



**Fluoruro en alimentos: contenidos,
bioaccesibilidad y absorción por el epitelio
intestinal**

Tesis Doctoral presentada por:

René Antonio Rocha Barrasa

Dirigida por:

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Valencia, Enero 2013

Vicenta Devesa i Pérez y Dinoraz Vélez Pacios, ambas Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR QUE: El trabajo de investigación titulado “**Fluoruro en alimentos: contenidos, bioaccesibilidad y absorción por el epitelio intestinal**” que presenta D. René Antonio Rocha Barrasa para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, Enero de 2013

Fdo: Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Fdo: Dra. Dinoraz Vélez Pacios

*“Firme y decidido va el guerrero persuadido, sin miedo
alguno, más que enfrentar el desafío”*

*“Esa llama que hay dentro de ti, es el motor que te alimenta
día a día”*

Para ti mi amor, por ser mi luz de cada día

Agradecimientos

En este instante tan especial, en que he terminado una etapa de mi formación, deseo agradecer especialmente a la vida y al todo poderoso por permitirme cumplir un objetivo que tenía planteado realizar. No todos los días se realiza una tesis doctoral y puedo decir que es una experiencia única y compleja de describir. En la vida de cada persona existen objetivos y metas que cumplir. Personalmente creo que he cumplido uno de ellos, pero aún faltan unos tantos más.

Si miro hacia atrás, veo a un hombre con deseos de crecer y que dice “la ciencia es interesante, pero depende de la perspectiva y el enfoque que le dé”. Todos los días ocurren milagros, y el que existamos ya es uno de ellos.

Descifrar los misterios de la naturaleza, es algo interesante, y que siempre me ha apasionado. Cada evento que ocurre, la luz que entra por la ventana o la simple transformación de energía tienen un propio fin. Somos un flujo de energía, que va de un sitio a otro a interactuar “Todo tiene una finalidad”. Tan sencillo como lo es una célula, nos adentra en un mundo organizado y maravilloso que nunca dejará de sorprendernos.

Mis sentimientos se transforman en palabras y es que se me vienen a la memoria muchas personas que ayudaron y que algo tuvieron que ver para que yo pudiera realizar esta tesis. En mi etapa de estudiante en la Universidad de Concepción en Chile, el Doctor Carlos Bruhn fue un gran mentor y apoyo a mi proyección profesional. Agradezco su apoyo y sus sabios consejos. Gracias por confiar en mí y por estar pendiente de mi desarrollo profesional.

Agradezco a mis padres, los que me han entregado unos principios únicos y en enseñarme a enfrentar la vida. Gracias por entregarme ese consejo oportuno en mi adolescencia, a motivarme a estudiar y a realizar lo que a mí

me gusta. A mis hermanos José Luis y Gladys, por darme ánimos y las energías a veces necesarias. A mis queridos suegros Don Daniel y la Sra. Hilda que siempre han estado conmigo y con mi esposa, y que nos han entregado su cariño y apoyo en todo momento; muchas gracias. A mis queridos abuelos, que ya no están conmigo físicamente, pero siento su cariño y buenos deseos. A mi querido Chile, a los 33 mineros y a los afectados por el terremoto, que me motivaron a seguir adelante y sacar ese espíritu de superación en los momentos complicados.

De igual manera debo agradecer a la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID) y a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) de Chile que fueron los organismos que me dieron el auspicio económico y la posibilidad de llevar a cabo esta tesis doctoral. Muchas gracias por permitir que muchos estudiantes como yo permitan llevar a cabo sus objetivos.

A mis compañeros de grupo que han aportado al desarrollo de esta tesis. Antonio, Chusa, Beatriz y Dayane por estar ahí y por esa entrega que han tenido para que en esta tesis se incluyeran todos los objetivos planteados inicialmente. Martita Vázquez, me llevo muy buenos recuerdos de Tu persona, admiro tu orden y disciplina además de tu buena onda y simpatía. Seguro que has empezado una etapa que te llevará a consolidarte como una gran científica. Martita Calatayud muchas gracias por lo buena persona que has sido con María Alejandra y conmigo. Tienes un corazón gigante y lleno de buenos sentimientos. Gracias por acogernos aquí en España junto a tu familia y por ser nuestra amiga. Espero que sigas en la línea de la investigación y no pierdas tu potencial y experiencia. A mi amiga Silvia por invitarme a beber de esa cervecita relajadora después de un día arduo de trabajo y que siempre estaba fresquita. Gracias por recordarme de que la vida también tiene otras cosas que a veces olvidamos. A Carlos Jadan por su

calidad de persona y por desear lo mejor al prójimo. A mi querida Maite, a la cual estimo mucho. Un gusto haberte conocido, eres una persona con unas características muy especiales y que se fija en detalles que el resto no hacemos. A Ramón, Rafa y mis amigos del grupo de envases y con los que pase bonitas experiencias: Joaquín, Carol, Mari Pau, José Pascual, Laurita, Virginia, Gracia y Felipe. A mis amigos Edson Pablo, Marino, Poliana, Francisca, Jader, Bruno, Clara, Fernando, Álvaro, Lola, Juan Mario, Ainhoa, Moisés, Onofrio, Carlos, Aurelie y Daniela a los cuales estimo mucho y con los que compartí bellos momentos. Amigo Miguel gracias por tu buena onda y tu amistad, extrañaré tus simpáticas conversaciones de pasillo y todo el fútbol que nos gusta. A mis amigos del deporte con los que pase entretenidos momentos.

A Rosa Montoro que fue el primer contacto con el grupo y la que me abrió las puertas para conocer a Deni y Vicenta. Gracias por responder ese primer e-mail y por entender mis intereses personales.

Tengo que agradecer enormemente a Deni y Vicenta que han sido el apoyo científico de esta tesis y las responsables de que este trabajo tuviera una coherencia y secuencia ordenada. Deni muchas gracias por tu entrega y por ser la responsable directa de que yo pudiera llegar al grupo No olvidaré tus consejos que no tienen otra finalidad que mejorar mis falencias. Gracias por ayudar a mi formación científica y por desear que llegue a un nivel más alto. Todos los días crecemos, y en parte algo te debo a tí durante estos 4 años. Vicenta, valoro enormemente tu aporte en esta tesis, tanto tus convicciones como en como orientar los objetivos inicialmente planteados. Gracias por intentar mejorar mi redacción y todo lo relacionado con la escritura. Estoy consciente que me falta aún por mejorar, pero ya me has dado las pautas. Gracias por permitirme al igual que Deni, dominar nuevas técnicas las cuales no había pensado abordar. Me voy contento de haber

incursionado nuevos campos que seguro enriquecerán mi quehacer científico. Esta tesis es también de ustedes.

A Julio Barrios, por estar pendiente de María Alejandra y de mi persona. Te doy las gracias de todo corazón por ayudarnos en los momentos difíciles y por permitirme conocerte. Gracias por ayudarme a montar mis primeras PCR-RT y por ser mi amigo.

Al grupo de Proteómica, los que me enseñaron algunas técnicas. A José Gimeno por darme el primer empujón con cultivos celulares, a Lorena Perales y Ana Adam por enseñarme técnicas que fueron de aporte para esta tesis.

En general, agradecer al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, y a todos los que forman parte del mismo. Existe un gran grupo humano. Todo el tiempo me sentí en casa. Mis mejores deseos para todos ustedes.

Finalmente debo agradecer a María Alejandra mi amada esposa, quien ha sido mi apoyo incondicional durante todo este tiempo. Mi amor muchas gracias por estar conmigo durante todo este tiempo y por tu paciencia. Tu sonrisa es la motivación que necesito día a día. Has estado en mis altos y bajos y has sabido entenderme y darme ese consejo oportuno. Sin duda que estos 4 años han sido de muchas vivencias en Valencia y nos vamos con un bonito recuerdo de España. Esta tesis es de los dos y bien sabes que durante estos años hemos crecido como pareja ya que la adversidad la hemos sabido enfrentar. La vida sigue y aún se vienen unas cuantas experiencias más.

René Antonio Rocha Barrasa

RESUMEN

El fluoruro se considera importante para la salud debido a su efecto beneficioso en la prevención de la caries dental y en el desarrollo óseo en la población infantil. Sin embargo, una ingesta excesiva produce determinadas patologías, como fluorosis dental y esquelética, incluso reducciones de las capacidades cognitivas en la población infantil. El objetivo de esta tesis doctoral es la evaluación de los contenidos de fluoruro en los alimentos, su bioaccesibilidad y su absorción por el epitelio intestinal, así como los efectos que este elemento puede ejercer a su paso por el tracto intestinal.

Se ha desarrollado una metodología rápida para el análisis del fluoruro presente en alimentos basada en una digestión ácida asistida por microondas y posterior detección mediante potenciometría. Esta metodología presenta ventajas respecto a la fusión alcalina, método más empleado para el análisis de fluoruro. La aplicación de esta técnica a muestras de un estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana ha generado datos sobre concentraciones e ingestas de este elemento y ha puesto de manifiesto que los productos pesqueros y el arroz son los alimentos que realizan un mayor aporte del elemento. Esta situación varía en poblaciones que presentan problemas de contaminación en las aguas de consumo. Para estas comunidades, se ha evidenciado que las pastas y leguminosas aportan cantidades muy importantes de fluoruro a la dieta, similares a las de los productos pesqueros. Esto es consecuencia del proceso de cocinado con aguas con altos contenidos de fluoruro.

Para una aproximación más realista a la estimación del riesgo se ha analizado la cantidad de fluoruro solubilizada desde los alimentos durante la digestión gastrointestinal (bioaccesibilidad), evidenciándose que este parámetro oscila entre 38-103%. La consideración de la bioaccesibilidad

reduce la exposición al elemento respecto a los cálculos en base a los contenidos del producto. Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que la solubilización gastrointestinal de fluoruro está especialmente influenciada por el pH de la etapa gástrica y la concentración de sales biliares de la etapa intestinal, así como por la presencia de cationes en el proceso digestivo.

El estudio de los mecanismos de absorción intestinal de fluoruro han indicado que la vía paracelular es la mayoritaria en la absorción y secreción de este compuesto. Asimismo, se ha evidenciado la participación de transportadores transcelulares dependientes de pH, incluso la intervención de mecanismos implicados en el transporte de cloruros. La elevada contribución de la ruta paracelular ha puesto de manifiesto que el empleo de células Caco-2, modelo ampliamente utilizado para los estudios de biodisponibilidad, puede no ser la aproximación más idónea para el fluoruro. De hecho el uso de co-cultivos celulares de Caco-2 con HT29-MTX, ha mostrado resultados de permeabilidad más próximos a los reportados *in vivo*.

Adicionalmente, se ha evidenciado que la exposición a fluoruro afecta al epitelio intestinal, alterando los procesos de diferenciación celular y permeabilidad y generando una respuesta proinflamatoria.

Los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen a incrementar el escaso conocimiento sobre la presencia de fluoruro en los alimentos y los procesos que permiten su llegada a la circulación sistémica.

RESUM

El fluorur es considera important per a la salut a causa del seu efecte beneficiós en la prevenció de la càries dental i en el desenvolupament ossi en la població infantil. No obstant això, una ingesta excessiva produeix determinades patologies, com fluorosis dental i esquelètica, fins i tot reduccions de les capacitats cognitives en la població infantil. L'objectiu d'aquesta tesi doctoral és l'avaluació dels continguts de fluorur en els aliments, la seva bioaccessibilitat i la seva absorció per l'epiteli intestinal, així com els efectes que aquest element pot exercir al seu pas pel tracte intestinal.

S'ha desenvolupat una metodologia ràpida per a l'anàlisi del fluorur present en aliments basada en una digestió àcida assistida per microones i posterior detecció mitjançant potenciometria. Aquesta metodologia presenta avantatges respecte a la fusió alcalina, mètode més emprat per a l'anàlisi de fluorur. L'aplicació d'aquesta tècnica a mostres d'un estudi de Dieta Total de la Comunitat Valenciana ha generat dades sobre concentracions i ingestes d'aquest element i ha posat de manifest que els productes pesquers i l'arròs són els aliments que realitzen una major aportació de l'element. Aquesta situació varia en poblacions que presenten problemes de contaminació en les aigües de consum. Per a aquestes comunitats, s'ha evidenciat que les pastes i llegums aporten quantitats molt importants de fluorur a la dieta, similars a les dels productes pesquers. Això és conseqüència del procés de cuinat amb aigües amb alts continguts de fluorur.

Per a una aproximació més realista a l'estimació del risc s'ha analitzat la quantitat de fluorur solubilitzada des dels aliments durant la digestió gastrointestinal (bioaccessibilitat), evidenciant-se que aquest paràmetre oscil·la entre 38-103%. La consideració de la bioaccessibilitat redueix l'exposició a l'element respecte als càlculs sobre la base dels continguts del

producte. Addicionalment, s'ha posat de manifest que la solubilització gastrointestinal de fluorur està especialment influenciada pel pH de l'etapa gàstrica i la concentració de sals biliars de l'etapa intestinal, així com per la presència de cations en el procés digestiu.

L'estudi dels mecanismes d'absorció intestinal de fluorur ha indicat que la via paracel·lular és la majoritària en l'absorció i secreció d'aquest compost. Així mateix, s'ha evidenciat la participació de transportadors transcel·lulars dependents de pH, fins i tot la intervenció de mecanismes implicats en el transport de clorurs. L'elevada contribució de la ruta paracel·lular ha posat de manifest que l'ocupació de cèl·lules Caco-2, model àmpliament utilitzat per als estudis de biodisponibilitat, pugues no ser l'aproximació més idònia per al fluorur. De fet l'ús de co-cultius cel·lulars de Caco-2 amb HT29-MTX, ha mostrat resultats de permeabilitat més propers als reportats *in vivo*.

Addicionalment, s'ha evidenciat que l'exposició a fluorur afecta a l'epiteli intestinal, alterant els processos de diferenciació cel·lular i permeabilitat i generant una resposta proinflamatòria.

Els resultats obtinguts en la present tesi contribueixen a incrementar l'escàs coneixement sobre la presència de fluorurs en els aliments i els processos que permeten la seva arribada a la circulació sistèmica.

ABSTRACT

Fluoride is considered an important element for human health because of its beneficial effect in preventing tooth decay and in promoting bone development in children. However, an excessive intake causes certain pathologies, such as dental and skeletal fluorosis, even reductions in the cognitive abilities in child population. The aim of this thesis is the evaluation of the fluoride contents in food products, its bioaccessibility and its absorption by the intestinal epithelium, as well as the effects that this element may exert during its passage through the intestinal tract.

A rapid methodology for the analysis of fluoride in foods based on a microwave-assisted acid digestion and subsequent detection by potentiometry has been developed. This method presents advantages with respect to the alkali fusion, the most widely used method for analysis of fluoride. The application of this technique to samples of a Total Diet study of the Valencian Community has generated data on concentrations and intakes of this element and has shown that fish products and rice are the food that makes the greatest contribution of the element. This situation varies in populations with problems of contamination in drinking water. For these communities, there is evidence that pasta and legumes provide substantial amounts of fluoride to the diet, similar to those of fish products. This is consequence of the cooking process with water containing elevated concentrations of fluoride.

For a more realistic approach to the risk assessment, the amount of solubilized fluoride from food during gastrointestinal digestion (bioaccessibility) has been analyzed, showing that this parameter ranges from 38-103%. Considering bioaccessibility in the risk assessment reduces the fluoride exposure with respect to the estimation taking into account the

contents on the product. Additionally, it has been shown that gastrointestinal solubilization of fluoride is especially influenced by the pH of the gastric phase and the concentration of bile salts in the intestinal stage and by the presence of cations in the digestive process.

The study of the mechanisms of intestinal absorption of fluoride has indicated that the paracellular pathway is the major route in the absorption and secretion of this compound. Additionally the involvement of transcellular pH-dependent transporters, even the participation of mechanisms involved in the transport of chloride has been evidenced. The high contribution of the paracellular route has indicated that the employ of Caco-2 cells, widely used model for the bioavailability studies, may not be the most suitable approach for fluoride. In fact the use of cellular co-cultures of Caco-2 with HT29-MTX, has turned out permeability results closer to those reported *in vivo*.

Additionally, it has been shown that exposure to fluoride affects the intestinal epithelium, altering cellular differentiation processes and permeability and generating a proinflammatory response.

The results obtained in this thesis contribute to increase the limited knowledge about the presence of fluoride in foods and the processes that allow its entrance into the systemic circulation.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. Flúor y compuestos fluorados: características y usos.....	3
2. Exposición humana a fluoruros	7
2.1. Agua	7
2.2. Alimentos	10
3. Ingesta de fluoruro.....	13
4. Métodos analíticos para la determinación del fluoruro en alimentos ...	14
4.1. Métodos de digestión.....	15
4.2 Métodos de aislamiento del fluoruro	16
4.3. Métodos de cuantificación.....	17
5. Efectos del fluoruro sobre la salud	20
5.1. Fluorosis dental y esquelética.....	21
5.2. Desarrollo embrionario y psicomotriz.....	23
6. Mecanismos celulares de toxicidad del fluoruro	24
7. Toxicocinética	27
8. Biomarcadores de exposición a fluoruro	30
9. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad	33
9.1. Definición de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	33
9.2. Modelos para la evaluación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad.....	35
9.3. Estudios sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del fluoruro	38
10. Absorción intestinal.....	40
10.1. Estructura de la pared intestinal	40
10.2. Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de la absorción intestinal	44

10.3. Mecanismos de transporte intestinal	47
10.4. Evaluación de los mecanismos de absorción intestinal del fluoruro	49
OBJETIVOS.....	51
METODOLOGÍA	55
1. Determinación de fluoruro y su bioaccesibilidad en alimentos.....	57
1.1. Muestras para el estudio de contenidos de fluoruro en alimentos y su bioaccesibilidad	57
1.1.1. <i>Muestras del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana</i>	57
1.1.2. <i>Muestras de productos de la pesca y cereales preparadas por el Laboratorio de Contaminación Metálica</i>	59
1.1.3. <i>Muestras de raciones duplicadas de alimentos consumidos en escuelas argentinas</i>	61
1.2. Digestión vía húmeda de alimentos.....	62
1.3. Digestión vía seca de alimentos	63
1.4. Digestión gastrointestinal simulada de alimentos	64
1.5. Análisis de fluoruro en alimentos y sus fracciones bioaccesibles .	67
2. Factores que afectan a la solubilización de fluoruro desde alimentos..	68
2.1. Influencia de la etapa digestiva en la solubilización de fluoruro ..	68
2.2. Influencia del pH de la etapa gástrica en la solubilización de fluoruro.....	69
2.3. Influencia de la concentración de pepsina de la etapa gástrica en la solubilización de fluoruro.....	69
2.4. Influencia de la concentración de sales biliares de la etapa intestinal en la solubilización de fluoruro	70
2.5. Influencia de la presencia de determinados cationes en la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica e intestinal.....	70

3. Estudios <i>in vitro</i> de la absorción intestinal de fluoruro	71
3.1. Mantenimiento de los cultivos celulares de Caco-2 y HT29-MTX	71
3.2 Evaluación de la permeabilidad aparente, transporte y retención celular de fluoruro por la línea celular Caco-2	73
3.2.1. Ensayos de viabilidad celular en Caco-2	74
3.2.2. Cultivos de la línea celular Caco-2 en Transwell® para estudios de transporte y permeabilidad	75
3.2.3. Integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte	77
3.2.4. Ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad en condiciones estándar	78
3.2.5. Estudio del transporte paracelular	80
3.2.6. Efecto del pH sobre el transporte y acumulación de fluoruro ...	80
3.2.7. Efecto de la temperatura sobre el transporte y acumulación de fluoruro	81
3.2.8. Efecto de la presencia de cloruros (Cl) sobre el transporte y acumulación de fluoruro	82
3.2.9. Participación de un intercambiador F/OH en el transporte y acumulación celular de fluoruro	83
3.3. Evaluación del modelo celular y los factores presentes en el tracto intestinal sobre la permeabilidad intestinal de fluoruro	84
3.3.1. Modelos celulares	84
3.3.2. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente	85
3.3.3. Influencia del mucus secretado por las HT29-MTX sobre el transporte de fluoruro	85
3.3.4. Influencia del pH en el transporte de fluoruro	86
3.3.5. Influencia del ácido taurocólico en el transporte de fluoruro ...	86
3.3.6. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de fluoruro	86

3.4. Determinación de fluoruro en los medios de cultivo y el lisado celular	87
3.5. Cuantificación del contenido total de proteínas	88
4. Efectos de la exposición a fluoruro sobre el epitelio intestinal	89
4.1. Extracción del RNA total de los cultivos celulares	90
4.2. Cuantificación del RNA y evaluación de su integridad	91
4.3. Transcripción inversa (RT)	91
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)	92
4.5. Efecto del fluoruro sobre la línea celular Caco-2 en exposiciones de corta duración	95
4.6. Efecto del fluoruro sobre la línea celular Caco-2 en exposiciones repetidas en el tiempo	95
5. Análisis estadístico	97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL FLUORURO EN ALIMENTOS ..	103
1. Optimización de las condiciones para la digestión por microondas...	106
2. Optimización de las condiciones de neutralización	107
3. Optimización de las condiciones de cuantificación mediante potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro	109
3.1. Selección del TISAB	109
3.2. Curva de calibrado	111
3.3. Efecto del volumen de muestra en la cuantificación	112
4. Comparación con el método de digestión por fusión alcalina	113
5. Estabilidad de las muestras	114
6. Características analíticas	116
6.1. Límite de detección y límite de cuantificación	116

6.2. Exactitud.....	117
6.2.1. <i>Recuperación de patrones de fluoruro</i>	117
6.2.2. <i>Análisis de muestras de referencia</i>	118
6.2.3. <i>Recuperación de fluoruro en muestras de alimentos</i>	119
6.3. Precisión	121
Discusión.....	122
CAPÍTULO 2. CONTENIDO DE FLUORURO EN ALIMENTOS Y SU BIOACCESIBILIDAD	125
1. Contenidos de fluoruro en alimentos.....	128
1.1. Influencia de la liofilización sobre el contenido de fluoruro.....	128
1.2. Contenidos de fluoruro en alimentos consumidos en la Comunidad Valenciana	129
1.3. Alimentos cocinados procedentes de áreas con contaminación natural por fluoruro	134
1.4. Efecto del cocinado sobre la concentración de fluoruro en alimentos	137
2. Bioaccesibilidad de fluoruro desde alimentos.....	138
2.1. Características analíticas del método de digestión gastrointestinal	138
2.2. Bioaccesibilidad de fluoruro desde alimentos.....	141
Discusión.....	143
CAPÍTULO 3. FACTORES QUE AFECTAN A LA BIOACCESIBILIDAD DE FLUORURO	151
1. Influencia de la etapa digestiva sobre la bioaccesibilidad de fluoruro.....	154
2. Influencia del pH de la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de fluoruro.....	155

