como recurso para la obtención de muestras de sangre en el caso que los animales se encuentren bajo efectos anestésicos y esta misma técnica fue utilizada para la inserción de los catéteres para la perfusión de cerebro (Di Loreto & Rigalli, 2009)

Eutanasia.

La eutanasia se realizó por punción cardíaca luego de la realización de la perfusión hasta la desaparición de signos vitales (Charbonneau et al., 2010).

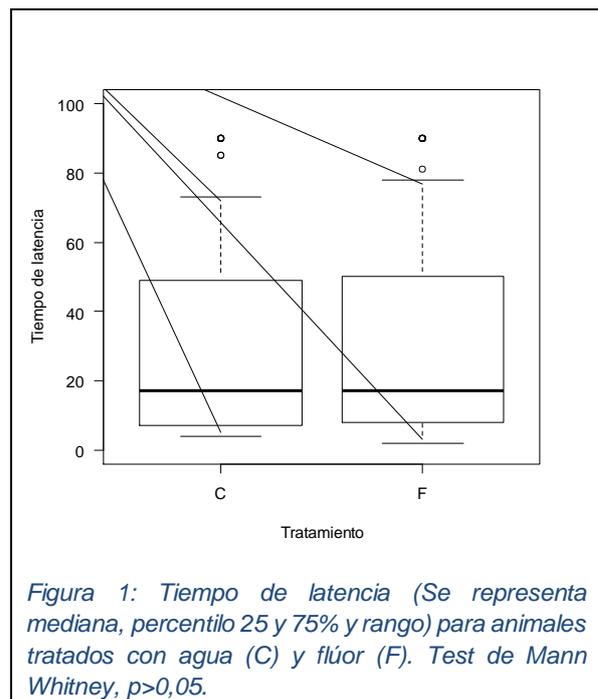
Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con R 3.0.2 utilizando las bibliotecas `utils`, `stats` y `graphics`. Dado que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad (Test de Shapiro Wilk) y homogeneidad de variancias (test de Bartlett) se realizaron las comparaciones entre grupos utilizando el test de Mann Whitney y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$. Para las curvas de supervivencia se utilizó la biblioteca `survival` del mismo software. Cuando se

muestran resultados se indica mediana, [rango de valores], en las gráficas se utilizan boxplot donde se indica mediana, percentilos 25 y 75% y rango.

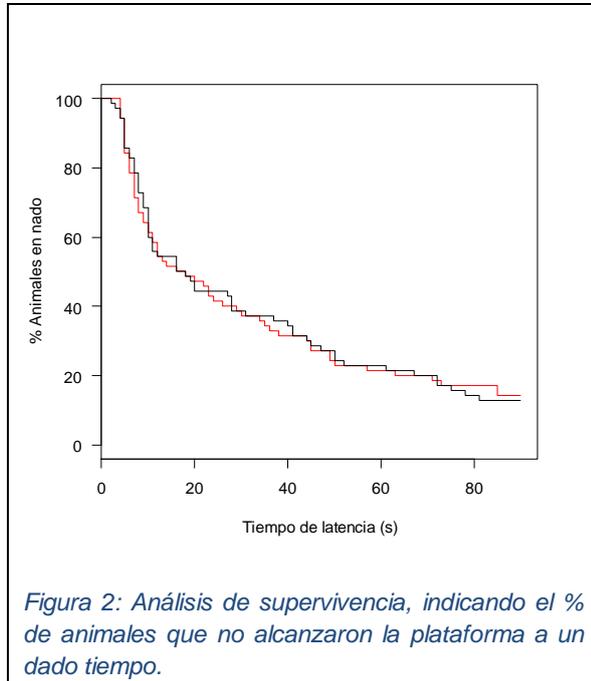
Resultados y Discusión

El aprendizaje no mostró diferencias significativas entre los animales analizado por el tiempo de latencia (se muestra mediana, [rango]). Las ratas tratadas del grupo F mostraron valores de 17 s, [2-90] s y los controles (C) arrojaron 17 s, [4-90] s (Test de Mann Whitney, $p > 0,05$), (Figura 1).