3. Influencia de la concentración de pepsina de la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de fluoruro	157
4. Efecto de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la bioaccesibilidad de fluoruro	158
5. Efecto de la concentración de sales biliares sobre la solubilización de fluoruro.....	161
Discusión.....	163
CAPÍTULO 4. ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL DEL FLUORURO	171
1. Evaluación de la viabilidad y la integridad de la monocapa celular Caco-2	174
2. Transporte, acumulación celular y coeficiente de permeabilidad en dirección apical-basolateral (A-B) y basolateral-apical (B-A).....	175
3. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de fluoruro.....	178
4. Efecto del pH sobre la permeabilidad y acumulación de fluoruro	182
5. Influencia de la temperatura sobre la permeabilidad y acumulación de fluoruro.....	184
6. Efecto de la presencia de Cl^- en el transporte y acumulación de fluoruro	185
7. Participación de un intercambiador F^-/OH^- en el transporte y acumulación de fluoruro.....	185
Discusión.....	187
CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MODELO CELULAR Y DE LOS FACTORES PRESENTES EN EL TRACTO INTESTINAL SOBRE LA ABSORCIÓN DEL FLUORURO	195
1. Resistencia eléctrica transepitelial (RET) y permeabilidad de LY en las monocapas celulares diferenciadas.....	198

2. Transporte y coeficiente de permeabilidad aparente del fluoruro en los distintos modelos celulares.....	200
3. Influencia del mucus secretado por la línea HT29-MTX en el transporte de fluoruro	202
4. Influencia del pH en el transporte de fluoruro.....	203
5. Influencia del ácido taurocólico en el transporte de fluoruro	204
6. Efecto de la matriz alimentaria en el transporte de fluoruro	208
Discusión.....	210
CAPÍTULO 6. ESTUDIOS SOBRE LOS EFECTOS <i>IN VITRO</i> DE LA EXPOSICIÓN A FLUORURO EN LA MONOCAPA EPITELIAL DEL INTESTINO	217
1. Efecto de la exposición sobre la diferenciación de las células Caco-2	221
2. Efecto de la exposición a fluoruro sobre la permeabilidad de las monocapas Caco-2	223
3. Respuesta inflamatoria de células Caco-2 expuestas a fluoruros	227
Discusión.....	229
CONCLUSIONES.....	237
BIBLIOGRAFÍA.....	243

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Concentraciones de fluoruro en varios grupos de alimentos.....	10
Tabla 2. Ingesta diaria de fluoruro recomendada para la prevención de caries dental.....	21

METODOLOGÍA

Tabla 1. Muestras incluidas en el grupo de alimentos “Pescados y derivados” del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana.	59
Tabla 2. Muestras de productos de la pesca preparadas por el Laboratorio de Contaminación Metálica.....	60
Tabla 3. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en el proceso de transcripción inversa.	92
Tabla 4. Condiciones de la PCR a tiempo real.....	94
Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos de citoquinas pro y antiinflamatorias empleados en qPCR.....	98
Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos de enzimas marcadores de diferenciación y proteínas de las uniones intercelulares empleados en qPCR	99

CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL FLUORURO EN ALIMENTOS

Tabla 1. Efecto de las condiciones de microondas (peso muestra y volumen de reactivos) sobre la cuantificación de fluoruro mediante ISE	109
Tabla 2. Comparación de las curvas de calibración obtenidas con patrones preparados en agua desionizada (serie A) y en blanco de digestión (serie B).....	112
Tabla 3. Efecto del volumen de la dilución en la cuantificación de fluoruro	113

Tabla 4. Concentraciones de fluoruro cuantificadas en las muestras digeridas por fusión alcalina y por horno de microondas.....	114
Tabla 5. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) de la metodología desarrollada para la cuantificación de fluoruro en alimentos	116
Tabla 6. Recuperación de fluoruro tras la digestión de patrones por horno microondas	118
Tabla 7. Concentraciones de fluoruro halladas en un material de referencia certificado y en una muestra de control interno	119
Tabla 8. Recuperación de fluoruro en productos de la pesca y productos vegetales tras la adición de distintas concentraciones de fluoruro	120
Tabla 9. Precisión del método.	121

CAPÍTULO 2. CONTENIDO DE FLUORURO EN ALIMENTOS Y SU BIOACCESIBILIDAD

Tabla 1. Rango de concentraciones de fluoruro, media y mediana en arroz y productos de la pesca.....	131
Tabla 2. Ingesta de fluoruro a través del consumo de productos de la pesca	133
Tabla 3. Concentraciones de fluoruro en alimentos recogidos en las escuelas de la provincia de chaco (Argentina).	135
Tabla 4. Ingesta media de fluoruro a través de los alimentos consumidos en el desayuno y en la comida para las diferentes localidades argentinas estudiadas	136
Tabla 5. Concentración de fluoruro en muestras de agua consumidas en las poblaciones argentinas objeto de estudio	137
Tabla 6. Precisión del método utilizado para evaluar la bioaccesibilidad de fluoruro desde productos de la pesca.....	140
Tabla 7. Concentración de fluoruro en la muestra y en la fracción bioaccesible y bioaccesibilidad en productos de la pesca liofilizados ...	142

Tabla 8. Concentración de fluoruro en la fracción bioaccesible y bioaccesibilidad de fluoruro en alimentos procedentes de las escuelas argentinas 143

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MODELO CELULAR Y DE LOS FACTORES PRESENTES EN EL TRACTO INTESTINAL SOBRE LA ABSORCIÓN DEL FLUORURO

Tabla 1. Coeficiente de permeabilidad aparente de fluoruro (20 µg/mL) en las distintas proporciones de Caco-2/HT29-MTX ensayadas 201

Tabla 2. Valores de RET al final del ensayo en las distintas monocapas celulares con o sin tratamiento con ácido taurocólico (TC, 20 mM).....205

Tabla 3. Valores de RET al inicio y final del ensayo tras 2 horas de exposición a un patrón de fluoruro (3 µg/mL) y a la fracción bioaccesible del arroz cocinado 210

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Ciclo del flúor y derivados en el medio ambiente.....	4
Figura 2. Formación de derivados fluorados y sus aplicaciones	6
Figura 3. Países con áreas con fluorosis endémica.....	22
Figura 4. Mecanismos celulares de toxicidad del fluoruro.....	26
Figura 5. Toxicocinética del fluoruro en adultos.....	28
Figura 6. Conversión de la hidroxiapatita en fluorapatita	29
Figura 7. Conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	35
Figura 8. Sistema de digestión <i>in vitro</i> SHIME	37
Figura 9. Sistema de digestión <i>in vitro</i> TIM.....	37
Figura 10. Estructura de la pared intestinal	41
Figura 11. Cripta del intestino delgado	42
Figura 12. Uniones intercelulares de las células epiteliales del intestino.	44
Figura 13. Técnicas <i>in vitro</i> para evaluar el transporte a través de membranas biológicas	45
Figura 14. Tipos de transporte a través del epitelio intestinal	48

METODOLOGÍA

Figura 1. Área de muestreo en la provincia de Chaco, Departamento Almirante Brown. Taco Pozo y comunidades aledañas	61
Figura 2. Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad de fluoruro mediante el método estático de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	66
Figura 3. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad y transporte	75
Figura 4. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas en sistemas Transwells [®] empleando un voltímetro Millicell [®] -ERS.....	76

CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLUORURO EN ALIMENTOS

- Figura 1. Efecto del reactivo oxidante empleado en la digestión por horno de microondas sobre la cuantificación de fluoruro mediante ISE 107
- Figura 2. Curva de calibrado de fluoruro obtenida con patrones preparados en TISAB II al 50% (v/v) y TISAB III al 10% (v/v)..... 111
- Figura 3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la concentración de fluoruro de la muestra de referencia certificada de té 115

CAPÍTULO 2. CONTENIDO DE FLUORURO EN ALIMENTOS Y SU BIOACCESIBILIDAD

- Figura 1. Influencia de la liofilización sobre el contenido de fluoruro .. 129
- Figura 2. Efecto del cocinado de cereales y legumbres en agua con 6 mg/L de fluoruro 138

CAPÍTULO 3. FACTORES QUE AFECTAN A LA BIOACCESIBILIDAD DEL FLUORURO

- Figura 1. Influencia de la etapa del proceso digestivo sobre el contenido de fluoruro solubilizado en muestras de pescados y crustáceos 155
- Figura 2. Influencia del pH sobre la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica desde pescados y crustáceos.....156
- Figura 3. Influencia de la concentración de pepsina sobre la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica en muestras de pescados y crustáceos.. 158
- Figura 4. Influencia de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la solubilización de fluoruro desde sardina 160
- Figura 5. Influencia de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la solubilización de fluoruro desde boquerón..... 161
- Figura 6. Influencia de la concentración de sales biliares (g de sales biliares/100 gramos de disolución) en la solubilización de fluoruro en muestras de quisquilla y sardina..... 163

CAPÍTULO 4. ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL DEL FLUORURO

Figura 1. Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de fluoruro (0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 4, 24, 48 y 72 horas	174
Figura 2. Transporte A-B en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$).....	176
Figura 3. Transporte B-A en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$).....	176
Figura 4. Transporte en sentido A-B y B-A tras exposición de células Caco-2 a distintas concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$)	177
Figura 5. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY (100 μM) en dirección A-B y B-A en células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento con EDTA	180
Figura 6. Valores de RET medidos a 15 y 60 minutos en células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento en ensayos de transporte en dirección A-B y B-A.....	180
Figura 7. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en dirección A-B y en dirección B-A en células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento con EDTA	181
Figura 8. Transporte de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 240 minutos en sentido A-B a diferentes pHs	182
Figura 9. Transporte de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 120 minutos en sentido B-A a diferentes pHs	183
Figura 10. Transporte A-B de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 120 minutos en distintas condiciones: sin precarga de KOH; tratamiento previo con KOH; tratamiento previo con KOH y co-exposición DIDS/fluoruro	186
Figura 11. Contenido intracelular de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos en distintas condiciones: sin precarga	

con KOH; tratamiento previo con KOH; tratamiento previo con KOH y
co-exposición DIDS/fluoruro 187

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL MODELO CELULAR Y DE LOS FACTORES PRESENTES EN EL TRACTO INTESTINAL SOBRE LA ABSORCIÓN DEL FLUORURO

Figura 1. Valores de RET en las diferentes proporciones de Caco-2/HT29-
MTX ensayadas. Valores expresados como $\text{Ohms} \times \text{cm}^2$ 199

Figura 2. Transporte de LY (100 μM) en las distintas monocapas Caco-
2/HT29-MTX ensayadas 200

Figura 3. Transporte de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo para
las distintas monocapas celulares Caco-2/HT29-MTX ensayadas 202

Figura 4. Transporte de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo, en
presencia o ausencia de mucus para la monocapa Caco-2/HT29-MTX
(50/50) 203

Figura 5. Transporte de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo a
diferentes pHs en la monocapa Caco-2/HT29-MTX (50/50) 204

Figura 6. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY (100 μM)
en las diferentes monocapas ensayadas en presencia o ausencia de ácido
taurólico (TC 20 mM) 206

Figura 7. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20
 $\mu\text{g/mL}$) en presencia o ausencia de ácido taurólico (TC 20 mM) 207

Figura 8. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20
 $\mu\text{g/mL}$) en células con o sin mucus tras la adición de ácido taurólico
(TC 20 mM) o sin tratamiento con TC 208

Figura 9. Porcentaje de fluoruro transportado en Caco-2 y Caco-2/HT29-
MTX (50/50) tras 2 horas de exposición a un patrón de fluoruro (3
 $\mu\text{g/mL}$) y a la fracción bioaccesible del arroz cocinado 209

CAPÍTULO 6. ESTUDIOS SOBRE LOS EFECTOS *IN VITRO* DE LA EXPOSICIÓN A FLUORURO EN LA MONOCAPA EPITELIAL DEL INTESTINO

Figura 1. Análisis de la integridad del RNA total extraído de células Caco-2 control y células Caco-2 expuestas a 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de fluoruro durante 24 horas	220
Figura 2. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de la fosfata alcalina intestinal (<i>ALPI</i>) en células Caco-2 control y tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) a los 14 y 18 días post-siembra	222
Figura 3. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de dipeptidilpeptidasa 4 (<i>DPP4</i>) en células Caco-2 control y tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) a los 14 y 18 días post-siembra	223
Figura 4. Variación de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de las células control y las células tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) con el tiempo	224
Figura 5. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY en células control y células tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 7 y 14 días	225
Figura 6: Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de proteínas de las uniones intercelulares en células Caco-2 tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 7 días	226
Figura 7. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de citoquinas en células Caco-2 tratadas con fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 y 48 horas	227
Figura 8. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de citoquinas en células Caco-2 tratadas con fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 14 días	228
Figura 9. Estructura de las uniones intercelulares.....	232

ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALPI	Fosfatasa alcalina intestinal
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
CLDN-1	Claudina-1
DIDS	Sal disódica de 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico
DPP4	Dipeptidilpeptidasa 4
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
dNTP	Deoxirribonucleótido trifosfato
DRA	Transportador regulado negativamente en el adenoma
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
E_r	Ratio de eliminación celular
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IL	Interleuquinas
IOM	Instituto de Medicina de las Academias Nacionales de Estados de Unidos
ISE	Electrodo de ión selectivo
JAM-1	Molécula de adhesión de la unión 1
LY	Lucifer yellow
MES	Ácido etanosulfónico 2-N-morfolino
NAC	N-acetilcisteína
OCLN	Ocludina
OMS	Organización Mundial de la Salud
P_{app}	Coefficiente de permeabilidad aparente

PBS	Tampón fosfato salino
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
RT	Transcripción inversa
SFB	Suero fetal bovino
SHIME	Simulador del ecosistema humano microbiano epitelial
TC	Acido taurocólico
TIM	Modelo intestinal de TNO
TISAB	Tampón de ajuste de la fuerza iónica
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
ZO-1	Proteína de la zonula occludens-1

INTRODUCCIÓN

1. Flúor y compuestos fluorados: características y usos

El flúor pertenece al grupo de los halógenos y a temperatura ambiente es un gas amarillo pálido, que se presenta en forma diatómica (F_2). Es el más electronegativo de todos los elementos de la tabla periódica (potencia estándar estimado +2.85 V), por ese motivo raramente se encuentra en la naturaleza en estado elemental. Es capaz de reaccionar a temperatura ambiente con todos los elementos excepto con el oxígeno y el nitrógeno, y reacciona vigorosamente con la mayoría de compuestos orgánicos. En disolución acuosa se encuentra en forma de ion fluoruro, el cual tiende a formar complejos con iones metálicos (FeF_6^{-3} , AlF_6^{-3} , MnF_5^{-2} , MnF_3^{-} , ZrF_6^{-2} y ThF_6^{-2}). Algunos fluoruros son insolubles o presentan una baja solubilidad, como es el caso de los fluoruros de litio, aluminio, estroncio, bario, plomo, magnesio, calcio y manganeso.

Los fluoruros son muy abundantes en la corteza terrestre (13ª posición). Su concentración media es de 625 mg/kg representando del 0.06% al 0.09% de la misma (OMS, 1994; Ozsvath, 2009; US EPA, 2010). Los contenidos de fluoruro oscilan entre 100 mg/kg en rocas calizas ultramáficas, 1000 mg/kg en rocas alcalinas ígneas y 1300 mg/kg en rocas marinas (Hem, 1985). Entre los minerales que presentan fluoruro en su composición química los más representativos son la fluorita (CaF_2), fluorapatita [$Ca_5(PO_4)_3F$], criolita (Na_3AlF_6), villiaumita (NaF), topacio [$Al_2(SiO_4)F_2$] y sellaita (MgF_2) (Nagendra Rao, 2003).

Los fenómenos geológicos naturales son los que más contribuyen a incrementar los contenidos de fluoruro en el medioambiente, siendo menos relevante el impacto de la actividad humana que se reduce a procesos industriales de ladrilleras, cerámica, fundición de aluminio, hierro y acero,

así como al uso de fertilizantes a base de fosfato (Cronin y col., 2000) (figura 1).

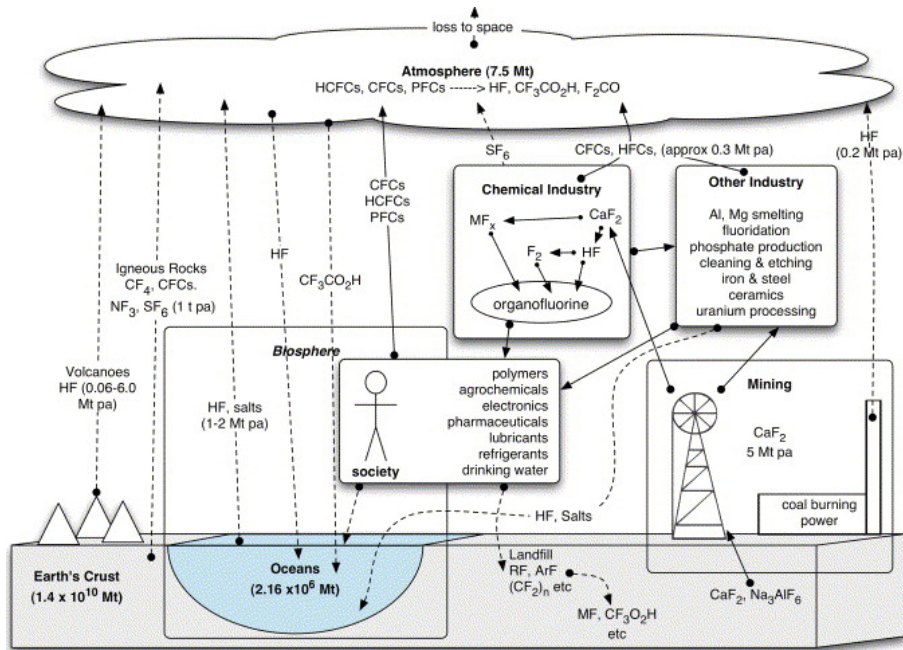


Figura 1. Ciclo del flúor y derivados en el medio ambiente (Crutzen, 2006).

La actividad volcánica es la principal fuente natural de fluoruro e incrementa notablemente el contenido en aire, suelos y aguas superficiales o subterráneas de zonas adyacentes (D'Alessandro, 2006). Entre los elementos eliminados en una erupción volcánica, el fluoruro está considerado el más crítico en cuanto a los efectos perjudiciales para la salud (EFSA, 2010). Este elemento aparece formando parte de cenizas y rocas volcánicas (D'Alessandro, 2006), así como en forma de gas, principalmente HF, que posteriormente se deposita en suelos como sales de NaF y KF cuya solubilidad en agua es elevada (EFSA, 2005). El episodio más reciente de

alerta ante los posibles riesgos de exposición a fluoruro como consecuencia de una erupción volcánica se produjo en abril del 2010 al entrar en erupción el volcán islandés Eyjafjallajökul (EFSA, 2010).

Las aplicaciones del flúor son numerosas (figura 2). El gas flúor se emplea en la producción de varios fluoruros inorgánicos. El más importante es el hexafluoruro de uranio (UF_6) que se utiliza para el enriquecimiento de uranio en la industria nuclear (IPCS, 1984). Otro producto del flúor gas es el hexafluoruro de azufre (SF_6), usado como gas dieléctrico para equipos eléctricos o electrónicos o como gas para trazar movimientos de gases o aire en edificios (IPCS, 1984). El fluoruro de hidrógeno se utiliza para manufacturar aluminio y para producir polímeros como el teflón y compuestos fluorocarburos (CFCs), los cuales se emplean como aerosoles, refrigerantes y solventes. Se emplea también para separar isótopos de uranio (ATSDR, 2003). Debido a su amplio uso, el HF posiblemente sea el principal contaminante fluorado presente en la atmósfera por causas antropogénicas, sin embargo es poco persistente ya que su elevada reactividad no le permite permanecer tiempo prolongado en su forma original.

Dentro de las sales que se generan a partir del fluoruro de hidrógeno, el fluoruro sódico (NaF) es la más importante. Esta sal fue el primer derivado empleado en la fluoración del agua de bebida. Además de NaF , en los sistemas de fluoración de aguas se usan otros derivados como el ácido fluorosilícico, subproducto en la fabricación de fertilizantes fosforados, y el hexafluorosilicato de sodio obtenido por neutralización alcalina de ácido fluorosilícico (Masten, 2001).

La aplicación de derivados de fluoruros a la medicina también está ampliamente extendida. Numerosos fármacos con fluoruros en su

composición se emplean como anestésicos, antibióticos, agentes anticancerígenos y antiinflamatorios (Strunecká y col., 2004). Asimismo, derivados sintéticos de fluoruros como el monofluorofosfato sódico (Na_2FPO_3) se emplean en la elaboración de pastas dentífricas, debido a su compatibilidad con los abrasivos empleados en este tipo de productos (EFSA, 2008).

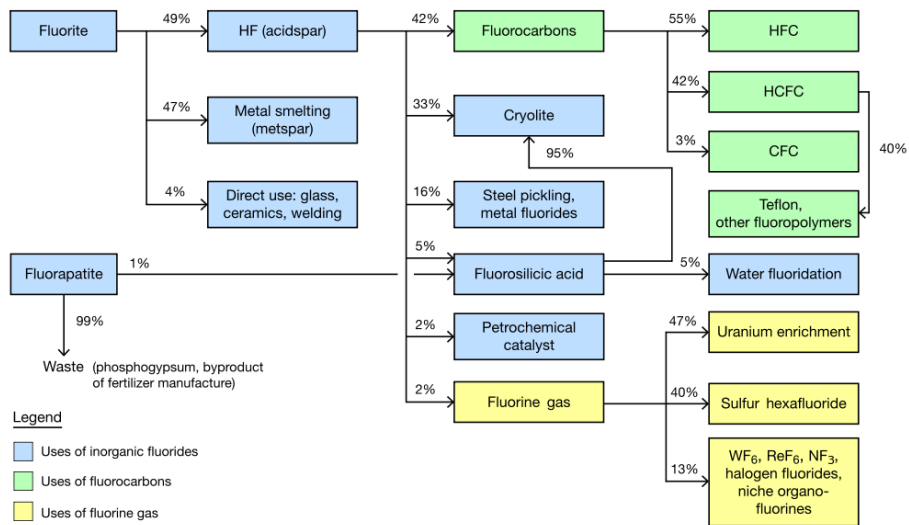


Figura 2. Formación de derivados fluorados y sus aplicaciones (http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_fluorine_economy.svg).

2. Exposición humana a fluoruro

La inhalación de fluoruro o el contacto por vía dérmica tienen, en circunstancias normales, una escasa contribución a la exposición humana a este elemento. La principal vía de entrada es la oral, a la que contribuye el agua, los alimentos, los cosméticos dentales y los suplementos fluorados. En este apartado de la tesis se comenta únicamente el impacto del agua y los alimentos en la exposición humana a fluoruro.

2.1. Agua

Las características geológicas, físicas y químicas de los terrenos son las que determinan los contenidos de fluoruro en las aguas subterráneas y superficiales de las que se abastece la población. El fluoruro está presente en el agua por causas de origen natural, principalmente por la disolución de rocas volcánicas ácidas. Una vez liberado el fluoruro, la presencia de elementos como calcio, aluminio y hierro, con los cuales suele formar complejos muy estables, condicionan su solubilidad (Cronin y col., 2000). Por ello, los elevados contenidos de fluoruro se asocian a menudo con aguas blandas, alcalinas y con deficiencia de calcio (Ozsvath, 2009).

Las aguas superficiales tienen generalmente contenidos de fluoruro inferiores a 0.5 mg/L (EFSA, 2005), si bien se han detectado valores muy superiores en ríos (3.5 mg/L; Moturi y col., 2002) y lagos (hasta 264 mg/L; Tekle-Haimanot y col., 2006; Wambu y Muthakia, 2011) de zonas como el Gran Valle del Rift. En las aguas subterráneas los contenidos son más variables y dependen de la porosidad y acidez del suelo y las rocas, de la temperatura y de la profundidad del pozo, entre otros factores (US EPA, 2010). En pozos privados de poblaciones rurales de Argentina, México,

Tailandia, Sri Lanka, India, China, Etiopía, Kenia, Sudáfrica y Tanzania se han descrito contenidos superiores a 8 mg/L de fluoruro (UNICEF, 1999; Fawell y col., 2006; US EPA, 2010).

Dado que el agua potable constituye la principal fuente de exposición humana a fluoruro, diversas organizaciones recomiendan contenidos máximos de este elemento. Así, la Comisión del Codex Alimentarius recomienda un máximo de 2 mg/L de fluoruro en el agua potable (Codex, 2008), mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) disminuye este valor a 1.5 mg/L (OMS, 2006). Este límite considera los efectos beneficiosos de protección contra la caries dental y los efectos indeseables de las exposiciones excesivas.

Como ocurre con muchos otros contaminantes ambientales, cada país establece unos contenidos máximos de fluoruro en el agua potable que pueden diferir de las recomendaciones dadas por los organismos internacionales. Así, por ejemplo la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) limita a un máximo de 4 mg/L el contenido de fluoruro (US EPA, 2009). Es destacable también la normativa de Argentina (CAA, 2012), que establece contenidos máximos en función de la temperatura promedio de la zona: 1.7 mg/L cuando la temperatura máxima del año es de 12 °C y 0.8 mg/L para una temperatura máxima de 32.6 °C. El factor temperatura también es contemplado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), si bien únicamente para aguas embotelladas y considerando la temperatura máxima diaria en el lugar de venta del producto al consumidor (2.4 mg/L para temperaturas inferiores a 12 °C y 1.4 mg/L para 32.5 °C) (FDA, 2012). Como último ejemplo de normativas con alguna especificidad destacable, en la India se establece para el agua potable límites máximos deseables (1.0 mg/L) y límites máximos

permisibles (1.5 mg/L), indicándose además que si el contenido es inferior a 0.6 mg/L el agua debe ser rechazada (BIS, 1991; Husain y col., 2012).

En España la legislación limita a 1.5 mg/L el contenido de fluoruro en agua de consumo humano (Real Decreto 140/2003), aguas de bebida envasada (Real Decreto 1799/2010) y aguas de manantial envasadas (Real Decreto 1798/2010), aumentando el límite máximo a 5 mg/L en aguas minerales envasadas (Real Decreto 1798/2010). Cabe destacar que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda que el agua mineral natural sea etiquetada como “*El producto no es idóneo para lactantes y niños menores de siete años de edad*” si contiene más de 1.5 mg/L de fluoruro (Codex, 1981), aspecto no contemplado por la legislación española.

Algunos países han decidido fluorar las aguas consumidas por la población con objeto de reducir la prevalencia y la severidad de la caries dental en los niños. La práctica se inició en EEUU en 1945 y actualmente existe controversia sobre la conveniencia de su aplicación. De hecho es una práctica habitual en América del Norte, donde el 43% de los canadienses y el 69% de los norteamericanos consumen agua fluorada (Health Canada, 2010; US EPA, 2010), mientras que es escasamente utilizada en Europa, donde sólo la consumen un 1.9% de la población. En España, algunas Comunidades Autónomas establecen normativas propias para la fluoración obligatoria de aquellas aguas de consumo que contengan menos de 0.7 mg/L. La fluoración se realiza hasta la concentración de 1 mg/L en Murcia (Decreto 86/1990) y Extremadura (Decreto 30/1989) y hasta 1.2 mg/L en el País Vasco (Decreto 49/1988) y Castilla-La Mancha (Decreto 57/1991). Las comunidades de Andalucía (Decreto 70/2009) y Galicia (Decreto 134/2012) han derogado recientemente sus Decretos sobre fluoración de agua potable de consumo público.

2.2. Alimentos

La mayor parte de los alimentos contienen fluoruro a nivel de trazas, por lo que contribuyen a la ingesta de este elemento. En los últimos años se han publicado extensas monografías sobre fluoruro que incluyen revisiones sobre alimentos. La tabla 1 muestra un resumen de los contenidos de fluoruro en distintos grupos de alimentos.

Grupo	Concentración de fluoruro
Cereales	0.01 – 0.72
Vegetales	0.01 – 1.34
Legumbres	0.49 – 0.57
Patatas	0.21 – 0.84
Frutas	0.01 – 0.36
Carne	0.01 – 1.70
Pescado	0.06 – 4.57
Leche y productos lácteos	0.02 – 0.80
Grasas y aceites	0.02 – 0.44
Bebidas	0.82 – 1.54

Tabla 1. Concentraciones de fluoruro en varios grupos de alimentos (mg/kg peso húmedo o mg/L). Fuentes: Taves, 1983; EFSA, 2005; Fawell y col., 2006; Usydus y col., 2008; Usydus y col., 2009; Health Canada, 2010; US EPA, 2010.

Los pescados y productos de la pesca son los alimentos que presentan las mayores concentraciones de fluoruro, habitualmente superiores a 1 mg/kg (USDA, 2004). Las altas concentraciones son un reflejo de los contenidos de este elemento en las aguas oceánicas, que pueden alcanzar los 13 mg/L (US EPA, 2010). El músculo de pescado y la piel presenta concentraciones similares de fluoruro (Dobaradaran y col., 2011), muy inferiores a las

existentes en el esqueleto óseo y el hígado (Malde y col., 1997; El-Sikaily y El-Said, 2010; Dobaradaran y col., 2011).

Las bebidas, especialmente el té, presentan también concentraciones de fluoruro elevadas. En las hojas de té las concentraciones varían en un amplio rango (0.37-1175 mg/kg) (Fung y col., 1999; Fawell y col., 2006) y están muy condicionadas por la variedad analizada. Así por ejemplo, el ladrillo de té en cuya elaboración se utilizan hojas de árboles viejos e incluso ramas y frutos, presenta concentraciones de fluoruro hasta 4 veces superiores a las de té elaborados a partir de hojas jóvenes (Fung y col., 1999). Al realizar la infusión del té, se solubiliza entre un 30% y un 80% del fluoruro existente en las hojas (Fung y col., 1999), por lo que se han cuantificado altas concentraciones de fluoruro en la bebida preparada (28.5 mg/L; Yi y Cao, 2008).

En ocasiones se han descrito concentraciones de este elemento que superan las habituales para un determinado grupo de alimentos. En conservas de pescados se han hallado altas concentraciones de fluoruro (12.6-28.8 mg/kg peso fresco; Usydus y col., 2008), al igual que en concentrados proteicos de pescado (370 mg/kg; Murray, 1986). Concentraciones de fluoruro superiores a las indicadas en la tabla 1 han sido halladas recientemente por El-Sikaily y El-Said (2010) en pescados de la costa mediterránea de Egipto (6.6–13.5 mg/kg peso fresco).

Dado la importancia de la ingesta de fluoruro por la población infantil, son numerosos los estudios que se centran en el análisis de este elemento en alimentos infantiles. En general, suelen presentar bajos contenidos, a excepción de algunos productos que contienen pollo en los que se han detectado altos niveles de fluoruro (0.62 a 10.6 mg/L) (Rao, 1984). También constituyen una excepción las fórmulas infantiles en base a proteínas de soja

cuyas concentraciones de fluoruro son superiores a las existentes en fórmulas infantiles lácteas (3.84 mg/kg frente a 0.84 mg/kg; Casarin y col., 2007).

La sal de mesa es un producto que en muchos países está fluorado, por lo que su aporte a la ingesta de este elemento debe ser considerado. En España, se autoriza la fluoración de la sal de mesa, que debe contener entre 90 y 225 mg/kg (Real Decreto 1424/1983).

Los datos sobre concentraciones de fluoruro en alimentos consumidos en España son muy escasos y únicamente se conoce la existencia de estudios en fórmulas infantiles, vinos, vinagres, cervezas y refrescos (Hidalgo de Cisneros y Pastor Sanchez, 1984; García y col., 1992; Martín Delgado y col., 1992, 1993; Moretó y Jaso-Margarit, 1993; Martínez y col., 1998). En estos trabajos, sólo alguna de las muestras de cerveza, refrescos y vinagre analizadas supera la concentración de 1 mg/L. La Base de Datos Española de Composición de Alimentos tampoco aporta datos sobre contenidos de este elemento (BEDCA, 2012).

Para el fluoruro, al igual que para otros nutrientes y contaminantes, las concentraciones en alimentos están influenciadas por la preparación de la muestra y el lugar de cultivo o producción de los alimentos. Así por ejemplo, si las muestras de vegetales y frutas proceden de explotaciones agrícolas o industrias alimentarias que utilizan pesticidas con fluoruros (criolita Na_3AlF_6 ; fluoruro de sulfurilo SO_2F_2), los alimentos presentan mayores contenidos de este elemento (US EPA, 2010). Con respecto a la preparación de la muestra, se ha descrito que en pescados, productos de la pesca y carnes, la inclusión de raspa o hueso en la muestra destinada al análisis, aumenta el contenido de fluoruro. También el uso de agua con fluoruro para el procesado y preparación de los alimentos incrementa el contenido de

fluoruro tanto en los alimentos preparados en el hogar como en las industrias. Este efecto es especialmente importante en la preparación de cereales y legumbres, bebidas a partir de concentrados, ya sean lácteos o frutas, infusiones y fórmulas infantiles (Burt, 1992; Casarin y col., 2007; Viswanathan y col., 2010).

3. Ingesta de fluoruro

Numerosos países han llevado a cabo estudios para evaluar la exposición a fluoruro, utilizando para ello distintos métodos: raciones duplicadas, cesta de la compra, dieta total, cuestionario de frecuencia de consumo y encuesta dietética.

Canadá dispone de datos de ingesta diaria en distintos grupos etarios para poblaciones que consumen agua fluorada y no fluorada, donde se considera el aporte de distintas fuentes (Health Canada, 2010). Los niños menores de 4 años presentan una ingesta que oscila entre 33 y 84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día. Los dentífricos suponen el mayor aporte, seguido del agua potable y de las bebidas. En los adultos, el mayor aporte a la ingesta total (26 y 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día) proviene de bebidas y alimentos.

El reciente documento de la EPA realiza una exhaustiva revisión de los estudios de ingesta realizados en Estado Unidos, valorando de forma muy detallada el aporte de cada una de las fuentes (US EPA, 2010). El informe reporta ingestas de 1.53 mg/día para niños de 1 a 4 años y de 2.83 mg/día para adultos. En este país, utilizando modelos matemáticos se ha estimado la exposición máxima en niños que consumen agua fluorada, la cual alcanzaría un máximo de 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día para niños de entre 3 y 5 años, y 210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día en niños de mayor edad.

El documento elaborado para la OMS por Fawell y col. (2006) aporta datos de ingesta para otros países (Australia, China, Hungría, India y Nueva Zelanda). La mayoría de estos estudios no consideran el aporte de los dentífricos. Las ingestas son claramente más elevadas en poblaciones que consumen agua contaminada, alcanzando 27 mg/día en poblaciones de la India.

En Europa, existen datos de ingesta para la población de Reino Unido (1.2 mg/día), Suecia (0.4-4.4 mg/día) y Alemania (0.1-0.6 mg/día) (EFSA, 2005; Fawell y col. 2006). No existen, sin embargo estudios que evalúen la ingesta de fluoruro de la población española.

4. Métodos analíticos para la determinación del fluoruro en alimentos

La determinación de fluoruro en alimentos requiere la puesta en disolución del elemento, por lo que los alimentos líquidos precisan, por lo general, de un menor tratamiento que los productos sólidos. En este apartado se comentan los métodos de digestión para la preparación de la muestra, los métodos de recuperación del fluoruro desde la muestra digerida y los métodos de cuantificación descritos en la bibliografía para el análisis de alimentos.

4.1. Métodos de digestión

Para la destrucción de la materia orgánica previa a la determinación de fluoruro se ha aplicado la mineralización por vía seca y la digestión por vía húmeda, tanto en sistemas cerrados como abiertos.

La vía seca ha sido el método de digestión más utilizado en alimentos (Malde y col., 1997; Fung y col., 1999; Jin y col., 2000; Kjelleevold Malde y col., 2001; Ponikvar y col., 2007; Koblar y col., 2012). A diferencia de los protocolos aplicados a otros elementos traza, el fluoruro requiere el uso de material específico, como los crisoles de níquel o platino, y de un proceso de fusión alcalina, preferentemente con NaOH, frente al medio ácido utilizado para otros elementos. En ocasiones se utilizan agentes coadyuvantes de la mineralización como Na_2CO_3 , NaB_4O_7 y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Se describen distintos ciclos de temperatura/tiempo para la digestión, pero la mayoría incluyen una etapa prolongada a baja temperatura (300 °C durante 16 horas) y un periodo corto a altas temperaturas (525-600 °C; 3-4 horas). Tras el proceso se obtiene un producto de fusión que se disuelve por calentamiento a 100 °C con agua y posteriormente se neutraliza con HCl. Una optimización del proceso de fusión alcalina para el análisis de alimentos se describe en el trabajo de Kjelleevold Malde y col. (2001).

La vía húmeda ha sido aplicada en un escaso número de investigaciones. En ellas se ha utilizado ácido nítrico concentrado para la digestión tanto en sistemas abiertos con calentamiento a 150 °C en placa calefactora (Paul, 2011), como en sistemas cerrados con calentamiento mediante horno microondas (Usydus y col., 2008).

4.2 Métodos de aislamiento del fluoruro

Algunos métodos utilizan una etapa de separación del fluoruro del resto de elementos presentes en el digerido de la muestra antes de la cuantificación. El proceso puede realizarse por destilación o difusión.

La destilación se basa en la conversión del fluoruro en ácido HF por adición de HClO_4 o H_2SO_4 , evitándose la codestilación de otros halógenos mediante la adición de perclorato de plata. En la mayoría de los casos la destilación se ha aplicado a muestras mineralizadas por vía seca, aunque también se ha usado en muestras digeridas por vía húmeda con H_2SO_4 y H_2O_2 (Li y Xu, 1999). La destilación presenta inconvenientes relacionados con el elevado tiempo requerido (25-30 minutos por muestra) que hace inviable su aplicación a un elevado número de muestras, y con el elevado volumen de destilado obtenido (Li y Xu, 1999). En los últimos años no se describe su aplicación a alimentos.

La difusión, por el contrario, es un método de aislamiento empleado frecuentemente a los alimentos ya sea en muestras digeridas o directamente en muestras sólidas (Taves, 1983; Hattab, 1988; Nedeljkovic y col., 1991; Villa y col., 2000; Casarin y col., 2007; de Almeida y col., 2007; Martínez-Mier y col., 2009; Oganessian y col., 2011). La muestra se coloca en una celda de microdifusión o en placas Petri y se le adiciona HClO_4 o HCl saturado con hexametildisiloxano. Se forma fluorosilanos o HF volátiles a temperatura ambiente que son absorbidos por una disolución de NaOH también colocada en el dispositivo de la celda de difusión, generándose cristales de NaF . La sal posteriormente se disocia en agua o en ácido acético, obteniéndose una disolución en la que el fluoruro suele ser cuantificado generalmente por potenciometría con electrodo selectivo.

4.3. Métodos de cuantificación

En la bibliografía se describen numerosos métodos para la determinación de fluoruro en muestras de agua y alimentos. Actualmente los de mayor aplicación son la potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro y la cromatografía iónica acoplada a conductimetría. No obstante, también se han utilizado en menor medida técnicas como la espectrometría de absorción molecular (Takatsu y col., 1984), espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente (Montes Bayón y col., 1999), espectrofotometría UV-vis (Bratovčić y col., 2009), así como electroforesis capilar y cromatografía de gases ambas acopladas a conductimetría (Louis y col., 1996; Kaniansky y col., 1999).

Potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro. Actualmente la potenciometría con electrodo selectivo es una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de fluoruro en todo tipo de muestras. Requiere instrumentación de bajo coste y su aplicación es sencilla, lo que unido a su especificidad y adecuadas características analíticas hacen que sea la metodología de elección para muchos laboratorios. El desarrollo de un electrodo selectivo de fluoruro por Frant y Ross en el año 1968, supuso uno de los mayores avances para la determinación de este elemento (Campbell, 1987).

Actualmente se utilizan electrodos de membrana con un cristal de fluoruro de lantano. En la disolución a analizar, el fluoruro debe estar en forma iónica, lo cual depende de la fuerza iónica y del pH del medio, así como de la presencia de sustancias que acomplejen el fluoruro. Por ello, es necesario adicionar a la muestra una disolución amortiguadora de la fuerza iónica total (TISAB siglas en inglés de “total ionic strength adjustment buffer”) que permite alcanzar un pH adecuado, ajustar la fuerza iónica total

del medio y eliminar la interferencia del ion hidroxilo y de ciertos cationes (Martín Delgado y col., 1993). El TISAB amortigua el pH alrededor de 5, valor que permite que el fluoruro se encuentre mayoritariamente en forma iónica. Contiene además sustancias que impiden la formación de complejos como el ácido ciclohexilamino-dinitrilotetraacético o el citrato, que liberan al fluoruro de su unión a cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y sobre todo Al^{+3} , los cuales actúan como interferentes. En la bibliografía se describe el empleo de distintos tipos de TISAB: TISAB-IV para muestras que contienen 100 mg/L de Fe y/o Al; TISAB-III y TISAB-II para muestras con <3 mg/L de Fe y/o Al; TISAB I para muestras con <0.1 mg/L de Fe y/o Al. La capacidad del TISAB para liberar el fluoruro depende de la composición de la muestra a analizar y debe ser optimizada para cada tipo de muestra. En general, para el análisis de alimentos se recomienda el uso de TISAB II o TISAB III.

El rango de linealidad de esta metodología es muy amplio, hasta cuatro órdenes de magnitud (0.01-100 mg/L). El límite de cuantificación suele situarse entre 0.02 y 0.1 mg/L, habiéndose descrito diferencias importantes en estos límites en función del electrodo utilizado (Kjellebold Malde y col., 2001). En los últimos años se han desarrollado sistemas de análisis por inyección secuencial o por inyección en flujo para la determinación potenciométrica de fluoruro en línea. Los límites de cuantificación, precisión y rango lineal son similares a los obtenidos con el sistema discontinuos, pero se reducen de forma importante el número de muestras analizadas por hora, así como el consumo de TISAB y el volumen de muestra necesario (Conceição y col., 2008). Estos sistemas en líneas aunque han sido aplicados a muestras de suero y orina (Itai y Tsunoda, 2001) y agua (Conceição y col., 2008), todavía no se han empleado para el análisis de alimentos.

En alimentos, la cuantificación mediante electrodo selectivo se ha utilizado para el análisis de fluoruro en infusiones de té (Erdemoğlu y col.,

2000) y de otras hierbas (Emekli-Alturfan y col., 2009), productos de la pesca (Malde y col., 1997; Kjellevoid Malde y col., 2001; Usydus y col., 2008), vegetales (Malde y col., 1997; Jin y col., 2000), carnes y cereales (Jin y col., 2000, Casarin y col., 2007; Viswanathan y col., 2010), así como alimentos infantiles (Casarin y col., 2007) y muestras de dieta (Ponikvar y col., 2007; Viswanathan y col., 2010; Oganessian y col., 2011). Esta metodología es aplicable a muestras mineralizadas por vía húmeda (Usydus y col., 2008), vía seca (Kjellevoid Malde y col., 2001) y a muestras en la que se ha realizado un proceso de destilación (Viswanathan y col., 2010) o difusión (Casarin y col., 2007) tras la mineralización.

Cromatografía iónica. La cromatografía iónica, acoplada en la mayoría de los casos a un detector de conductividad, permite la detección simultánea de iones inorgánicos (fluoruro, cloruro, bromuro, nitrato, sulfato, fosfato, etc) y desde su introducción en 1975 es una metodología frecuentemente utilizada para la cuantificación de fluoruro. En las columnas cromatográficas utilizadas en los inicios de esta metodología, la escasa interacción del fluoruro con la fase estacionaria hacía que este elemento eluyese muy cercano al frente de elución, con frecuentes solapamientos con los compuestos orgánicos no retenidos. La mejora de las columnas de intercambio aniónico (velocidad, capacidad y compatibilidad de disolventes) ha resuelto este problema y ha ampliado el campo de aplicación de esta metodología (López-Ruiz, 2000).

Su aplicación al análisis de fluoruro en muestras de aguas es muy frecuente y existen varios métodos oficiales basados en la cromatografía iónica (Jackson y col., 2001). Su uso en el análisis de alimentos es menor. Tal y como recoge el trabajo de revisión de Buldini y col. (1997), los alimentos analizados incluyen muestras líquidas (café, té, zumos, leche) y en

menor medida productos sólidos (frutas, carne, aceite, harina). Con posterioridad al trabajo de Buldini y col. (1997), la cromatografía iónica ha sido aplicada al análisis de fluoruro en algas (Gómez-Ordoñez y col., 2010) y setas (Isildak, 2009). La cromatografía iónica con detector de conductividad permite límites de cuantificación para el fluoruro en torno a 0.01 mg/L (Gómez-Ordoñez y col., 2010) similares a los descritos para la potenciometría con ion selectivo de fluoruro, si bien el rango de linealidad es menor al situarse la concentración más elevada en torno a 2 mg/L (Gómez-Ordoñez y col., 2010; Yiping y Caiyun, 2010). Recientemente, Isildak (2009) ha utilizado un detector potenciométrico acoplado a la cromatografía iónica consiguiendo para el fluoruro un rango de linealidad similar al del ion selectivo de fluoruro.