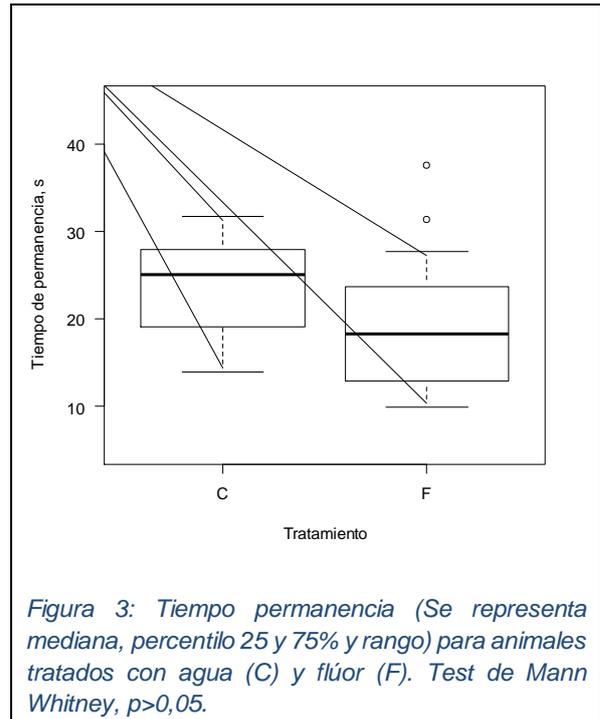


El análisis de supervivencia mostró que la cantidad de animales que permanecen nadando a un dado tiempo (% Animales en nado) no fue diferente entre los animales

del grupo F respecto al grupo control C (Figura 2) (logrank.test, $p > 0,05$).



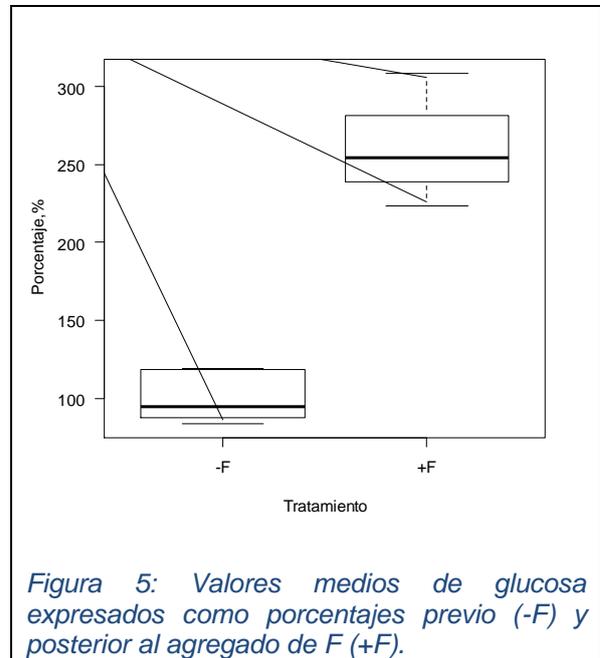
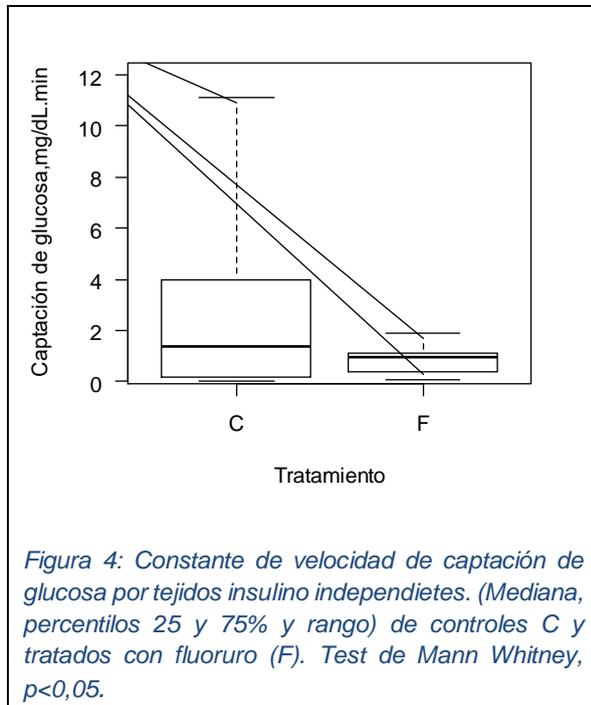
En el estudio de memoria de las ratas, se obtuvo en el grupo F valores de 18 s, [10-38] s en comparación al grupo C que dieron valores de 25 s, [14-32] s (Figura 3), que al analizarlos por el test de Mann Whitney evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).



Al evaluar el consumo de glucosa utilizando el modelo matemático en tejidos independiente de insulina (que representa principalmente el consumo de glucosa por el sistema nervioso), la constante de velocidad del proceso de captación de glucosa por este sistema fue significativamente menor en los animales tratados con F: 0,97 mg/(dl*min), [0,06-1,9] mg/(dl*min); en comparación a los controles, C: 1,37 mg/(dl*min), [0,02-11,1]