5. Efectos del fluoruro sobre la salud

El aporte de fluoruro se considera importante para la salud por su habilidad para inhibir la iniciación y progresión de la caries dental y para estimular la formación ósea (Ozsvath, 2009). Las dosis recomendadas para la prevención de caries varía según el grupo etario, tal y como refleja la tabla 2. Por este motivo, se emplean pastas dentríficas ricas en fluoruro (500-1500 mg/kg) y además en algunos países se fluoran las aguas de bebida. Sin embargo, un consumo de fluoruro superior a las ingestas recomendadas puede suponer el desarrollo de algún tipo de patología. Los estudios en animales de experimentación muestran efectos adversos sobre distintos órganos (hepatomegalias, nefrosis, mineralización miocárdial, efectos sobre la morfología y funcionamientos de los órganos reproductores; Fawell y col., 2006). Los estudios epidemiológicos, sin embargo, sólo muestran evidencias claras de que las exposiciones crónicas a fluoruro producen fluorosis dental

y, en menor medida, fluorosis esquelética (Fawell y col., 2006) y efectos sobre el desarrollo neuroconductual de la población infantil (Lu y col., 2000, Liu y col., 2008).

Edad	Ingesta de fluoruro (mg/día)
< 6 meses	0.01
7-12 meses	0.5
1-3 años	0.7
4-8 años	1
9-13 años	2
14-18 años	3
>19 años	4 (hombres) y 3 (mujeres)

Tabla 2. Ingesta diaria de fluoruro recomendada para la prevención de caries dental (IOM, 1997).

5.1. Fluorosis dental y esquelética

La fluorosis dental se define como una hipomineralización permanente que afecta la integridad de los dientes debido a la erosión producida en el esmalte. Se manifiesta con la aparición de manchas amarillas y/o marrones. La fluorosis esquelética se define como una hipermineralización ósea que provoca calcificaciones en ligamentos y cartílagos, así como un aumento de la densidad ósea fácilmente visible en la pelvis y la columna vertebral. Se produce una mayor rigidez de las articulaciones que puede causar deformaciones y fracturas óseas recurrentes (EFSA, 2005).

La incidencia de la fluorosis dental y/o esquelética depende principalmente de los contenidos de fluoruro en el agua de consumo. Existen algunas excepciones, como es el caso de algunas poblaciones asiáticas que

han desarrollado fluorosis debido al alto consumo de infusiones y/o bebidas a base de té, especialmente de té ladrillo (Yi y Cao, 2008). En zonas donde las aguas presentan concentraciones en torno a los 1 mg/L, la incidencia de la fluorosis dental es de un 1%. Este porcentaje se eleva a un 33% cuando se consume agua con 1.5 a 4.0 mg/L de fluoruro. A concentraciones superiores a 4.0 mg/L la incidencia aumenta y existe riesgo de padecer fluorosis esquelética (Ozsvath, 2009). La mayor prevalencia de fluorosis dental en la población infantil se atribuye a que los niños eliminan sólo un 10% del fluoruro ingerido mientras que la población adulta elimina aproximadamente el 50% (EFSA, 2005).

Actualmente se estima que alrededor de 200 millones de personas de 25 países presentan algún grado de fluorosis (Ayoob y Gupta, 2006). Las zonas más afectadas se muestran en la figura 3.



Figura 3. Países con áreas con fluorosis endémica (Ayoob y Gupta, 2006).

En la India, 15 de los 28 estados se han identificado como áreas que presentan fluorosis endémica (Susheela, 1993). En este país, se estima que 62 millones de habitantes, incluyendo 6 millones de niños menores de 14 años, presentan algún grado de fluorosis (Ayoob y Gupta, 2006; Rao y col., 2011). China, es otro de los países que presenta severos problemas de fluorosis. En la provincia de Shaanxi, un 53% de la población infantil entre 8-13 años presenta fluorosis dental, y un 15% de los individuos mayores de 16 años presentan fluorosis esquelética (Liu y col., 2010). Otro de los países con una alta prevalencia de fluorosis es México. Una de las zonas más afectadas es el estado de San Luis Potosí, donde la prevalencia de fluorosis dental es de un 98% en poblaciones con concentraciones de fluoruro en el agua de bebida superiores a 2 mg/L (Grimaldo y col., 1995). También se han descrito casos de fluorosis en el valle de Guadiana, cercano a la ciudad de Durango (Alarcón Herrera y col., 2001).

En España la región más afectada es la Comunidad Autónoma de Canarias. El informe sobre salud bucodental realizado por la Dirección General de Salud Pública del gobierno canario en 1998 puso de manifiesto una prevalencia media de fluorosis dental en la población de 12 años del 39%, si bien en algunas zonas la incidencia era muy superior (comarca de Icod, 76%; comarca de Gáldar, 71%; Las Palmas de Gran Canarias, 57%) (Gómez Santos, 2000).

5.2. Desarrollo embrionario y psicomotriz

El fluoruro atraviesa fácilmente la placenta por lo que llega al feto durante su desarrollo pudiendo producir efectos adversos (Fawell y col., 2006). Los estudios realizados en ratas embarazadas expuestas durante 5 semanas a altos contenidos de fluoruro en el agua, hasta 200 mg/L, han

evidenciado que afecta la supervivencia y el crecimiento de las crías (Messer y col., 1973). En estudios epidemiológicos realizados en Senegal se ha puesto de manifiesto que madres residentes en áreas con fluorosis dan a luz a niños de bajo peso (Diouf y col., 2012). Los fetos entre el cuarto y quinto mes de gestación presentan efectos negativos en el desarrollo óseo, y en aquellas mujeres que sufren abortos tras 5 a 8 meses de gestación, los fetos presentan baja densidad cerebral y neuronal (Du y col., 2008; Shalina y Vasil'eva, 2010).

Se ha encontrado una correlación positiva entre la prevalencia de niños con bajo coeficiente intelectual (IQ) y altas concentraciones de fluoruro en el agua de bebida consumida por las madres embarazadas (Alarcón Herrera y col., 2001; Ozsvath, 2009). También diversos estudios epidemiológicos realizados en el continente asiático indican claramente que niños entre 6 y 13 años residentes en zonas con fluorosis endémica presentaban un menor IQ y menor desarrollo general (Lu y col., 2000; Liu y col., 2008; Shivaprakash y col., 2011).

6. Mecanismos celulares de toxicidad del fluoruro

El fluoruro puede afectar numerosos procesos celulares como la expresión génica, ciclo celular, proliferación y migración, respiración, metabolismo, transporte de iones, secreción, endocitosis, apoptosis/necrosis y estado redox (figura 4; Barbier y col., 2010).

El fluoruro es un importante modulador de la expresión de genes implicados en procesos tales como apoptosis [sobrexpresión de Bad, disminución de caspasas (caspase-2, caspase-6), disminución de Bcl-2], fosforilación de aminoácidos, estrés oxidativo, ciclo celular, quimiotaxis,

glucólisis, inflamación (citoquinas proinflamatorias y algunos tipos de receptores) y transducción de señales (Agalakova y Gusev, 2012).

Se considera que uno de los mecanismos de acción más importantes del fluoruro es su capacidad de inhibir la actividad de diversos enzimas (Dousset y col., 1984; Da Motta y col., 1999; Vani y Redy, 2000; Reddy y col., 2009). Se sabe que metaloenzimas que contienen Mg^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Mo^{+4} o Ni^{+2} son inhibidos por el fluoruro al formar complejos con los metales (Pinkse y col., 1999; Mendoza-Schulz y col., 2009). Fluoruros como el magnésico, berílico o aluminico actúan como análogos de los fosfatos, inhibiendo las ATPasas tipo P (Cornellius y col., 2011).

Se ha puesto de manifiesto en animales de laboratorio expuestos a sales de fluoruro, que éstas afectan a enzimas de la ruta glicolítica y del ciclo de Krebs (Sherer y Suttie, 1970; Da Motta y col., 1999), interfiriendo en la respiración celular y la producción de ATP. Asimismo, se ha evidenciado que la exposición a fluoruro disminuye la actividad de la $Na^{+}-K^{+}$ ATPasa (Murphy y Hoover, 1992), afectando al potencial de membrana. También produce cambios en la actividad de enzimas responsables del equilibrio redox como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la glutatión transferasa (Bharti y Srivastava, 2009).

El estrés oxidativo es otro modo de acción del fluoruro ampliamente estudiado tanto *in vitro* empleando distintos tipos celulares, como *in vivo* en tejidos no calcificados de animales (hígado, cerebro, pulmones y testículos) y en poblaciones de áreas con fluorosis endémica (Barbier y col., 2010). Además de inhibir las enzimas con actividad antioxidante, el fluoruro puede generar radicales libres de oxígeno y nitrógeno, y disminuir los contenidos intracelulares de glutatión reducido (Shuhua y col., 2012). El aumento de la producción de radicales libres tras la exposición a fluoruro conlleva

peroxidación lipídica (Chlubeck, 2003), despolarización de la membrana mitocondrial y procesos de apoptosis (Lee y col., 2008). El tratamiento con compuestos con actividad antioxidante (selenio y vitamina E) evita la peroxidación lipídica y el daño celular causado por el fluoruro *in vivo* (Basha y Sujitha, 2011), lo que pone de manifiesto el importante papel del daño oxidativo en el mecanismo de toxicidad de este elemento.

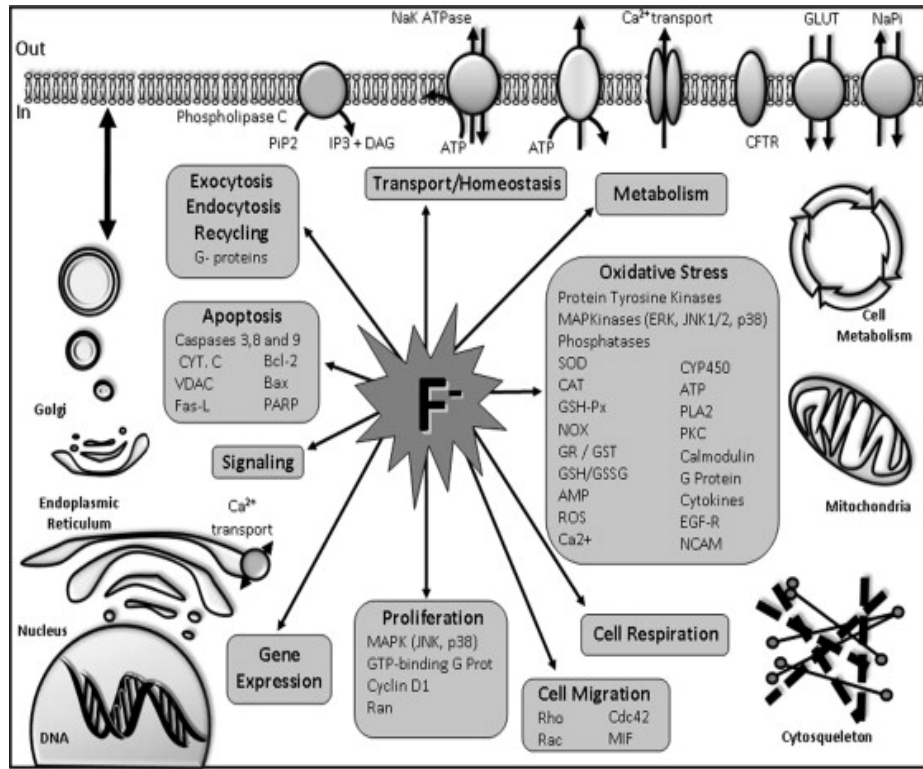


Figura 4. Mecanismos celulares de toxicidad del fluoruro (Barbier y col., 2010).

Es importante destacar también el efecto de las sales de fluoruro sobre la proliferación, la migración y el ciclo celular. Mendoza-Schulz y col. (2009) mostraron que las concentraciones de fluoruro habituales en áreas de fluorosis aumentan la migración de células tumorales y que, por tanto,

podrían estimular la invasión tumoral. También se ha puesto de manifiesto el arresto del ciclo celular en la fase S en diferentes tipos celulares (Wang y col., 2004; Zhang y col., 2008) y una reducción o aumento de la proliferación celular dependiendo de la dosis administrada (Thaweboon y col., 2003; Yan y col., 2007).

Los procesos celulares afectados por la exposición a fluoruro están implicados en una gran variedad de rutas de señalización y en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por tanto, su perturbación desencadena una serie de eventos que pueden dar lugar a las patologías asociadas con las exposiciones crónicas a este elemento descritas con anterioridad.

7. Toxicocinética

La figura 5 muestra la toxicocinética del fluoruro tras su ingesta en población adulta. Gran parte de los estudios se centran en el fluoruro sódico y el ácido fluorhídrico. Se considera que la mayoría de fluoruros se absorben rápidamente en una elevada proporción (70-90%) tras su ingesta a través del agua (Cerlewski, 1997; Wang y col., 2001a). Sin embargo, las formas menos solubles como el fluoruro cálcico o el fluoruro de magnesio, se absorben con menor eficacia (10%; Trautner y Einwag, 1989). Los datos existentes no indican diferencias en la absorción de este elemento entre los distintos grupos etarios (Ekstrand y col., 1994).

La absorción se produce principalmente en la parte proximal del intestino, aunque también se ha puesto de manifiesto una importante absorción a nivel gástrico (20%, Nopakun y col., 1989). Asimismo, se ha evidenciado en roedores que puede haber una absorción en la cavidad oral, que para el fluoruro sódico alcanza el 7% en las dos primeras horas (Patten y

col., 1978). La absorción de este elemento no parece regulada homeostáticamente (Whitford y Williams, 1986) ya que existe una correlación lineal entre la cantidad ingerida con el agua de bebida y la aparición de fluoruro en plasma. Los estudios *in vivo* muestran que tras la administración de fluoruro sódico, el pico en plasma se alcanza tras 30-60 minutos y su vida media oscila entre 2 y 9 horas.

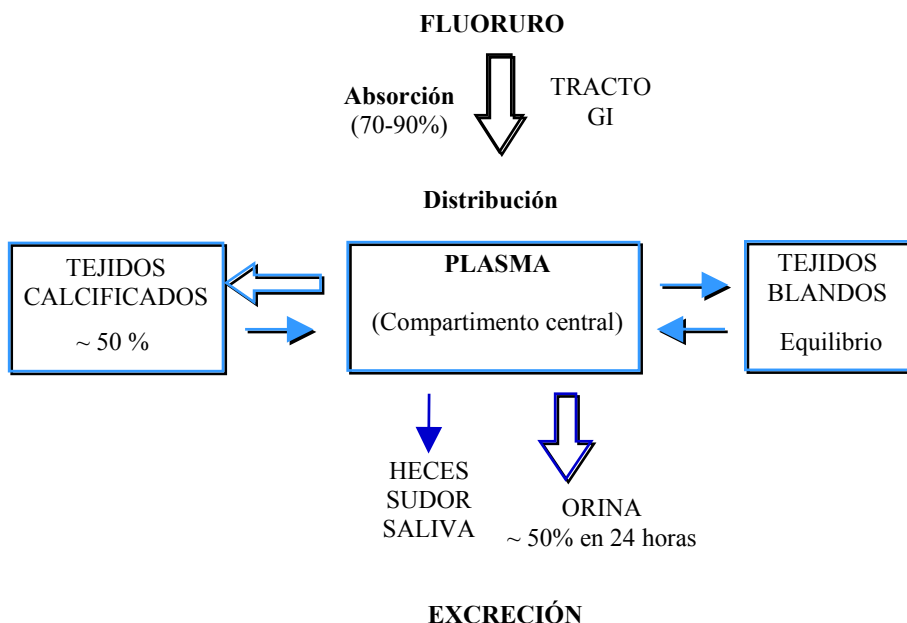


Figura 5. Toxicocinética del fluoruro en adultos.

El fluoruro presente en la circulación sistémica se distribuye a todos los tejidos y órganos, acumulándose principalmente en aquellos que están calcificados (dientes y huesos), donde se encuentra el 99% del fluoruro presente en el cuerpo (ATSDR, 2003). Entre los órganos no calcificados, la distribución depende de la irrigación sanguínea de los mismos, siendo mayor

en órganos con una mayor perfusión, como el hígado, pulmones o túbulo renales (IPCS, 1984). El fluoruro se incorpora a la estructura reticular cristalina de los dientes y del tejido esquelético reemplazando los iones hidroxilo de la hidroxiapatita, dando lugar a fluorapatita o fluorhidroxiapatita (OMS, 1994), tal y como se muestra en la figura 6. La acumulación de fluoruro en los tejidos calcificados es reversible. En poblaciones expuestas a través del agua de bebida o laboralmente, los niveles de fluoruro en hueso disminuyen tras eliminar la fuente de exposición (Grandjean y Thomsen, 1983). En estas poblaciones no obstante, la excreción urinaria de fluoruro se mantiene en niveles elevados mucho tiempo después de la eliminación de la fuente de exposición.

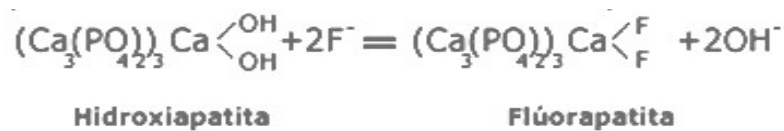


Figura 6. Conversión de la hidroxiapatita en fluorapatita.

El fluoruro que llega a la circulación sistémica desaparece del plasma por medio de dos mecanismos: retención en tejidos calcificados y excreción urinaria. En adultos los ratios de eliminación por ambos mecanismos son porcentualmente similares, si bien existen diferencias interindividuales. La retención de fluoruro en niños es, sin embargo, muy superior a la eliminación por orina, debido a la mayor estructura cristalina de los tejidos calcificados en desarrollo (Whitford, 1999).

El aclaramiento renal de fluoruro en adultos oscila entre 30 y 50 mL/min, muy superior al observado para el resto de haluros (cloruro, bromuro y

yoduro), cuyo eliminación no supera 1 mL/min. El porcentaje de fluoruro que puede reabsorberse desde los túbulos renales es muy variable (10-90%) y depende del pH del fluido tubular, del flujo y de la función renal (Whitford y col., 1976; Ekstrand y col., 1982). La eliminación urinaria se ve disminuida en ancianos (Jeandel y col., 1992), posiblemente por una reducción de los ratios de la filtración glomerular y del aclaramiento renal. Asimismo, se observa una reducción del fluoruro excretado en individuos con una función renal disminuida (Spencer y col., 1980a). Torra y col. (1998) observaron que los niveles de fluoruro en plasma de pacientes con insuficiencia renal sometidos a diálisis eran 3 veces superiores a los de adultos sanos.

8. Biomarcadores de exposición a fluoruro

Los biomarcadores se emplean en estudios poblacionales para identificar y monitorear la ingesta deficitaria o excesiva de fluoruro. La OMS clasifica los biomarcadores de exposición a fluoruro atendiendo al periodo de exposición que reflejan. Así, se definen biomarcadores actuales o contemporáneos (orina, plasma y saliva), recientes (uñas y pelo) o históricos (huesos y dientes) (OMS, 1994). Además de evaluar la magnitud de la exposición, algunos de ellos se han intentado correlacionar con los efectos adversos derivados de exposiciones crónicas (flurosis dental y esquelética) con el fin de determinar su idoneidad como indicadores del riesgo de padecer estas patologías o del grado de afección en individuos que ya las presentan.

Los biomarcadores contemporáneos no constituyen una medida directa de la acumulación corporal de fluoruro, ya que no existe una relación definida entre la concentración de fluoruro en el hueso y los fluidos extracelulares

(OMS, 1994). La orina es el biomarcador contemporáneo más empleado. Su obtención es fácil y el análisis del fluoruro mediante electrodo selectivo es sencillo ya que no requiere una etapa previa de tratamiento de la muestra. Existen muchos trabajos que apuntan a la idoneidad de este biomarcador para la evaluación de exposiciones actuales (Maguire y col., 2007; Villa y col., 2010). Los niveles urinarios de fluoruro son en general menores a 1 mg/L cuando el agua de consumo no contiene más de 1 mg/L de este elemento. En áreas con fluorosis endémica, se han reportado hasta 11 mg/L de fluoruro en la orina de poblaciones infantiles con retrasos en el desarrollo (Wang y col., 2007).

Los biomarcadores recientes reflejan exposiciones durante periodos relativamente largos de tiempo. Numerosos estudios han demostrado que las concentraciones de fluoruro en las uñas reflejan adecuadamente las exposiciones laborales y las debidas al consumo de agua de bebida y al uso de dentífricos (Whitford, 2005). También se han puesto de manifiesto correlaciones positivas de los contenidos de fluoruro en las uñas de los pies y manos con las ingestas estimadas a través de la dieta (Whitford y col., 1999; Levy y col., 2004). Los contenidos de fluoruro de la uñas reflejan una exposición que ha tenido lugar 3.5-4 meses antes de la toma de muestra (Whitford y col., 1999; Correa Rodrigues y col., 2004). Los valores reportados en poblaciones no expuestas oscilan entre 0.75 y 7.6 µg/g (Whitford y col., 1999). Estos valores aumentan considerablemente en individuos expuestos laboralmente (19-624 µg/g; Czamowski y Krechniak, 1990).

La evaluación de la idoneidad del pelo como biomarcador de la exposición reciente a fluoruro es más escasa. Se ha puesto de manifiesto una correlación directa entre los contenidos en el pelo y la ingesta de fluoruro, especialmente en población infantil (Mandinic y col., 2007), incluso se ha

visto una correlación con el nivel de fluorosis dental (Mandinic y col., 2010). Los contenidos reportados para poblaciones no expuestas varían ostensiblemente (<0.5-13.4 µg/g; Kono y col., 1993; Hać y col., 1997; Kokot y Drzewiecki, 2000). En individuos expuestos laboral o medioambientalmente, los niveles hallados en el pelo pueden llegar a alcanzar 5500 µg/g (Mandinic y col., 2007).

La principal desventaja del empleo de estos biomarcadores recientes radica en la preparación de la muestra y la determinación del fluoruro. Se requiere una etapa previa de limpieza para evitar las contaminaciones externas y una posterior extracción del fluoruro de la muestra sólida mediante técnicas, en muchos casos tediosas, como la difusión facilitada por hexametildisiloxano o la mineralización vía seca.

Los marcadores históricos reflejan la exposición crónica a fluoruro y son el mejor indicador de la carga corporal (OMS, 1994). El hueso ha sido el biomarcador más estudiado con ese fin, aunque existen una serie de factores que pueden afectar la concentración ósea de fluoruro. Así se ha puesto de manifiesto que esta concentración depende del tipo y parte del hueso, la edad y el sexo del individuo, su función renal y ratio de remodelación ósea y toda una serie de factores genéticos que dificultan el establecimiento de valores de referencia (Pessan y Buzalf, 2011). El principal problema del uso de este biomarcador es su difícil obtención, que requiere de técnicas invasivas de complicada ejecución como biopsias. En ese sentido, la recolección de esmalte o dentina del tercer molar, que normalmente se extrae, supone una ventaja para el uso del diente como biomarcador de exposiciones crónicas o acumulativas de fluoruro. Al igual que ocurre con el hueso, no existen valores de referencia establecidos.

9. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad

La evaluación del riesgo asociado a la ingesta de un compuesto se lleva a cabo en la mayoría de los casos determinando su contenido en el producto que se comercializa. Sin embargo, el alimento está sujeto a una serie de procesos que condicionan su llegada a la circulación sistémica. Es por ello que las etapas de digestión, absorción y metabolismo deben ser consideradas en la evaluación del riesgo/beneficio asociado a la ingesta de un compuesto. En los siguientes apartados se da una visión general sobre los acontecimientos que tienen lugar durante la digestión y absorción de un compuesto, la forma de evaluar estos procesos, los factores que los afectan y los escasos estudios existentes sobre el fluoruro en lo que a esta temática se refiere.

9.1. Definición de bioaccesibilidad y biodisponibilidad

El proceso digestivo consiste en una serie de etapas enzimáticas que producen la hidrólisis de los componentes mayoritarios del alimento (grasas, hidratos de carbono y proteínas) con la consiguiente liberación de numerosos nutrientes, pero también de contaminantes presente en la matriz. La bioaccesibilidad se define como la solubilización de un determinado compuesto de la matriz alimentaria durante el proceso de digestión gastrointestinal (Ng y col., 2009). La fracción solubilizada, denominada fracción bioaccesible (figura 7), está disponible para su absorción a través de la pared gástrica e intestinal y su posterior paso a la circulación sistémica, donde ejerce su efecto beneficioso o perjudicial. Este proceso de solubilización depende de numerosos factores que pueden disminuir o aumentar la bioaccesibilidad. Además de los factores intrínsecos, que varían dependiendo del individuo (pH, concentración de los enzimas digestivos,

tiempo de residencia), también hay factores externos, procedentes de la dieta, que pueden modificar la cantidad de fracción soluble tras la digestión (Oomen y col., 2002; Dean y Ma, 2007; Yu y col., 2010; He y Wang, 2011). La influencia de los factores anteriormente mencionados depende del compuesto y de la forma química en la que se encuentre.

El término biodisponibilidad recibe numerosas definiciones dependiendo del campo de aplicación (NCR, 2003). En nutrición o toxicología alimentaria puede definirse como la cantidad de un nutriente o contaminante alimentario que tras su solubilización durante la digestión gastrointestinal es absorbida a través del epitelio gastrointestinal y llega a la circulación sistémica (Ng y col., 2009). Esta fracción, llamada biodisponible (figura 7), puede diferir de la fracción bioaccesible, ya que el proceso de absorción es muy complejo y depende de muchos factores, que están principalmente gobernados por la naturaleza del compuesto y la composición del quimo, tal y como se comentará en el apartado de absorción intestinal (apartado 10).

En muchos casos, debido a la dificultad de llevar a cabo una aproximación adecuada de la etapa de la absorción intestinal, se considera sólo el parámetro de bioaccesibilidad, ya que éste da información sobre la cantidad máxima de un compuesto que puede llegar a la circulación sistémica, lo que se entiende por máxima biodisponibilidad oral (Torres Escribano y col., 2010).

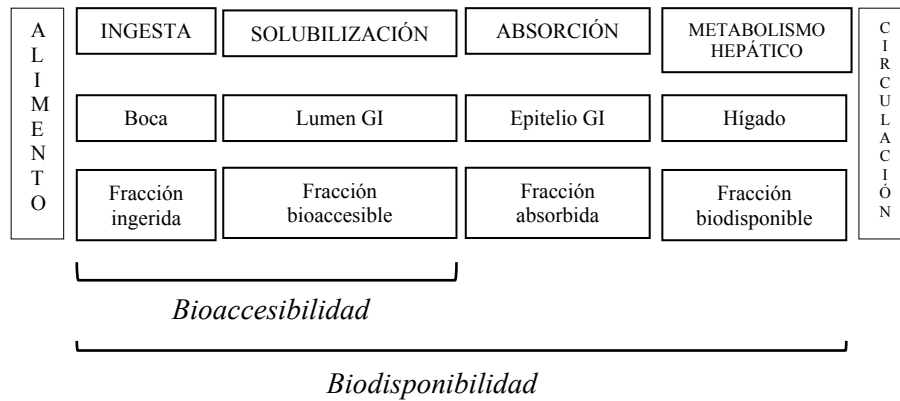


Figura 7. Conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

9.2. Modelos para la evaluación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad

Los estudios de biodisponibilidad *in vivo* se llevan a cabo principalmente en roedores, cerdos, primates y, cuando se trata de compuestos sin carácter tóxico, también se pueden realizar en humanos. Existen dos posibles aproximaciones, la evaluación de la aparición del compuesto en plasma a distintos tiempos o la cuantificación del compuesto en las excretas. Los resultados de los estudios en animales no son siempre extrapolables a humanos debido a las numerosas diferencias existentes en los procesos que afectan la llegada de un compuesto a la circulación sistémica (digestión, absorción y metabolismo presistémico).

Las aproximaciones *in vitro* son útiles para evaluar distintos aspectos propios del proceso o de la matriz alimentaria, ya que permiten llevar a cabo un gran número de ensayos, en un corto periodo de tiempo y no tienen connotaciones éticas. La combinación *in vitro* de una digestión

gastrointestinal simulada y de un modelo celular o tisular de epitelio intestinal para emular la absorción se ha evidenciado útil para predecir la biodisponibilidad *in vivo* de numerosos nutrientes. En este apartado se describen los métodos empleados para la evaluación de la bioaccesibilidad mediante modelos de digestión *in vitro*. Los métodos *in vitro* para el estudio de la absorción intestinal se detallarán más adelante (apartado 10.2).

Los sistemas *in vitro* para estudiar la bioaccesibilidad se pueden clasificar en dos grandes categorías, los dinámicos y los estáticos. Los sistemas dinámicos consisten en una serie de compartimentos donde se emulan las condiciones de cada una de las partes del sistema digestivo. Los dos sistemas dinámicos más empleados son el SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem, figura 8) y el TIM (TNO intestinal model; figura 9). Estos sistemas contemplan hasta cierto punto, los cambios fisiológicos que tiene lugar durante el proceso de digestión, mediante variaciones de pH y concentraciones enzimáticas, incluso con la simulación de los movimientos peristálticos, todo ello controlado mediante softwares informáticos. El SHIME y el TIM-2 además incluyen una etapa intestinal colónica donde se añade la microflora intestinal (Molly y col., 1994; Venema y col., 2000). Estos sistemas dinámicos emulan mejor las condiciones fisiológicas que los estáticos, sin embargo tiene una serie de desventajas, especialmente para el estudio de micronutrientes o elementos traza. Los volúmenes de trabajo son grandes, lo que supone un problema para la posterior detección del compuesto. Por otro lado, sólo están disponibles en determinados laboratorios y no es fácil su montaje y mantenimiento. Finalmente, debido a su complejidad, el número de muestras que se pueden evaluar en un corto espacio de tiempo es muy reducido.

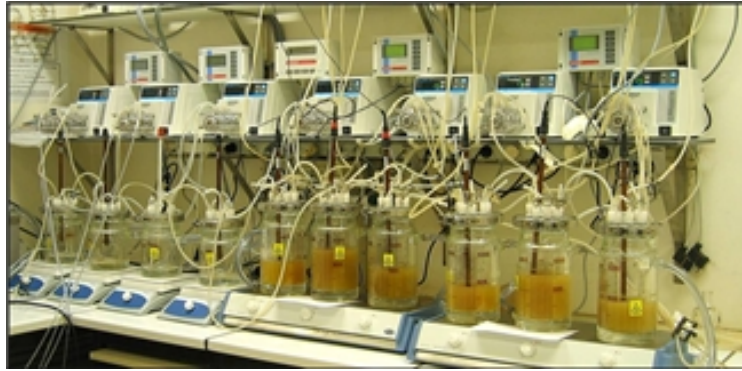


Figura 8. Sistema de digestión *in vitro* SHIME (<http://www.prodigest.eu>).



Figura 9. Sistema de digestión *in vitro* TIM (<http://www.tno.nl>).

Los modelos *in vitro* estáticos son los más empleados debido a su sencillez, disponibilidad y fácil manejo. En estos modelos, las etapas gástrica e intestinal se llevan a cabo en condiciones fijas de pH, concentraciones de enzimas y sales biliares, y tiempo de residencia. Los movimientos peristálticos se emulan por simple agitación. Aunque es una aproximación simplista, estos sistemas muestran para determinados compuestos una buena

correlación con los resultados obtenidos *in vivo* (Bruce y col., 2007). El principal inconveniente de este tipo de metodología es la falta de consenso en las condiciones de digestión utilizadas por los distintos grupos de investigación, hecho que ha dificultado el establecimiento de un método universal. Por otro lado, su aplicación requiere que para cada binomio alimento-compuesto se lleve a cabo una validación, que para ser más idónea debería conllevar la comparación con estudios *in vivo*.

Hay que destacar que la mayoría de nociones que se tiene sobre estas metodologías de bioaccesibilidad, en lo que a contaminantes se refiere, proceden del desarrollo y aplicación de las mismas en el análisis de suelos contaminados, donde incluso se han propuesto y aprobado métodos oficiales que forman parte de la evaluación de riesgos (US EPA, 2007a,b,c). Su aplicación a alimentos y especialmente a contaminantes es muy reciente y está muy poco extendida, al menos en lo que a los elementos traza se refiere.

9.3. Estudios sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del fluoruro

Como ya se ha comentado en el apartado de toxicocinética, los estudios sobre biodisponibilidad *in vivo* de fluoruro son escasos, y en la mayoría de los casos hacen referencia a dosis acuosas de estándares, principalmente de NaF. En estos estudios se ha puesto de manifiesto que existe una elevada biodisponibilidad del fluoruro presentes en disolución acuosa. El pH juega un papel importante, al menos a nivel gástrico, donde se favorece la absorción a medida que aumenta la acidez (Messer y Ophaug, 1993). Asimismo, se ha comprobado que la ingesta de fluoruro con alimentos afecta la biodisponibilidad. Shulman y Vallejo (1990) evalúan el efecto de los alimentos (plato de comida o leche) en 10 voluntarios sanos, expuestos a una disolución acuosa de NaF. El análisis del plasma muestra que la

biodisponibilidad de fluoruro se reduce un 13% en presencia de leche y hasta un 47% cuando se ingiere con un plato de comida. En este mismo estudio también se evidencia que la presencia de alimentos retrasa la aparición de fluoruro en sangre y disminuye el pico en suero. Arnold y col. (1989), sin embargo, muestran que la ingesta de fluoruro en tabletas con alimentos retrasa su llegada a la circulación sistémica, pero no reduce su biodisponibilidad final. Otros trabajos indican que la presencia de alimentos no afecta la cantidad absorbida, y que incluso la aumenta (Trautner y Einwag, 1989) como consecuencia posiblemente de un mayor tiempo de residencia del elemento en la parte proximal del intestino.

El único estudio *in vivo* sobre la biodisponibilidad del fluoruro presente en un alimento, en concreto en pescado seco, muestra que la biodisponibilidad relativa de este elemento es menor cuando forma parte del alimento que cuando se ingiere en disolución acuosa (Hattab, 1988). Los estudios *in vitro* sobre la bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad del fluoruro presente en los alimentos pueden permitir dilucidar el efecto de la matriz alimentaria en la cantidad final que llega a la circulación, así como los factores fisicoquímicos que la afectan. Sin embargo, no existen en la literatura trabajos al respecto.

10. Absorción intestinal

Los estudios sobre absorción intestinal como ya se ha comentado se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*. Esta última metodología se emplea cuando se quiere caracterizar este proceso, los mecanismos implicados y comprobar que factores pueden afectar al mismo. En este apartado se describe de forma detallada la pared intestinal, los procesos de transporte que en ella ocurren y se presentan los escasos datos existentes sobre los mecanismos implicados en la absorción de fluoruro. Asimismo, se muestran los modelos celulares que se emplean mayoritariamente para el estudio *in vitro* de la absorción intestinal y por tanto de la biodisponibilidad.

10.1. Estructura de la pared intestinal

La mayor parte de los procesos de absorción tienen lugar en el intestino delgado, en concreto en el duodeno y, en menor medida, en el yeyuno. La pared intestinal está formada por la mucosa, la submucosa, la pared muscular y la cavidad serosa (figura 10). La mucosa intestinal es la barrera protectora que separa los tejidos subyacentes del lumen, portador en ocasiones de sustancias tóxicas y microorganismos patógenos. Además interviene en los procesos de digestión y de absorción de nutrientes que tienen lugar a lo largo del tracto intestinal. La mucosa intestinal está formada por distintas capas celulares (epitelio, lámina propia y tejido muscular; figura 10), siendo la externa, la mucosa epitelial, la principal responsable de las funciones anteriormente descritas.

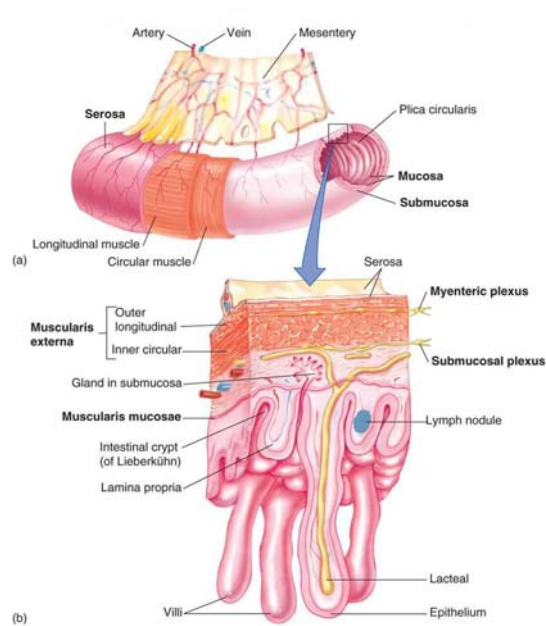


Figura 10. Estructura de la pared intestinal (http://humanphysiology2011.wikispaces.com/file/detail/layers_of_the_digestive_tract.jpg).

En el intestino delgado, el proceso de renovación celular es continuo. Las células en división se limitan a las criptas de Lieberkühn y la progenie de estas células migra bidireccionalmente (figura 11). Los precursores de la mayoría de células (absortivas, caliciformes y enteroendocrinas) migran desde el fondo de las criptas hacia la punta de las microvellosidades donde la división deja de progresar y todas las células están ya completamente diferenciadas. Este recorrido dura de tres a cinco días, después de lo cual las células se exfolian al lumen. El cuarto linaje, las células de Paneth, migra hacia abajo y reside en el fondo de las criptas alrededor de 20 días, hasta que son fagocitadas (Sancho y col., 2003; Crosnier y col., 2006).

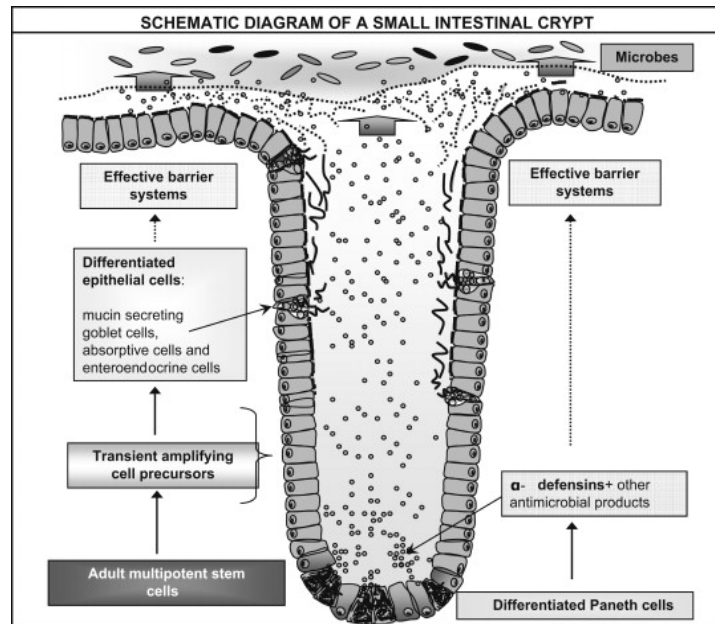


Figura 11. Cripta del intestino delgado (Koslowski y col., 2010).

Las células de absorción, también conocidas como células columnares o enterocitos, son el tipo celular mayoritario (80-90%). La membrana apical del enterocito presenta microvellosidades que forman un borde en cepillo, que aumentan aproximadamente 30 veces la superficie de absorción. El citoesqueleto de las microvellosidades está formado por filamentos de actina unidos entre sí mediante fimbrinas y villinas. Esta formación central se une lateralmente a la membrana adyacente mediante puentes miosina 1A:calmodulina (Brown y McKnight, 2010). La superficie de las microvellosidades presentan una capa de glicoproteínas denominada glicocalix, la cual contiene los transportadores intestinales y las enzimas digestivas (glicoamilasa, sacarasa, maltasa, isomaltasa, lactasa, trealasa, enteroquinasa y oligopeptidasas) que son especialmente importantes para las etapas finales de digestión de proteínas y azúcares.

El siguiente linaje celular por abundancia lo constituyen las células caliciformes. Su proporción aumenta caudalmente desde el duodeno (4%) al colon distal (16%). La morfología de estas células está determinada por la distensión de la teca que contiene los gránulos de mucina situados por debajo de la membrana apical. Las capas intestinales de mucus secretado por las células caliciformes son un compacto gel viscoso constituido principalmente por la mucina MUC2, que proporciona la primera línea de defensa contra los agentes endógenos y exógenos (Kim y Ho, 2010).

Las células epiteliales diferenciadas de la mucosa intestinal son células estructural y funcionalmente polarizadas. La polarización de estas células se garantiza por una red bien organizada de uniones intercelulares como las uniones estrechas, las uniones adherentes, las uniones GAP y los desmosomas, que separan el dominio apical del basolateral (figura 12). Las uniones estrechas forman una estructura continua en forma de cinturón en el lado luminal del espacio intercelular y mantienen las células estrechamente unidas, evitando la difusión paracelular (entre células) de microorganismos u otros antígenos. Se considera que gran parte de las propiedades barrera del epitelio intestinal se deben a las uniones estrechas, y que muchas de las patologías que causan aumentos de la permeabilidad y disminuciones de la función barrera son debidas a defectos en la estructura y/o función de estas uniones estrechas.

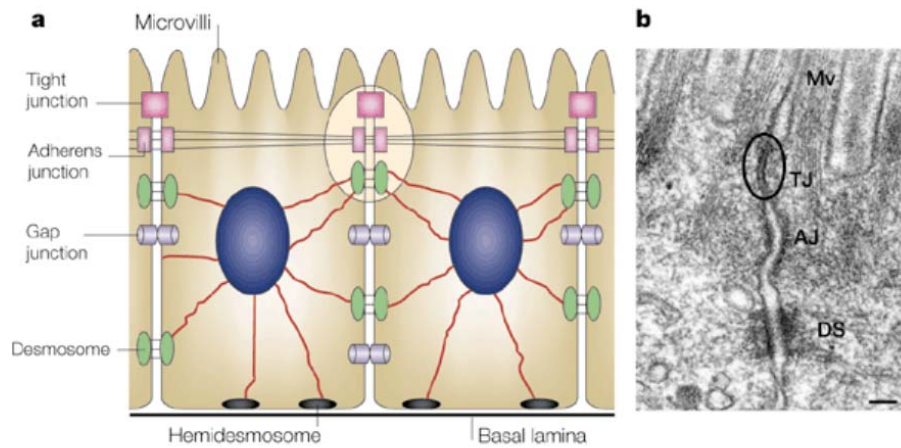


Figura 12. Uniones intercelulares de las células epiteliales del intestino (Tsukita y col., 2001).

10.2. Modelos *in vitro* para el estudio de la absorción intestinal

Existen numerosas aproximaciones *in vitro* para evaluar la permeabilidad o distribución de un compuesto en una membrana celular (figura 13). Entre ellas, las líneas celulares derivadas de cánceres colorrectales han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de la absorción de fármacos y nutrientes. Algunos de estos tipos celulares tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio diferenciado y mantienen a su vez, la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*.

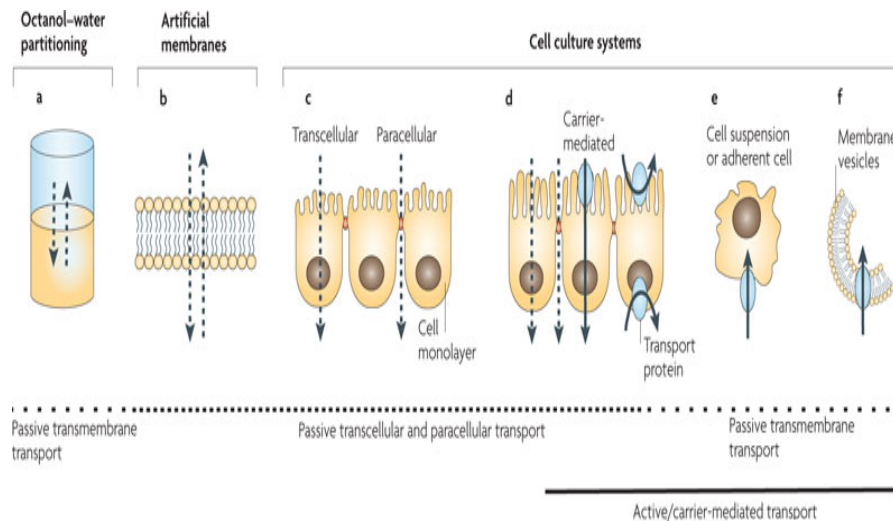


Figura 13. Técnicas *in vitro* para evaluar el transporte a través de membranas biológicas (Sugano y col., 2010).