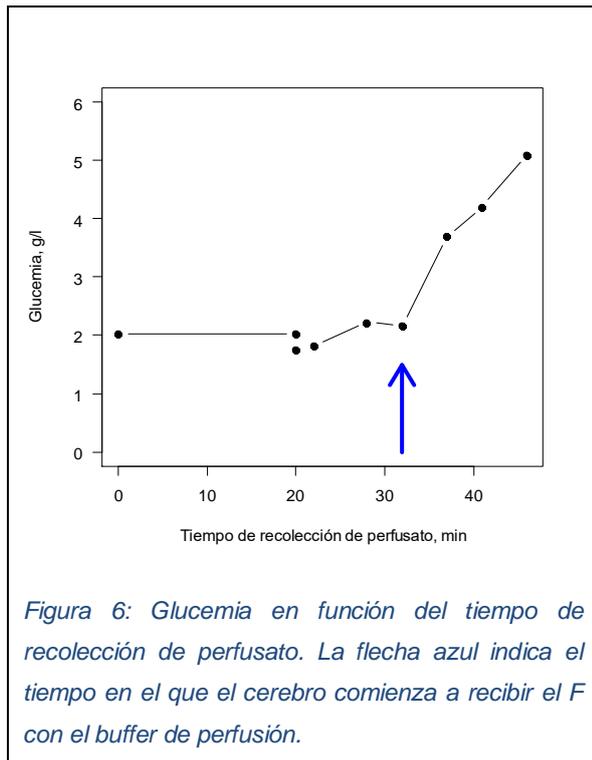
mg/(dl*min) (Test de Mann Whitney, $p < 0,05$), (Figura 4).

respecto del valor en el período -F, para cada rata.



Al realizar la perfusión de cerebro, la concentración de glucosa en el perfusato durante el período de perfusión con fluoruro (+F) fue significativamente mayor que en el período sin fluoruro (-F) (Figura 5). Para una mejor visualización de los resultados los valores de glucosa en el período +F se expresaron como porcentaje

A modo de ejemplo se muestra el comportamiento de la glucemia a lo largo del tiempo de recolección del perfusato de una rata.



Los datos del modelo matemático nos dicen que la velocidad de captación de glucosa por los tejidos independientes de insulina, es menor en los animales tratados con F. Los resultados de perfusión expresan un aumento de glucosa en el perfusato. Estas dos observaciones nos permiten inferir que estos tejidos estarían captando menor cantidad de glucosa en presencia de F.

A su vez, en relación al aprendizaje y memoria podemos decir que el aprendizaje no se vio afectado por la exposición al F pero en cuanto a la memoria a corto plazo hay un cambio en el comportamiento de las ratas tratadas con F en comparación a las controles.

Conclusiones

El análisis realizado en el tiempo de latencia en ratas luego de una dosis única de fluoruro indica que no hay cambios significativos en el aprendizaje al comparar los grupos F y C. En cambio al analizar el tiempo de permanencia del test de nado, las ratas pertenecientes al grupo C recorrieron por más tiempo el cuadrante donde se encontraba la plataforma en comparación al grupo tratado F. Esto daría un indicio de que no se modifica el aprendizaje luego de una dosis única de F pero afecta la memoria a corto plazo. Con respecto a la captación de glucosa por sistemas independientes de insulina, representada en su gran mayoría por el tejido del sistema nervioso central, mostró una disminución en este parámetro en las ratas tratadas con F. Este resultado obtenido *in vivo* en base a un modelo matemático con correlato biológico comprobado, fue ratificado por los experimentos de perfusión de cerebro, en los que se observó un menor consumo de glucosa por parte del tejido perfundido. Esto nos indica que podría existir un funcionamiento anormal de las células nerviosas favoreciendo la disminución en la memoria de las ratas tratadas. Estos resultados muestran por primera vez que el efecto del F no necesita un proceso acumulativo o a largo plazo, sino que se instala inmediatamente que el F entra en contacto con el tejido. Se podría especular

que el menor consumo de glucosa por el sistema nervioso podría deberse a una menor captación o bien a una disminución del metabolismo de la misma que determine aumento de la concentración intracelular y como consecuencia menor difusión de glucosa hacia el espacio intracelular a través de los transportadores GLUT3, de expresión en el sistema nervioso. El menor metabolismo de la glucosa podría deberse a inhibición de la enzima enolasa debido a un efecto competitivo o no competitivo dependiendo de los niveles de fosfato (Qin, Chai, Brewer, Lovelace, & Lebioda, 2006). Una opción que puede explicar la disminución en el metabolismo podría ser el freno al funcionamiento de la cadena respiratoria (Fina, Lombarte, Rigalli, & Rigalli, 2014) que produciría aumento del NADH y por ende disminución del NAD⁺ necesario para el funcionamiento de la glucólisis. Resultados adicionales en curso con 2-desoxiglucosa-¹⁴C, permitirán identificar cuál de los dos mecanismos es predominante o realmente ocurre.

Bibliografía

- Animals, N. R. C. (US) C. for the U. of the G. for the, & Laboratory, C. and U. of. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th editio). Washington, D.C.: National Academies Press.
<https://doi.org/10.17226/12910>
- Basha, P. M., & Sujitha, N. S. (2012). Combined Impact of Exercise and Temperature in Learning and Memory Performance of Fluoride Toxicated Rats. *Biological Trace Element Research*, 150(1–3), 306–313.
<https://doi.org/10.1007/s12011-012-9489-3>
- Charbonneau, R., Niel, L., Olfert, E., Von Keyserlingk, M., Griffin, G., Fletch, A., ... Makowska, M. J. (2010). *CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science Canadian Council on Animal Care in science*. ON CANADA. Retrieved from <http://www.ccac.ca>
- De Candia, F., Rigalli, A., & Di Loreto, V. (2009). Anesthesia and Analgesia. In A. Rigalli & V. Di Loreto (Eds.), *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. (1st ed., pp. 21–30). Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press.
- Di Loreto, V. E., & Rigalli, A. (2009). Catheterization of the femoral artery and vein. In A. Rigalli & V. Di Loreto (Eds.), *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. (1st editio, pp. 73–76). Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press.
- Duan, Q., Jiao, J., Chen, X., & Wang, X. (2018). Association between water fluoride and the level of children's intelligence: a dose–response meta-

- analysis. *Public Health*, 154, 87–97.
<https://doi.org/10.1016/j.puhe.2017.08.013>
- Fina, B. L., Lombarte, M., Rigalli, J. P., & Rigalli, A. (2014). Fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. *PloS One*, 9(6), e100768.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100768>
- Khan, S. A., Singh, R. K., Navit, S., Chadha, D., Johri, N., Navit, P., ... Bahuguna, R. (2015). Relationship Between Dental Fluorosis and Intelligence Quotient of School Going Children In and Around Lucknow District: A Cross-Sectional Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(11), ZC10-ZC15.
- Kivrak Kars, Y. (2012). Effects of fluoride on anxiety and depression in mice. *Fluoride*, 45(3), 302–306.
- Liu, S., Lu, Y., Sun, Z., Wu, L., Lu, W., Wang, X., & Yan, S. (2000). Report on the intellectual ability of children living in high-fluoride water areas. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*, 15(4), 231–232.
- Lombarte, M., Lupo, M., Campetelli, G., Basualdo, M., & Rigalli, A. (2013). Mathematical model of glucose-insulin homeostasis in healthy rats. *Mathematical Biosciences*, 245(2), 269–277.
<https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.07.017>
- Lupo, M., Di Loreto, V. E., Pera, Laura, & Rigalli, A. (2009). Samples. In A. Rigalli & V. Di Loreto (Eds.), *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (1st ed., pp. 63–72). Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press.
- Lupo, M., Di Loreto, V. E., & Rigalli, A. (2009). Substances administration. In A. Rigalli & V. Di Loreto (Eds.), *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (1st ed., pp. 55–62). Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press.
- Maurer, R. L., & Day, H. G. (1957). The Non-Essentiality of Fluorine in Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 62(4), 561–573.
<https://doi.org/10.1093/jn/62.4.561>
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47–60.
 Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.454.9394&rep=rep1&type=pdf>
- Mullenix, P. J., Denbesten, P. K., Schunior, A., & Kernan, W. J. (1995). Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicology and Teratology*,

17(2), 169–177.

[https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)00070-T](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)00070-T)

Qin, J., Chai, G., Brewer, J. M., Lovelace, L. L., & Lebioda, L. (2006). Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. *Biochemistry*, 45(3), 793–800.

<https://doi.org/10.1021/bi051558s>

Seraj, B., Shahrabi, M., Shadfar, M., Ahmadi, R., Fallahzadeh, M., Eslamlu, H. F., & Kharazifard, M. J. (2012). Effect of high water fluoride concentration on the intellectual development of children in makoo/iran. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 9(3), 221–229.

Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23119131>

Wang, G., Yang, D., Jia, F., & Wang, H. (2008). A study of the iq levels of four- to seven-year-old children in high fluoride areas. *Fluoride*, 41(4), 340–343. Retrieved from <http://www.fluoridealert.org/wp-content/uploads/wang-1996.pdf>

Yin, X., Zhang, X., Lv, C., Li, C., Yu, Y., Wang, X., & Han, F. (2015). Protocatechuic acid ameliorates neurocognitive functions impairment induced by chronic intermittent hypoxia. *Scientific Reports*, 5(1), 14507.

<https://doi.org/10.1038/srep14507>

Zhu, Y., Xi, S., Li, M., Ding, T., Liu, N., Cao, F., ... Jiang, S. (2017). Fluoride and arsenic exposure affects spatial memory and activates the ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *NeuroToxicology*, 59, 56–64.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.006>

Financiamiento

Subsidio para investigación médica, Fundación Alberto J. Roemmers, 2017-2020.