La línea celular humana Caco-2, aislada originariamente de un adenocarcinoma de colon es, en la actualidad, la más utilizada en los estudios de absorción y en la evaluación de los factores intrínsecos y externos que pueden afectar a este proceso. En 1990, la línea celular Caco-2 se introdujo como una herramienta experimental para estudios sobre los mecanismos de transporte intestinal y un año más tarde, se sugirió que el modelo era adecuado para el monitoreo de la permeabilidad intestinal de fármacos y para la predicción de la absorción oral de los mismos (Tavelin, 2003).

Esta línea celular se diferencia en cultivo dando lugar a una monocapa celular bien polarizada con las características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros (Hidalgo y col., 1989). Evaluaciones realizadas por distintos laboratorios ponen de manifiesto que presentan una expresión de transportadores similar desde el punto de vista cualitativo a la del intestino

delgado (Maubon y col., 2007). Sin embargo, las monocapas epiteliales formadas por las células Caco-2 presentan características que, dependiendo de la naturaleza del compuesto, pueden ser un inconveniente a la hora de estudiar su permeabilidad. En primer lugar, las uniones intercelulares son muy estrechas en relación con las presentes en el intestino delgado, lo que es una desventaja para los compuestos que se mueven a través de estas uniones (vía paracelular). En segundo lugar, a diferencia de lo que ocurre en el intestino humano, la monocapa no está recubierta de mucus, de cuya secreción se encargan otras células presentes en el intestino, las células caliciformes.

Una forma de resolver parcialmente esta situación es mediante la inclusión en los cultivos de Caco-2 de otra línea celular humana, HT29-MTX. La línea celular HT-29, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano, fue establecida en 1975 (Fogh y Trempe, 1975). La línea HT29-MTX es un clon de la línea parental HT-29, la cual presenta un fenotipo secretor de mucus, obtenido por selección con 10^{-7} - 10^{-6} M de metotrexato en tratamientos sucesivos (Lesuffleur y col., 1990). Estas células activan espontáneamente, durante el crecimiento a post-confluencia, un programa de diferenciación caracterizado por el establecimiento de contactos de adhesión, la formación de una monocapa de células mucosecretoras polarizadas con un núcleo basal, numerosas vacuolas de mucus acumuladas en el citoplasma de la región apical de las células y algunas microvellosidades apicales que no llegan a formar un borde en cepillo maduro. La combinación de estas células con la línea celular Caco-2 aumenta el espacio entre las uniones intercelulares y produce una monocapa epitelial con un capa de mucus superficial (Hilgendorf y col., 2000; Artursson y col, 2001).

10.3. Mecanismos de transporte intestinal

La absorción a través del epitelio intestinal puede producirse por distintos mecanismos de transporte que dependen principalmente de la naturaleza del compuesto (coeficiente de partición, peso, radio molecular, pK_a , solubilidad, estabilidad química y distribución de cargas). Se puede distinguir el transporte a través de las uniones intercelulares (paracelular) o el transporte a través de la célula (transcelular). El transporte paracelular se produce por simple difusión, mientras que en el transcelular pueden intervenir distintos mecanismos (difusión pasiva o transporte mediado por portador) (figura 14).

Los compuestos hidrofílicos de bajo a moderado peso molecular pueden permear el intestino a través de los poros entre células. Aunque se considera un proceso pasivo parece existir una cierta selectividad, ya que los cationes se mueven a través de esta vía con mayor facilidad que los aniones y las moléculas neutras (Adson y col., 1994). Las moléculas lipofílicas de tamaño moderado se transportan normalmente por la vía transcelular pasiva. En general se cree que la membrana apical tiene una permeabilidad más baja que la membrana basolateral y por tanto, se considera que la membrana apical es la limitante del transporte transcelular pasivo (Tavelin, 2003). Como la bicapa lipídica de una membrana no tiene sitios de unión específicos, el transporte transcelular pasivo generalmente no es saturable, no está sujeto a la inhibición y no presenta esteroespecificidad (Sugano y col., 2010).

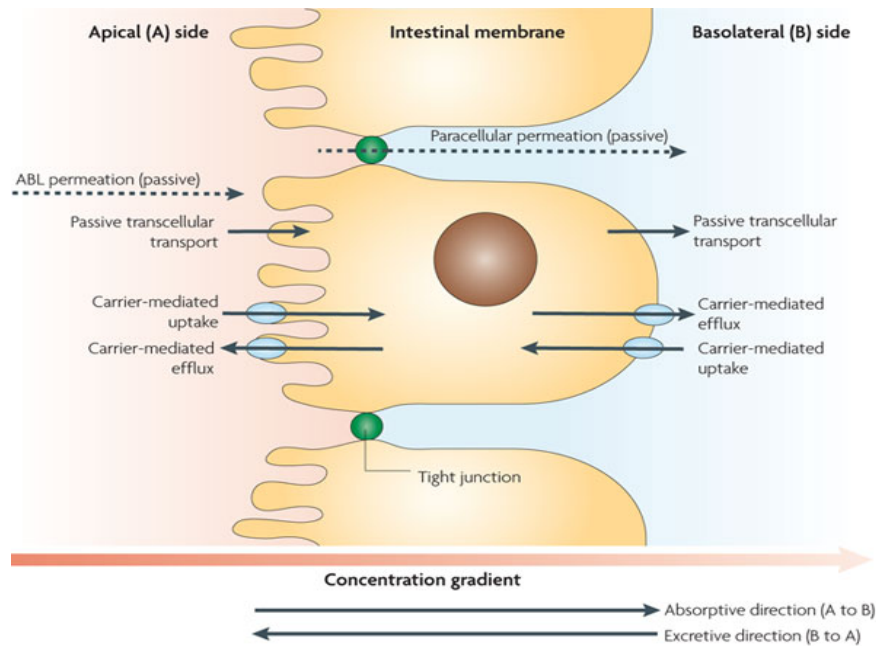


Figura 14. Tipos de transporte a través del epitelio intestinal (Sugano y col., 2010).

En el transporte transcelular también hay mecanismos que requieren de la participación de proteínas presentes en la membrana plasmática, son los transportes mediados por un portador. Hay más de 400 transportadores de membrana que pertenecen a dos grandes familias: los casetes de unión al ATP (ABC) y los portadores de solutos (SLC) (Sugano y col., 2010). Si el proceso de transporte consume energía directa o indirectamente, se dice que es activo y puede no requerir un gradiente de concentración. La superfamilia de transportadores ABC requiere la unión y la hidrólisis de ATP para funcionar y para mediar el proceso de transporte activo primario. Por otro lado, muchos transportadores de la superfamilia de SLC son impulsados por gradientes iónicos creados por transportadores primarios dependientes de

ATP (Fredriksson y col., 2008; He y col., 2009). Estos transportadores se dice que median el transporte activo secundario. Cuando el transporte mediado por portador no requiere energía, se define como un proceso de transporte facilitado y se basa en un gradiente de concentración del sustrato. A diferencia del transporte transcelular pasivo, el proceso mediado por portador es saturable.

El transporte de un determinado compuesto suele ser un proceso complejo en el que simultáneamente pueden intervenir varios mecanismos. Su estudio es una pieza clave en la evaluación de los procesos absorbivos, que finalmente permite un mejor diseño de fármacos o alimentos enriquecidos, así como una mejor evaluación de la exposición y los efectos tóxicos ejercidos por un contaminante alimentario.

10.4. Evaluación de los mecanismos de absorción intestinal del fluoruro

Se considera que el transporte de fluoruro a través de las membranas biológicas se produce principalmente por difusión de la forma no dissociada HF. Los estudios clásicos con bicapas lipídicas artificiales y electrodos de pH indican que el HF es un soluto altamente permeable con un coeficiente de permeabilidad similar al del agua. La permeabilidad de esta forma no iónica es cinco a siete órdenes de magnitud superior a la permeabilidad de la forma dissociada (Gutknecht y Walter, 1981).

Los escasos estudios sobre mecanismos de transporte intestinal de fluoruro se han realizado empleando diferentes modelos animales (roedores, intestino evertido de rata, vesículas de la membrana en borde de cepillo de conejos) y muestran datos en ocasiones contradictorios. La mayoría de estudios indican que la absorción intestinal de fluoruro es por simple difusión pasiva, aunque Parkins y col. (1966) empleando distintas regiones

de intestino evertido de rata muestran la participación de un componente activo en el yeyuno e íleo. También se ha sugerido que el fluoruro puede emplear los mismos mecanismos de transporte que el cloruro, incluso se ha puesto de manifiesto *in vitro* una reducción del transporte de cloruro en presencia de fluoruro (Dalmark, 1976; Simchowit, 1988).

He y col. (1998) en un estudio empleando vesículas intestinales de conejo concluyen que el transporte de fluoruro puede estar mediado por un co-transportador F^-/H^+ o un intercambiador F^-/OH^- , mostrando la dependencia del pH. La posible participación de un transporte dependiente de pH se ha puesto de manifiesto *in situ* a nivel gástrico en estudios con ratas (Whitford y Pashley, 1984). Sin embargo, otros estudios *in vitro* empleando segmentos intestinales en una cámara Ussing, evidencian que la absorción intestinal está mediada por un transporte que no depende del pH (Nopakun y Messer, 1990). La falta de consenso sobre las características del transporte de fluoruro puede deberse en parte al uso de diferentes modelos animales y distintas condiciones de transporte. Ninguno de los estudios realizados sobre mecanismos de transporte intestinal ha empleado un modelo de epitelio intestinal humano. Por otro lado, hasta el momento sólo se han estudiado algunas características del transporte de fluoruro, pero no se ha conseguido identificar posibles transportadores implicados en la absorción intestinal de este elemento traza.

OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis doctoral es la evaluación de los contenidos de fluoruro de los alimentos, su bioaccesibilidad y su absorción por el epitelio intestinal, así como los efectos que este elemento puede ejercer a su paso por el tracto intestinal.

Para llevar a cabo este objetivo general se han planteando los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de fluoruro en alimentos.
 - 1.1. Desarrollo de una metodología rápida por vía húmeda para la determinación de fluoruro en productos alimentarios.
 - 1.2. Determinación del contenido en fluoruro de alimentos procedentes de zonas sin problemas de contaminación por fluoruro y de zonas con fluorosis endémica.
2. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de fluoruro desde los alimentos.
 - 2.1. Evaluación de la bioaccesibilidad del fluoruro empleando un modelo estático de digestión gastrointestinal.
 - 2.2. Estudio de los factores que afectan la bioaccesibilidad de fluoruro en las etapas gástrica e intestinal.
3. Estudios *in vitro* de la absorción intestinal de fluoruro.
 - 3.1. Evaluación del transporte y la retención celular de fluoruro por la línea celular Caco-2 y caracterización de los mecanismos implicados.
 - 3.2. Evaluación de la influencia del modelo celular y de los factores presentes en el tracto intestinal sobre la absorción del fluoruro.
4. Estudios *in vitro* de los efectos de la exposición a fluoruro sobre el epitelio intestinal empleando células Caco-2 como modelo.

- 4.1. Efectos sobre el proceso de diferenciación celular de exposiciones de fluoruro repetidas en el tiempo.
- 4.2. Efectos sobre las uniones intercelulares y la permeabilidad paracelular de exposiciones de fluoruro repetidas en el tiempo.
- 4.3. Respuesta inflamatoria de las células Caco-2 expuestas a fluoruro en exposiciones cortas o repetidas en el tiempo.

METODOLOGÍA

1. Determinación de fluoruro y su bioaccesibilidad en alimentos

Todos los reactivos utilizados en este apartado de la tesis han sido de calidad para análisis o superior. El material de vidrio y polietileno utilizado se sumergió en HNO₃ 10% (v/v) (Merck, España) durante una semana antes de usarlo por primera vez. Tras su uso en el método analítico se enjuagó con agua, se sumergió en HNO₃ 10% (v/v) durante 24 horas y se enjuagó tres veces con agua desionizada. Para la preparación de las disoluciones, se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm) obtenida con un equipo Milli-Q water system (Millipore Inc., Millipore Ibérica, España).

1.1. Muestras para el estudio de contenidos de fluoruro en alimentos y su bioaccesibilidad

La concentración de fluoruro en alimentos y su bioaccesibilidad ha sido estudiada en distintos grupos de muestras. El primero de ellos está constituido por productos alimentarios pertenecientes a un estudio de Dieta Total realizado en la Comunidad Valenciana. El segundo grupo está integrado por productos de la pesca y cereales adquiridos en la ciudad de Valencia y alrededores, y preparados por el Laboratorio de Contaminación Metálica. El tercer grupo lo conforman raciones duplicadas de alimentos consumidos en escuelas de poblaciones argentinas residentes en áreas con aguas contaminadas con fluoruro.

1.1.1. Muestras del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana

En el periodo 2009-2010, la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana llevó a cabo un proyecto de Dieta Total para la evaluación de la exposición a contaminantes químicos. En este estudio se

muestrearon 18 localidades de la Comunidad Valenciana seleccionadas en base al criterio de población (superior a 25000 habitantes). Se incluyeron también dos municipios de menor población, Utiel y Segorbe, que por su localización se consideran representantes de un área geográfica. Los alimentos se compraron en los centros más representativos de cada uno de los municipios, tanto mercados centrales como cadenas de alimentación.

Los alimentos se dividieron en 12 grupos (carne; pescados y derivados; verduras, hortalizas y frutas; cereales, leguminosas y tubérculos; leche y productos lácteos; huevos; aceites y grasas; bebidas alcohólicas; bebidas no alcohólicas; edulcorantes, condimentos y especias; productos y platos preparados; estimulantes). Cada grupo incluía alimentos individuales (por ejemplo patata, mejillones) o agrupaciones de alimentos (por ejemplo zanahoria-calabaza y sardina-boquerón). Estas agrupaciones se realizaron por similitud de productos y de consumo. Para la elaboración de las muestras se eliminaron las partes no comestibles de los alimentos frescos. Posteriormente se liofilizaron y almacenaron en refrigeración hasta su análisis. No se cocinó ninguno de los alimentos.

En la presente tesis se seleccionaron muestras de aquellos grupos que según datos bibliográficos podrían contener mayores concentraciones de fluoruro (pescados y derivados; verduras, hortalizas y frutas; cereales, leguminosas y tubérculos). Se analizaron todas las muestras incluidas en el grupo de pescados y derivados (tabla 1). En el grupo de verduras, hortalizas y frutas, se analizaron muestras de zanahoria-calabaza, patata, judía verde, manzana-pera y plátano. En el grupo de cereales, leguminosas y tubérculos se analizaron muestras de patata y arroz.

Pescados	Mariscos
Sardina y boquerón	Mejillones
Dorada y lubina	Calamar y sepia
Pescado blanco	Gamba, cigala y langostino
Bonito y atún	
Emperador y pez espada	
Salmón y trucha	
Salazones de pescado	
Pescado ahumado	

Tabla 1. Muestras incluidas en el grupo de alimentos “Pescados y derivados” del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana.

1.1.2. Muestras de productos de la pesca y cereales preparadas por el Laboratorio de Contaminación Metálica

Los productos de la pesca adquiridos en comercios de la ciudad de Valencia se indican en la tabla 2. En estas muestras se eliminaron las partes no comestibles, a excepción de las quisquillas y el pejerrey que se consumen enteros. Posteriormente se cocinaron emulando la forma de consumo habitual por parte de la población española, sin utilizar ingredientes adicionales. Finalmente fueron trituradas, homogeneizadas y congeladas hasta su análisis.

Muestra	Tratamiento
Pescados	
Boquerón	Eliminación de cabeza y vísceras. Asado en sartén
Sardina	Eliminación de cabeza y vísceras. Asado en sartén
Pejerrey	Asado en sartén
Crustáceos	
Quisquilla	Asado en sartén
Gambas	Eliminación de exoesqueleto y hepatopáncreas Cocción

Tabla 2. Muestras de productos de la pesca preparadas por el Laboratorio de Contaminación Metálica.

Por lo que respecta a las muestras de cereales (alubias, arroz y pasta), éstas se destinaron a la evaluación del efecto del cocinado con agua contaminada con fluoruro. Una porción se empleó para el análisis de fluoruro en el producto crudo. Otra porción fue cocinada mediante un proceso de cocción en agua con 6 mg/L de fluoruro. La cocción se llevó a cabo siguiendo los procedimientos habitualmente utilizados por la población. La pasta se hirvió durante 10 minutos y el arroz se coció hasta evaporación total del agua. Las alubias se mantuvieron en remojo durante toda la noche y posteriormente se cocieron durante 3 horas. Los alimentos cocinados y una porción de las alubias en remojo, se trituraron y almacenaron en congelación hasta su análisis.

1.1.3. Muestras de raciones duplicadas de alimentos consumidos en escuelas argentinas

Estas muestras fueron recogidas en poblaciones argentinas pertenecientes a la provincia de Chaco (figura 1). El estudio se centró en el Departamento Almirante Brown (superficie de 17276 km²; densidad poblacional 1.7 habitantes/km²). Se recogieron muestras en núcleos poblacionales constituidos por comunidades rurales de pequeño tamaño, habitadas de forma dispersa por varias familias y situados en los alrededores de la pista de tierra que une Taco Pozo con Fuerte Esperanza.



Figura 1. Área de muestreo en la provincia de Chaco, Departamento Almirante Brown. Taco Pozo y comunidades aledañas.

Se analizaron 29 muestras de alimentos listos para el consumo correspondientes a raciones duplicadas servidas en las escuelas y recogidas entre los años 2008 y 2009. Las muestras fueron liofilizadas en la Universidad Nacional de Jujuy (Argentina) utilizando un equipo Genesis SQ

35 EL (Virtis, España) y posteriormente homogenizadas. Se transportaron al Laboratorio de Contaminación Metálica donde se congelaron hasta su análisis. Adicionalmente se analizaron muestras de agua de consumo empleadas para la cocción de los alimentos analizados, procedentes de sistemas municipales de distribución, de aljibes o pozos. Las muestras fueron almacenadas en botes de plástico y transportadas al laboratorio de Contaminación Metálica donde se congelaron hasta su análisis.

1.2. Digestión vía húmeda de alimentos

Para la puesta en disolución del fluoruro presente en los alimentos sólidos se utilizó el método de digestión por vía húmeda desarrollado en la presente tesis doctoral. Las muestras (0.50-1.0 g) se pesaron en un reactor de teflón de 55 mL de volumen y posteriormente se adicionaron 4 mL de HNO₃ 7 mol/L. Los reactores se cerraron y se introdujeron en un sistema de reacción acelerada de microondas, modelo MARS[®] (MARS, CEM, Vertex, España) con control interno de temperatura en cada vaso de reacción y potencia máxima de 1200 W. Para el proceso de digestión se aplicó una potencia de 800 W y el siguiente programa: etapa 1 – rampa desde temperatura ambiente a 180 °C durante 15 minutos; etapa 2 – mantenimiento a 180 °C durante 15 min; etapa 3 – enfriamiento hasta temperatura ambiente. Una vez enfriado el reactor de teflón, el digerido fue transferido a un tubo de plástico y se procedió al ajuste del pH a 7 el mismo día de la digestión. Para ello, se utilizaron dos disoluciones de NaOH (Panreac, España). Inicialmente se adicionó NaOH 8 mol/L hasta alcanzar un pH próximo a 2 y posteriormente NaOH 1.8 mol/L hasta ajustar el pH a 7. Finalmente, se adicionó agua desionizada hasta un volumen final de 15 mL.

La digestión vía húmeda fue aplicada al menos por duplicado a cada una de las muestras analizadas. Para el control de calidad del método de digestión se utilizaron dos muestras de alimentos, una muestra de té con un contenido de fluoruro certificado (NCS ZC73014, valor certificado: 57 ± 15 mg/Kg) adquirido en LGC Standards (España) y una muestra de bacalao utilizada por el laboratorio de Nutrición de Bergen (Noruega) como muestra de control interno (valor asignado: 25.9 ± 3.2 mg/kg), amablemente proporcionada por el Dr. Kare Julshamn.

1.3. Digestión vía seca de alimentos

La evaluación de la validez de la metodología por vía húmeda se llevó a cabo por comparación con un método de digestión por vía seca ampliamente empleado para la determinación de fluoruro en muestras de alimentos (Kjellefold Malde y col., 2001). Las muestras (0.25 ± 0.01 g) se pesaron en un crisol de níquel y se adicionaron 2.5 mL de NaOH (8 mol/L) y 0.125 g de $Mg(NO_3)_2$ (VWR, España). La mezcla se agitó hasta homogeneización y se llevó a sequedad en un baño de arena. Posteriormente se aplicó una mineralización en mufla (K1253, Heraeus, España) empleando el siguiente programa de temperaturas: 200 °C durante 16 horas y 525 °C durante 3 horas. Tras el enfriamiento de las cenizas, se adicionaron 5 mL de agua y se procedió a la disolución con ayuda del calentamiento en un baño de arena. Posteriormente se ajustó el pH de la disolución a 7 utilizando HCl 12 mol/L (Merck). La mezcla se llevó a 50 mL con agua y la disolución obtenida se filtró utilizando papel Whatman nº 1.

La digestión vía seca fue aplicada al menos por duplicado a cada una de las muestras. Para el control de calidad del método se utilizaron las muestras descritas en el apartado de digestión por vía húmeda (apartado 1.2).

1.4. Digestión gastrointestinal simulada de alimentos

Se empleó un método estático que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión gastrointestinal humana (figura 2; Laparra y col., 2003). En la aplicación del método se utilizaron los siguientes equipos: pHmetro (Hanna, WTW modelo 526, Vidrafoc, España), baño de agua con agitación orbital (Unitronic Orbital C, J.P. Selecta, España) y centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont).

Etapa gástrica. Se pesó en un erlenmeyer una cantidad de alimento fresco (10 g) o liofilizado (2 g) y se adicionaron 90 g de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl 6 mol/L y se completó el peso hasta 100 g con agua desionizada.

Para llevar a cabo la etapa gástrica se utilizó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L. Se adicionó el volumen necesario para proporcionar 2×10^{-3} g de pepsina/g de muestra fresca, equivalente en las condiciones del método a 0.02 g pepsina/100 g de disolución. Posteriormente el erlenmeyer se selló con Parafilm® y se llevó a un baño de agua con agitación (120 movimientos/min) a 37 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el erlenmeyer se enfrió en un baño de hielo durante 10 minutos.

Etapa intestinal. Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6.5 utilizando NaHCO₃ 1 mol/L (Panreac) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad por mg pancreatina equivalente a 4 x especificaciones de Farmacopea de EEUU: actividad lipasa 944 unidades USP; actividad proteasa 11800 unidades USP; actividad amilasa 11800 unidades USP) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares).

Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NaHCO₃ 0.1 mol/L. Se adicionó el volumen necesario para proporcionar 5×10^{-4} g de pancreatina/g de muestra fresca y 3×10^{-3} g de extracto biliar/g de muestra fresca. Estas cantidades equivalen en las condiciones del método a 0.005 g pancreatina/100 g de disolución y 0.03 g extracto biliar/100 g de disolución. La mezcla se selló con Parafilm[®] y se incubó nuevamente en agitación (120 movimientos/min) durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el erlenmeyer se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos. Una vez finalizada la etapa intestinal, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 0.5 mol/L. El digerido obtenido se centrifugó (10000 rpm/30 minutos/4 °C) para separar la fracción soluble (bioaccesible) y el residuo.

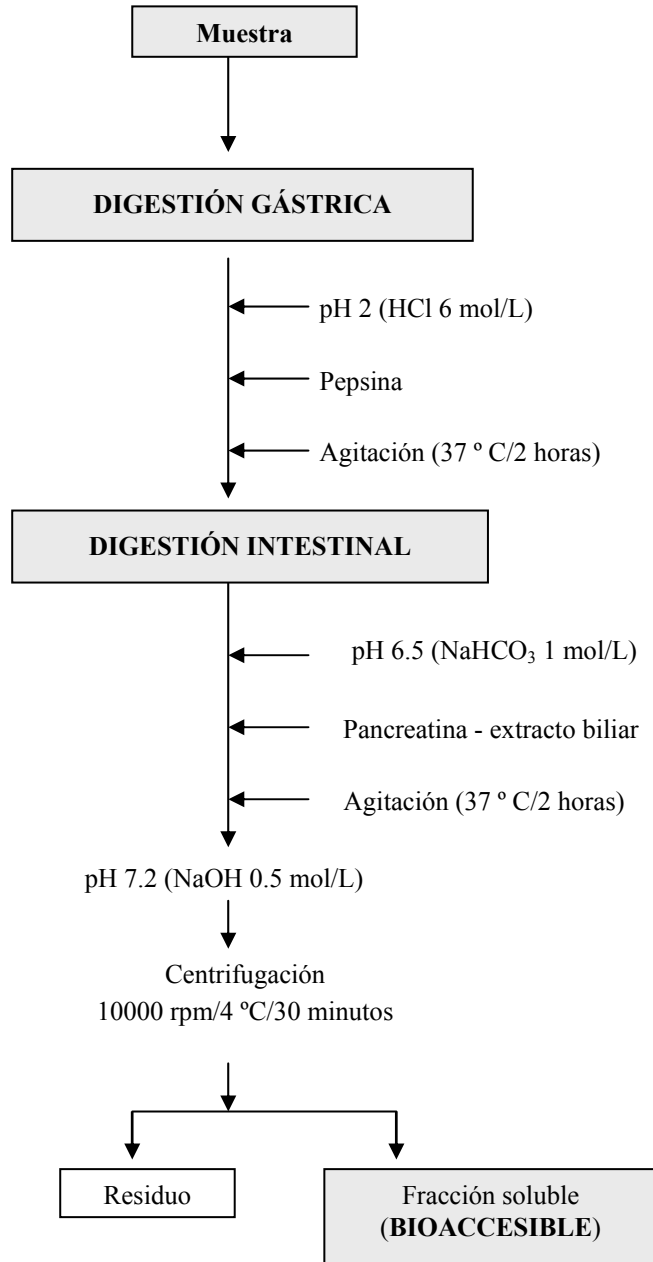


Figura 2. Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad de fluoruro mediante el método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*.

En la fracción soluble se cuantificó el contenido en fluoruro utilizando la metodología que se describe en el apartado 1.5. El análisis de la concentración bioaccesible de fluoruro se llevó a cabo al menos por duplicado en cada uno de los alimentos.

Para la evaluación de la bioaccesibilidad de fluoruro en cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{(\text{Fluoruro en la fracción bioaccesible})}{(\text{Fluoruro en el alimento})} \times 100$$

1.5. Análisis de fluoruro en alimentos y sus fracciones bioaccesibles

La concentración de fluoruro fue cuantificada utilizando un método potenciométrico con electrodo de ión fluoruro (ISE DC219-F y perfectION™, Mettler Toledo, España). Las muestras se mantuvieron en agitación constante durante su cuantificación utilizando para ello un agitador magnético (IKA, Vidrafoc, España).

Para la cuantificación de las disoluciones patrón y de las muestras fue necesario el ajuste del pH y la fuerza iónica mediante la adición de una disolución de TISAB II. Esta disolución acuosa se preparó en el laboratorio a partir de 58 mg/mL de NaCl (Panreac), 10 mg/mL de *trans*-1,2 diaminociclohexano-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético monohidratado (Fluka, Spain) y 57 µL/mL de ácido acético glacial (Panreac). El pH del TISAB II se ajustó entre 4.8 y 5.2 con una disolución al 7% (m/v) de NaOH.

Para la medición de la concentración de fluoruro en las muestras digeridas en horno de microondas o mufla, el digerido se diluyó (1/5 a 3/5) utilizando TISAB II y agua. La concentración de TISAB II en la muestra a

cuantificar fue de un 20% (v/v). En las muestras procedentes de la digestión gastrointestinal, la dilución aplicada fue de 1/2 (1 parte de TISAB II y 1 parte de muestra), de forma que el TISAB II en la muestra a cuantificar fue de un 50% (v/v).

La cuantificación se llevó a cabo frente a una curva de calibrado de fluoruro preparada a partir de un patrón primario de NaF (1000 mg/L como fluoruro, Panreac). Los patrones se prepararon en 20% o 50% (v/v) de TISAB II según el tipo de muestras a analizar, en un rango entre 0.010 y 10 mg/L. Para evaluar la adecuación del método de cuantificación se utilizó una muestra de orina Medisafe® Metalle U adquirida en LGC Standards, cuyo contenido en fluoruro está certificado (valor asignado: 10 mg/L; intervalo de confianza: 7.6-12.4 mg/L).

2. Factores que afectan a la solubilización de fluoruro desde alimentos

Con objeto de evaluar la etapa de digestión determinante en la solubilización del fluoruro desde los alimentos y el efecto de factores como el pH, la presencia de cationes y la concentración de pepsina y sales biliares sobre la solubilización de este elemento, se llevaron a cabo los estudios que se describen a continuación.

2.1. Influencia de la etapa digestiva en la solubilización de fluoruro

Se pesaron en erlenmeyers porciones independientes de una misma muestra y se añadieron a cada una de ellas 90 g de agua desionizada. Posteriormente el pH se ajustó a 2 con HCl 6 mol/L, y una de las porciones se sometió a la etapa gástrica y la otra a la digestión gastrointestinal completa, tal y como se describe en el apartado 1.4. Los digeridos se

centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y posteriormente se analizó el contenido de fluoruro en la fracción soluble. Los ensayos en cada condición (etapa gástrica o etapa gastrointestinal completa) se llevaron a cabo por duplicado.

2.2. Influencia del pH de la etapa gástrica en la solubilización de fluoruro

Se pesaron en erlenmeyers porciones independientes de una misma muestra y se añadieron a cada una de ellas 90 g de agua desionizada. Posteriormente el pH se ajustó con HCl 6 mol/L a los valores de interés (pH 2, 3, 4, 5 y 6) en cada porción. Tras llevar la muestra a 100 g con agua desionizada, se aplicó la etapa de digestión gástrica tal y como se ha descrito con anterioridad en el apartado 1.4. Los ensayos en cada condición de pH se llevaron a cabo por duplicado.

2.3. Influencia de la concentración de pepsina de la etapa gástrica en la solubilización de fluoruro

Se pesaron en erlenmeyers porciones independientes de una misma muestra y se añadieron a cada una de ellas 90 g de agua desionizada. Posteriormente el pH se ajustó a un valor de 2 con HCl 6 mol/L y a cada porción se le adicionó pepsina en la cantidad necesaria para alcanzar distintas concentraciones: 0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 y 0.013 g pepsina/g muestra fresca, equivalentes a 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.13 g pepsina/100 g de disolución a digerir. Se ensayó también una digestión gástrica en ausencia de pepsina.

Posteriormente se adicionó agua desionizada hasta un peso de 100 g y se aplicó la etapa de digestión gástrica tal y como se ha descrito en el apartado 1.4. Los ensayos en cada condición de pepsina se llevaron a cabo por duplicado.

2.4. Influencia de la concentración de sales biliares de la etapa intestinal en la solubilización de fluoruro

Se pesaron en erlenmeyers porciones independientes de una misma muestra y se añadieron a cada una de ellas 90 g de agua desionizada. Posteriormente el pH se ajustó a 2 con HCl 6 mol/L. Una de las porciones se sometió a la etapa gastrointestinal, tal y como se ha descrito en el apartado 1.4, pero sin extracto biliar porcino y las otras se ensayaron con distintas cantidades de extracto biliar (0.003, 0.1 y 0.3 g de extracto biliar/g de muestra fresca equivalentes a 0.03, 1 y 3 g de extracto biliar/100 g de disolución a digerir). Los ensayos en cada condición se llevaron a cabo por duplicado.

2.5. Influencia de la presencia de determinados cationes en la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica e intestinal

Se evaluó el efecto de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la solubilización del fluoruro durante la etapa gástrica e intestinal. Para ello se adicionó a la muestra antes del inicio de la etapa gástrica una cantidad determinada de los cationes a evaluar y posteriormente se aplicó el método de digestión gástrica o gastrointestinal completa descrito en el apartado 1.4.

Cada catión se ensayó de forma individual con las siguientes concentraciones en los 100 g de disolución de muestra preparada para la aplicación de la digestión:

- 25 mM Ca^{+2} , preparado empleando un patrón de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en ácido nítrico (1000 mg/L como calcio, Scharlau, Scharlab, España).
- 10 mM Mg^{+2} , preparado empleando un patrón de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en ácido nítrico (1000 mg/L como magnesio, Scharlau).
- 0.02 mM Fe^{+3} , preparado empleando un patrón de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en ácido nítrico (1000 mg/L como hierro, Merck).
- 1.25 nM Al^{+3} , preparado empleando un patrón $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en ácido nítrico (1000 mg/L como aluminio, Scharlau).

Los ensayos en cada condición se llevaron a cabo por duplicado.

3. Estudios *in vitro* de la absorción intestinal de fluoruro

3.1. Mantenimiento de los cultivos celulares de Caco-2 y HT29-MTX

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Reino Unido). El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionó 10 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) y L-glutamina (0.6 g/L) a pH 7.2. El DMEM se suplementó con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SFB), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomicina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). A lo largo de la tesis, el medio preparado con esta

composición se denominará DMEMc. Todos los ensayos se realizaron con células entre los pases 10 y 45. Las células utilizadas para un mismo tipo de estudio no difirieron en más de 10 pases.

Las células HT29-MTX fueron donadas por la Dra. Thécla Lesuffleur (Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR S938, Francia) en el pase 15 y se emplearon entre los pases 16 y 25. El mantenimiento rutinario de las células se llevó a cabo en frascos de 25 cm², a los que se adicionó 5 mL de medio consistente en DMEM con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) y L-glutamina (0.6 g/L) a pH 7.2, suplementado con un 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomicina, 0.0025 mg/mL de anfotericina B y 1 mM de piruvato de sodio. A lo largo de la tesis, el medio preparado con esta composición se denominará HT-DMEMc.

Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO₂ del 5%. Los medios de cultivo se cambiaron cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y posteriormente se resembraron a una densidad de 5×10⁴ células/cm².

Para la tripsinización se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se adicionó la disolución de tripsina (0.5 mg/mL) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA 0.2 mg/mL) (1 mL para frascos 75 cm² y 0.5 mL para frascos de 25 cm²). La disolución de tripsina/EDTA se mantuvo en contacto con las células durante 10 minutos en el incubador. Posteriormente se inactivó la tripsina con medio completo (DMEMc para Caco-2 y HT-DMEMc para HT29-MTX) y se recuperaron las células en un tubo estéril, el cual se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Tras la centrifugación, el medio se retiró y el residuo celular se

resuspendió en 10 mL del medio completo correspondiente. Las células se tiñeron con azul tripán (0.4 % v/v, Sigma) y se contaron en cámara de Neubauer para su posterior siembra.

Los reactivos utilizados para el mantenimiento de los cultivos fueron adquiridos a Sigma y a PAA Laboratories GMBH (Alemania).

3.2 Evaluación de la permeabilidad aparente, transporte y retención celular de fluoruro por la línea celular Caco-2

Para caracterizar el transporte del fluoruro a través de la monocapa formada por las células epiteliales del intestino se emplearon dos aproximaciones. En primer lugar se evaluó la permeabilidad aparente (P_{app}), parámetro que mide la tasa de transporte de un soluto a través de la monocapa celular. En una segunda aproximación, se determinó el transporte y la retención celular del fluoruro a tiempo final. En ambos casos se emplearon monocapas de células Caco-2 diferenciadas (10-15 post-siembra, dependiendo del soporte de crecimiento).

A continuación se describen los protocolos de trabajo para la realización de los estudios de permeabilidad, transporte y acumulación celular tanto en las condiciones estándar de trabajo (pH 7.2, 37 °C), como en las condiciones específicas aplicadas para evaluar los posibles mecanismos implicados en el transporte intestinal de fluoruro (apertura de las uniones intercelulares, cambios de pH y temperatura, presencia de iones, gradiente de grupos hidroxilo).

3.2.1. Ensayos de viabilidad celular en Caco-2

Previo a los estudios de transporte y acumulación, se evaluó el efecto del fluoruro sobre la viabilidad de las células diferenciadas, con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los estudios de viabilidad se basaron en la capacidad de las células viables para reducir resazurina sódica (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3hidro-fenoxacin-3-ona, Sigma) a resorufina, medibles ambas por métodos colorimétricos. Esta conversión es intracelular, facilitada por oxidoreductasas mitocondriales, citosólicas y microsomales (O'Brien y col., 2000).

Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo en el rango de concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL, durante 4, 24, 48 y 72 horas. Las células se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² en placas de 24 pocillos en medio DMEMc, cambiando el medio cada 2-3 días. Tras alcanzar la diferenciación (10-11 días), las células se expusieron a los distintos tratamientos en medio DMEMc sin SFB. En todos los ensayos se emplearon células control no tratadas.

Tras la exposición, se retiró el medio, y el cultivo se lavó con PBS. Posteriormente, se añadieron 500 µL de resazurina (10 µg/mL en DMEMc sin SFB) y se incubó durante 2 horas a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de CO₂ del 5%. Tras la incubación, se transfirieron 100 µL a una placa de 96 pocillos y la reducción de la resazurina se determinó por espectrofotometría con lecturas a 570 y 600 nm (PowerWave HT Microplate Scanning Spectrophotometer, Bio-Tek instruments, Alemania). Los resultados se expresaron como porcentajes respecto a la absorbancia de las células no tratadas con fluoruro.

3.2.2. Cultivos de la línea celular Caco-2 en Transwell® para estudios de transporte y permeabilidad

Los ensayos de transporte se realizaron en placas de 6 pocillos con insertos con membrana de poliéster (24 mm diámetro, tamaño de poro de 0,4 μm ; Transwell®, Costar Corp., EEUU). En este sistema, las células epiteliales se siembran sobre el soporte poroso del inserto que separa el pocillo en dos compartimentos: apical (superior) y basolateral (inferior) (figura 3).

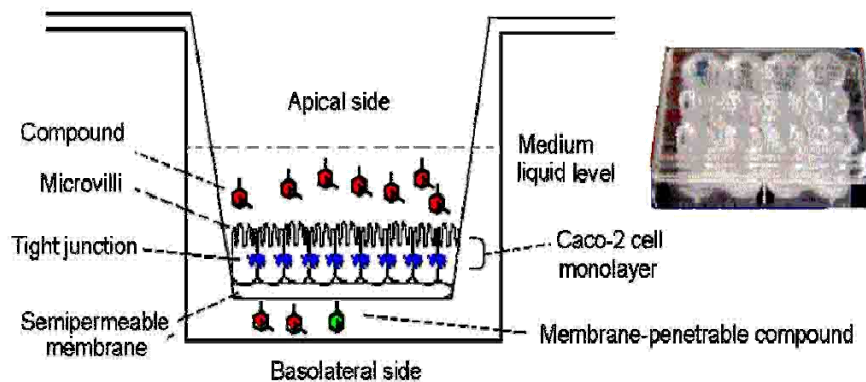


Figura 3. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad y transporte.

Este sistema intenta emular de forma simplificada el entorno de la pared intestinal. La parte apical de la monocapa celular representaría el lumen intestinal, el cual está en contacto con los compuestos procedentes de la dieta. El compartimento basolateral representaría la cavidad serosa, donde llegan los compuestos tras la absorción intestinal.

Tras la tripsinización de las células Caco-2 mantenidas en los frascos de 75 cm^2 , tal y como se indica en el apartado 3.1, se procedió a su siembra a una densidad de 7.5×10^4 células/ cm^2 sobre el sistema Transwell®,

adicionando 1.5 mL de la suspensión celular en DMEMc al compartimento apical y 2 mL de DMEMc al compartimento basolateral. Las células se incubaron a 37 °C, con 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ del 5% durante 14-15 días, para permitir la diferenciación celular, cambiando el medio cada 2-3 días.

Durante el tiempo de crecimiento y diferenciación celular, se monitoreó la confluencia y desarrollo de la monocapa celular a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) cada 2 días a partir del séptimo día de siembra, empleando para ello un voltímetro Millicell[®]-ERS (Millipore Corporation, EEUU) (figura 4). Debido a que los valores de RET son altamente dependientes de la temperatura, este parámetro se midió inmediatamente después de sacar las células del incubador. En las células Caco-2 se consideró que la monocapa estaba formada cuando los valores de RET fueron estables y superiores o iguales a 250 Ohms×cm².



Figura 4. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas en sistemas Transwells[®] empleando un voltímetro Millicell[®]-ERS.

3.2.3. Integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte

La evaluación de la integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte se llevó a cabo midiendo la RET, tal y como se describe en el apartado anterior y evaluando el coeficiente de permeabilidad aparente de lucifer yellow (LY, Sigma), compuesto fluorescente de bajo peso molecular transportado principalmente a través de las uniones intercelulares (vía paracelular).

La RET se midió al principio y al final del ensayo de transporte, así como en todos los tiempos de toma de muestra. La permeabilidad del LY se evaluó añadiendo al medio apical al inicio del ensayo una concentración de 100 μM , tanto a los tratamientos con fluoruro como a los controles. En las alícuotas recogidas en cada tiempo se determinó el contenido de LY empleando un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA reader, BMG-Labtech, Alemania) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/520 nm. El cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente se realizó aplicando la ecuación 1 que se describe en el apartado 3.2.4. Para los ensayos de transporte a tiempo final, en lugar de la permeabilidad de LY se calculó el transporte de LY al final del ensayo.

Se consideraron válidos los ensayos de transporte cuando se cumplieron las siguientes condiciones: a) cambios en la RET al final de la experiencia respecto a los valores iniciales no superiores al 25%; b) diferencias en el P_{app} o en el transporte del LY entre células tratadas con fluoruro y células no tratadas inferiores al 25%.

3.2.4. Ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad en condiciones estándar

Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en dirección apical-basolateral (A-B) (sentido absorbivo) y en dirección basolateral-apical (B-A) (sentido secretorio), empleando como medio de cultivo la solución salina de Hanks con NaCO₃ (HBSS, Sigma) suplementada con 10 mM HEPES (pH 7.2). Se empleó NaF (1000 µg/mL como fluoruro, Panreac) como estándar de partida para la preparación de los medios de tratamiento. En todos los estudios realizados en sistemas celulares se expresaron las concentraciones en µg/mL como fluoruro.

Antes de iniciar las experiencias, las células diferenciadas en Transwells[®] se mantuvieron en contacto con medio HBSS durante 15 minutos para su acondicionamiento. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionaron 1.5 mL de los patrones de fluoruro preparados en HBSS con 10 mM HEPES al compartimento dador (apical o basolateral dependiendo de la dirección del transporte, A-B o B-A respectivamente) y 2 mL de medio HBSS con 10 mM HEPES al compartimento aceptor. Las concentraciones de fluoruro ensayadas fueron 2.5, 10, 20 y 50 µg/mL, equivalentes a 0.13, 0.53, 1.1 and 2.6 mM. A los tiempos establecidos (60, 120, 190 y 260 minutos), el contenido del compartimento aceptor (basolateral o apical según si la dirección de estudio era A-B o B-A respectivamente) fue retirado en su totalidad y sustituido por un volumen igual de medio fresco (HBSS con 10 mM HEPES). En las alícuotas recogidas se procedió a la cuantificación de fluoruro usando el método ISE que se describe en el apartado 3.4.

Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon utilizando la ecuación 1.

$$P_{app} = (dC/dt) (V_r/AC_o) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

dC/dt es el flujo ($\mu\text{g/s}$) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de fluoruro, corregidas con la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento aceptor (2 mL en la dirección A-B y 1.5 mL en la dirección B-A).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular (4.67 cm^2).

C_o es la concentración inicial de fluoruro en el compartimento dador ($\mu\text{g/mL}$).

Adicionalmente se calculó la tasa de eliminación (E_r) mediante la ecuación 2.

$$E_r = P_{\text{app}}(\text{B-A})/P_{\text{app}}(\text{A-B}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde:

$P_{\text{app}}(\text{B-A})$ es el coeficiente de permeabilidad aparente en dirección basolateral-apical (cm/s).

$P_{\text{app}}(\text{A-B})$ es el coeficiente de permeabilidad aparente en dirección apical-basolateral (cm/s).

Los ensayos de acumulación celular se llevaron a cabo en medio DMEMc. Las células diferenciadas en placas de 6 pocillos se expusieron a $20 \mu\text{g/mL}$ de fluoruro a distintos tiempos (2, 5, 10, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas). Tras la exposición, el medio se recuperó y las células se lavaron con PBS, se recuperaron por tratamiento con tripsina/EDTA y se

lisaron con 0.5 mL de Triton-X100 (1% v/v en PBS) (Merck). El contenido de fluoruro se determinó en el medio y en el lisado celular siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 3.4.

3.2.5. Estudio del transporte paracelular

La participación de la ruta paracelular en el transporte de fluoruro se evaluó mediante la modulación de las uniones intercelulares en ambos sentidos (A-B y B-A). Para tal fin, la monocapa celular se incubó durante 5 minutos con EDTA 5 mM en PBS libre de cloruro de calcio y sulfato de magnesio (Sigma). Posteriormente, se lavó la monocapa con PBS sin Ca^{+2} y Mg^{+2} y se agregó al compartimento apical el estándar de fluoruro (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preparado en un medio constituido a partes iguales por HBSS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} y HBSS con Ca^{+2} y Mg^{+2} , ambos suplementados con 10 mM HEPES. A diferentes tiempos (20, 40 y 60 minutos) se recogió el medio aceptor, se determinó el contenido de fluoruro siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 3.4 y se evaluó el P_{app} en ambas direcciones (ecuación 1).

Simultáneamente, la eficiencia del EDTA en la modulación de las uniones intercelulares se monitoreó mediante la determinación del P_{app} de LY, tal y como se describe en el apartado 3.2.3.

3.2.6. Efecto del pH sobre el transporte y acumulación de fluoruro

El efecto del pH sobre el transporte de fluoruro (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en dirección A-B y B-A se estudió con las siguientes combinaciones de pH en los compartimentos aceptor/dador: 7.2/7.2; 5.5/7.2 y 5.5/5.5. El medio a pH 5.5 se preparó con HBSS suplementado con ácido etanosulfónico 2-N-morfolino

20 mM (MES, Sigma), mientras que a pH 7.2 el medio se preparó con HBSS suplementado con 10 mM HEPES. A diferentes tiempos en sentido A-B (45, 105, 165 y 240 minutos) y en sentido B-A (30, 60, 90 y 120 minutos) se recogió el medio aceptor y se determinó el contenido de fluoruro siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 3.4. El P_{app} se calculó según la ecuación 1.

El estudio del efecto del pH sobre la acumulación celular se llevó a cabo en células diferenciadas en placas de 6 pocillos expuestas durante 30 minutos a 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoruro preparado en medio HBSS suplementado con MES (pH 5.5) o en medio HBSS suplementado con 10 mM HEPES (pH 7.2). Al finalizar la exposición, se determinó el contenido de fluoruro en el medio y en el lisado celular (apartado 3.4).

3.2.7. Efecto de la temperatura sobre el transporte y acumulación de fluoruro

El estudio del transporte a 4 °C y 37 °C se llevó a cabo en dirección A-B y B-A. Se adicionaron al compartimento dador 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoruro preparado en HBSS suplementado con 10 mM HEPES. A distintos tiempos (30, 45, 60, 90 y 120 minutos), se retiró el medio del compartimento aceptor, sustituyéndolo por la misma cantidad de medio fresco. En las alícuotas retiradas se cuantificó el contenido en fluoruro según el apartado 3.4, determinándose el P_{app} (ecuación 1).

Para el estudio de acumulación celular a 4 °C y 37 °C se utilizaron placas de 6 pocillos. Las células Caco-2 diferenciadas se expusieron durante 30 minutos a 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoruro en medio DMEMc. Al finalizar la exposición, se determinó el contenido de fluoruro en el medio y en el lisado celular (apartado 3.4).

3.2.8. Efecto de la presencia de cloruros (Cl⁻) sobre el transporte y acumulación de fluoruro

Se llevaron a cabo ensayos de transporte y acumulación celular empleando un medio libre de Cl⁻ y un medio con Cl⁻. El medio libre de Cl⁻ se preparó a partir de (NO₃)₂Ca 2H₂O (0.298 g/L), NO₃K (0.542 g/L), KH₂PO₄ anhidrido (0.06 g/L), MgSO₄ anhidrido (0.10 g/L), gluconato sódico (29.86 g/L), Na₂HPO₄ anhidrido (0.048 g/L), NaHCO₃ (0.350 g/L), D-glucosa (1 g/L) y 10 mM HEPES. Para elaborar el medio con cloruros, se remplazaron gluconato sódico, (NO₃)₂Ca 2H₂O y NO₃K por cantidades equimolares de NaCl (8 g/L), CaCl₂ (0.14 g/L) y KCl (0.40 g/L) respectivamente. Todos los reactivos utilizados para la preparación de los medios se adquirieron en Panreac, a excepción de gluconato sódico, D-glucosa, KCl y HEPES procedentes de Sigma.

En los ensayos de transporte, se añadieron 1.5 mL de disolución de fluoruro (20 µg/mL) preparada en los medios descritos anteriormente al lado apical y 2 mL del mismo medio al lado basolateral. A diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos) se recogió el medio aceptor y se determinó el contenido de fluoruro (apartado 3.4) para evaluar el P_{app} (ecuación 1).

Los ensayos de acumulación se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos, exponiendo las células diferenciadas durante 30 minutos a fluoruro 20 µg/mL en medios con y sin cloruro. Al finalizar la exposición, se determinó el contenido de fluoruro en el medio y en el lisado celular (apartado 3.4).

3.2.9. Participación de un intercambiador F/OH en el transporte y acumulación celular de fluoruro

El efecto del gradiente de grupos hidroxilos sobre el transporte de fluoruro se evaluó en dirección A-B. Las células se incubaron durante 35 minutos con HBSS 10 mM HEPES/10 mM de KOH (pH 8.5). Tras eliminar el medio, las células se lavaron con HBSS (10 mM HEPES pH 7.2) y posteriormente se adicionó el patrón de fluoruro (20 µg/mL) preparado en HBSS 10 mM HEPES. Se estudió también el efecto de la inhibición de los canales aniónicos mediante la co-exposición de fluoruro (20 µg/mL) y sal disódica de 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico 0.3 mM (DIDS, Sigma) preparado en HBSS 10 mM HEPES, tras el tratamiento con KOH. A diferentes tiempos de exposición (30, 60, 90 y 120 minutos) se recogió el medio aceptor y se determinó el contenido de fluoruro (apartado 3.4) para evaluar el P_{app} (ecuación 1).

En el estudio de la acumulación celular las células diferenciadas en placas de 6 pocillos se trataron durante 35 minutos con 10 mM HEPES/10 mM de KOH (pH 8.5). Posteriormente se realizó la exposición a 100 µg/mL de fluoruro durante 30 minutos. También se evaluó el posible efecto inhibitorio del DIDS llevando a cabo una co-exposición DIDS/fluoruro (0.3 mM/100 µg/mL) en medio HBSS 10 mM HEPES durante 30 minutos tras el tratamiento con KOH. Al finalizar la exposición, se determinó el contenido de fluoruro en el medio y en el lisado celular (apartado 3.4).

3.3. Evaluación del modelo celular y los factores presentes en el tracto intestinal sobre la permeabilidad intestinal de fluoruro

Se ha evaluado el efecto de distintos modelos celulares (co-cultivos Caco-2/HT29 MTX en distintas proporciones y monocultivos HT29-MTX) sobre el P_{app} del fluoruro. Asimismo, se ha analizado la influencia de compuestos o condiciones presentes de forma habitual o tras la ingesta de alimentos en el tracto intestinal (pH intraluminal, componentes de sales biliares y matrices alimentarias) sobre el proceso absorbivo del fluoruro en los distintos modelos celulares.

3.3.1. Modelos celulares

La diferenciación y los ensayos de transporte se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos con insertos con membrana de poliéster (Transwell[®]), tal y como se describe en el apartado 3.2.2. La siembra se realizó para dar lugar a monocapas de Caco-2, HT29-MTX o de distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX (70/30, 50/50, 30/70). Las células Caco-2 y HT29-MTX se mantuvieron tal y como se describe en el apartado 3.1 hasta el momento de siembra en Transwell[®].

Las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/cm². En los co-cultivos y en los monocultivos HT29-MTX, se adicionó 1.5 mL de HT-DMEMc a la cámara apical y 2 mL de HT-DMEMc a la cámara basolateral. Para los monocultivos Caco-2 se empleó el medio DMEMc. Las células se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, cambiando el medio cada 2-3 días hasta alcanzar la diferenciación celular (10-11 días postsiembra), momento en el que se realizaron los distintos ensayos de transporte.

3.3.2. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente

Antes de iniciar las experiencias, las células diferenciadas en Transwells® se mantuvieron en contacto con medio HBSS con HEPES 10 mM durante 15 minutos para su acondicionamiento. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado 3.2.4. Para evaluar el efecto de los distintos modelos celulares se ensayó una única concentración de fluoruro (20 µg/mL). A lo largo de los ensayos se determinó la integridad de las monocapas tal y como se describe en el apartado 3.2.3 y se consideraron válidos los ensayos que cumplían los criterios anteriormente descritos (apartado 3.2.3). La determinación del P_{app} se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.2.4.

3.3.3. Influencia del mucus secretado por las HT29-MTX sobre el transporte de fluoruro

El efecto del mucus se estudió en la monocapa celular formada por HT29-MTX y en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50). Se comparó el P_{app} del fluoruro en células con la capa de mucus intacta y en células donde previamente se había eliminado esta capa. La eliminación del mucus se realizó con un tratamiento con N-acetilcisteína (Sigma) (2 mL de N-acetilcisteína 10 mM, agitación a 140 rpm, 30 minutos, 37 °C).

Para el ensayo de transporte se incorporó al lado apical 1.5 mL de fluoruro (20 mg/L) preparado en HBSS 10 mM HEPES, pH 7.2. La evaluación y el cálculo del P_{app} se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.

3.3.4. Influencia del pH en el transporte de fluoruro

El ensayo se llevó a cabo en dirección A-B en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50). Se emplearon las mismas combinaciones de pH apical/basolateral que en el estudio de Caco-2 (7.2/7.2, 5.5/7.2 y 5.5/5.5). Las preparaciones de los medios y el protocolo de ensayo se describen en el apartado 3.2.6.

3.3.5. Influencia del ácido taurocólico en el transporte de fluoruro

El estudio se llevó a cabo en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50) y en las monocapas de Caco-2 y HT29-MTX. En los co-cultivos y en la monocapa HT29-MTX los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de mucus. El mucus se retiró según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3. Para evaluar el efecto del ácido taurocólico se adicionó conjuntamente la disolución estándar de fluoruro (20 µg/mL) y el ácido taurocólico (20 mM) (Sigma). Durante el ensayo se recogió el medio basolateral a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos) y se determinó el P_{app} (ecuación 1) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.

3.3.6. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de fluoruro

Para este estudio se utilizó una muestra de arroz cocinada con agua desionizada adicionada con fluoruro (20 µg/mL). Tras el cocinado, la muestra de arroz se sometió a una digestión gastrointestinal simulada empleando el método descrito en el apartado 1.4. La fracción soluble (bioaccesible) obtenida tras el centrifugado de los digeridos se filtró, determinándose el contenido de fluoruro tal y como se describe en el apartado 1.5.

Parte de la fracción bioaccesible se trató térmicamente (100 °C durante 4 minutos) para inactivar los enzimas presentes. Tras el enfriamiento en un baño de hielo durante 5 minutos, se adicionó glucosa (5 mM concentración final, Sigma) y HEPES (50 mM concentración final) para favorecer la viabilidad celular durante los ensayos de transporte. Finalmente la fracción soluble se ajustó con NaCl (10 mM, Panreac) hasta alcanzar una osmolaridad de 270 ± 30 mOsm/kg. La osmolaridad se determinó mediante el equipo Automatic Micro-Osmometer Type 15 Löser (Löser Messtechnik, Alemania).

Para los ensayos de transporte se sembraron monocultivos Caco-2 y cocultivos Caco-2/HT29-MTX (50/50), tal y como se describe en el apartado 3.3.1. Tras la diferenciación celular, se adicionaron 1.5 mL de digerido inactivado en el compartimento apical y 2 mL de HBSS suplementado con HEPES 10 mM en el compartimento basolateral. Simultáneamente se estudió el transporte de una disolución estándar de fluoruro de concentración similar a la hallada en la fracción bioaccesible (3 µg/mL) preparada en HBSS con HEPES 10 mM. Tras 2 horas de exposición, se retiró el medio del compartimento basolateral para cuantificar la cantidad de fluoruro transportada (apartado 3.4). La integridad de la monocapa se determinó midiendo la RET al principio y final del ensayo, así como el transporte de LY adicionado a los medios de tratamiento al inicio de la experiencia (apartado 3.2.3).

3.4. Determinación de fluoruro en los medios de cultivo y el lisado celular

La cuantificación se llevó a cabo mediante potenciometría con electrodo selectivo de fluoruro. Los medios de cultivo no requirieron un tratamiento

previo para el análisis, mientras que las células se lisaron con Triton X-100 0.1% (v/v) en PBS. Las muestras se diluyeron 1/5 utilizando TISAB II y agua. La concentración de TISAB II en la muestra a cuantificar fue del 20% (v/v). La cuantificación de fluoruro se realizó frente a una curva de calibrado preparada con disoluciones acuosas de patrón de fluoruro en el rango 0.025-10 µg/mL.

3.5. Cuantificación del contenido total de proteínas

Los datos de todos los experimentos de transporte y acumulación se normalizaron por cantidad de proteína (mg). La cuantificación de proteínas en las células se llevó cabo mediante el método Bradford, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante (Bio-Rad laboratorios, España). Se preparó el reactivo de tinción mediante dilución 1:4 de la disolución concentrada en agua Mili-Q y posterior filtrado a través de Whatman 1. Se preparó la curva de calibrado en el rango de 0.05-0.5 mg/mL, mediante las diluciones correspondientes de la disolución concentrada de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Se transfirieron 5 µL de cada patrón o muestra a una placa de 96 pocillos y posteriormente se añadieron 195 µL del reactivo de tinción diluido a cada pocillo. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm mediante un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA).

4. Efectos de la exposición a fluoruro sobre el epitelio intestinal

El estudio del efecto del fluoruro sobre el epitelio se llevó a cabo en células Caco-2 diferenciadas sembradas sobre placas multipocillo o sobre los soportes porosos Transwell® descritos en el apartado 3.2.2. Se evaluó el efecto del fluoruro sobre la diferenciación de la monocapa celular empleando dos marcadores de diferenciación ampliamente utilizados con este fin, la fosfatasa intestinal alcalina (ALPI) y la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP4). Asimismo, se estudió el efecto de este elemento sobre las uniones intercelulares de la monocapa epitelial diferenciada. Para ello se utilizaron dos aproximaciones, a) evaluación de la expresión génica de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares [Claudina 1 (CLN1), ocludina (OCLN), molécula de adhesión de la unión 1 (JAM-1), proteína zonula occludens 1 (ZO-1) y E-cadherina] y b) evaluación de la permeabilidad paracelular mediante la medida de la RET y de la permeabilidad de LY. También se evaluó la respuesta inflamatoria de la monocapa celular mediante el estudio de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias [Factor de necrosis tumoral (TNF α), IL-6 e IL-8] y antiinflamatorias (IL-10 e IL-13).

Los ensayos se llevaron a cabo empleando exposiciones de corta duración (24 y 48 horas) o mediante exposiciones repetidas en el tiempo (7, 14 y 18 días), dependiendo del parámetro a evaluar. La mayoría de estos estudios se realizaron mediante el análisis de la expresión génica diferencial de enzimas y proteínas estructurales mediante la técnica de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). A continuación se describe el protocolo general empleado para realizar los ensayos en RT-qPCR.

4.1. Extracción del RNA total de los cultivos celulares

Para la extracción del RNA de las células en cultivo se utilizó un kit comercial (NucleoSpin RNA II kit, Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Lisado de células con 350 μ L de tampón de lisis y 3.5 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma).
2. Filtración en columna mediante centrifugación 11000 g durante 1 minuto.
3. Ajuste de las condiciones de unión del RNA a la columna (membrana de sílica) mediante adición de 350 μ L de etanol al 70% y agitación en vórtex durante 30 segundos.
4. Unión del RNA a la columna de separación (centrifugación 11000 g durante 30 segundos).
5. Eliminación de sales de la membrana de sílica mediante el tampón MDB (membrane desalt buffer) y centrifugación a 11000 g durante 1 minuto.
6. Digestión del DNA mediante la adición de DNasa I (10 μ L) en tampón de reacción específico (90 μ L) e incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos.
7. Inactivación de la DNasa mediante la adición de 200 μ L de disolución STOP/DNasaI. Centrifugación a 11000 g durante 30 segundos.
8. Lavados consecutivos de la columna con 600 μ L y 250 μ L de solución de lavado, seguidos de centrifugación a 11000 g durante 30 segundos.
9. Centrifugación 11000 g durante 2 minutos.

10. Elución de RNA en agua libre de RNasas (30-60 μL), por centrifugación a 11000 g durante 1 minuto.

4.2. Cuantificación del RNA y evaluación de su integridad

El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 nm (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, EEUU). La calidad del RNA se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), comprobándose la presencia de las bandas de RNA ribosómico (18S y 28S). La electroforesis se realizó aplicando un potencial de 80 y 90 voltios durante 30 minutos.

4.3. Transcripción inversa (RT)

Para realizar la transcripción del RNA total a ADN complementario (ADNc) se utilizó un kit comercial (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec Headquarters, Bélgica), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 10 μL , se llevó a cabo la mezcla que aparece en la tabla 3. La mezcla de reacción se sometió a una etapa inicial de calentamiento a 25 °C durante 10 minutos. La transcripción inversa se llevó a cabo a 48 °C durante 30 minutos. Finalmente el enzima se inactivó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
10X Buffer de reacción	1	1X
25 mM MgCl ₂	2	5 mM
2.5 mM dNTP	2	500 µM cada dNTP
Random nonamer	0.5	2.5 µM
Inhibidor RNasas	0.2	0.4 U/µL
EuroScript RT	0.25	1.25 U/µL
Muestra (100 ng/µL)	2	200 ng RNA total
Agua libre de RNasas	2.05	—

Tabla 3. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en el proceso de transcripción inversa.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

A partir del ADNc obtenido en el paso anterior, se amplificó el gen de interés mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando para ello el equipo LightCycler® 480 Real-Time q-PCR System (Roche Diagnostics, EEUU). Los reactivos empleados para un volumen final de reacción de 10 µL fueron los siguientes:

- 5 µL LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2X) (Roche)
- 0.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos (5 µM) (Biolegio, Países Bajos)
- 1.5 µL agua libre de RNasas y DNasas

- 2.5 μ L ADNc (50 ng/ μ L)

Las condiciones utilizadas para la reacción qPCR se describen en la tabla 4. En cada ensayo se evaluaron controles sin ADNc para verificar la ausencia de ADN genómico. Las curvas de fusión fueron analizadas tras cada ensayo para confirmar la especificidad del producto obtenido en la reacción. Las curvas de eficiencia para cada gen se calcularon empleando diluciones $\frac{1}{2}$ de ADNc, con 3 réplicas en 3 ensayos independientes. El gen normalizador empleado fue el ARN ribosómico 18S (*RNI8S*) (F: CATGTGCAAGGCCGGCTTCG; R: GAAGGTGTGGTGCCAGATTT). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Relative Expression Software Tool (REST 2009, Qiagen) en modo estándar. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

Programa	Modo de análisis	Modo de adquisición	Ciclos	Temperatura (°C)	Calentamiento (hh:mm:ss)	Rampa (°C/s)
Pre-incubación	Ninguno	Ninguno	1	95	00:05:00	4.4
Amplificación	Cuantificación	Ninguno	40	95	00:00:10	4.4
		Ninguno		55	00:00:10	2.2
		Puntual		72	00:00:20	4.4
Curvas fusión	Curvas fusión	Ninguno	1	95	00:00:05	4.4
		Ninguno		65	00:01:00	2.2
		Continua		97	00:00:20	0.11
Enfriamiento		Ninguno	1	40	00:00:10	0.15

Tabla 4. Condiciones de la PCR a tiempo real.

4.5. Efecto del fluoruro sobre la línea celular Caco-2 en exposiciones de corta duración

Las células se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos adicionando 2 mL de DMEMc e incubando a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. El medio se cambió cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron la diferenciación (10-12 días). Tras la diferenciación, las células se expusieron a disoluciones de fluoruro (20 y 100 µg/mL) preparadas en el medio libre de CI descrito previamente (apartado 3.2.8) durante 24 y 48 horas.

Transcurrido estos tiempos, las células se lavaron tres veces con PBS y se recuperaron para la extracción del ARN total y posterior obtención de ADNc según el protocolo descrito en los apartados 4.1 a 4.3. La evaluación de la expresión diferencial se realizó mediante qPCR, tal y como se describe en el apartado 4.4. En este estudio de exposición a tiempos cortos se evaluó la expresión diferencial de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. La secuencia de los oligonucleótidos empleados y la eficacia de los mismos se muestran en la tabla 5.

4.6. Efecto del fluoruro sobre la línea celular Caco-2 en exposiciones repetidas en el tiempo

Para la evaluación del efecto sobre el proceso de diferenciación y las uniones intercelulares, las células se sembraron a una densidad de 7.5×10^4 células/cm² sobre el sistema Transwell[®] descrito anteriormente (apartado 3.2.2). Desde el momento de la siembra, las células se trataron con disoluciones de fluoruro (2.5, 20 y 50 µg/mL)

preparadas en DMEMc. Así, se adicionaron 1.5 mL de DMEMc con fluoruro o sin fluoruro (para la condición control) al compartimento apical y 2 mL de DMEMc al compartimento basolateral. Las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ del 5% durante 7, 14 o 18 días, cambiando el medio cada 2-3 días.

Durante el tiempo de crecimiento y diferenciación celular, se midió la RET cada 2 días a partir del segundo día. En los días 7, 14 y 18 de siembra se evaluó el P_{app} del LY tal y como se describe en el apartado 3.2.3. Las monocapas celulares empleadas en la medida de la permeabilidad de LY se recuperaron por tripsinización. Tras centrifugar, las células se lavaron tres veces con PBS y se recogieron para la extracción de ARN y la evaluación de la expresión diferencial de las proteínas constituyentes de las uniones intercelulares y los enzimas marcadores de diferenciación empleando la técnica de RT-qPCR descrita anteriormente (apartados 4.1 a 4.4). Las secuencias de los oligonucleótidos y la eficacia de los mismos se muestran en la tabla 6.

Finalmente, se evaluó la respuesta inflamatoria a tiempos largos de exposición (14 días) empleando células tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 µg/mL) desde el momento de la siembra. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de siembra de 7.5×10⁴ células/cm², adicionando 2 mL de DMEMc con fluoruro o sin fluoruro (células control). Transcurridos los 14 días de exposición, las células se recuperaron por tripsinización, se lavaron con PBS y tras la extracción de RNA, se determinó la expresión de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias mediante RT-qPCR empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla 5.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores con comparaciones múltiples post hoc empleando el test HSD de Tukey (paquetes estadísticos XLSTAT 2010 y SigmaPlot versión 12). Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

Gen	N°GenBank	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño amplificación (bp)	Eficacia	Referencia
<i>IL6</i>	NM_000600.3	F: AACCTGAACCTTCCAAAGATGG R: TCTGGCTTGTTCTCACTACT	159	2.03 ± 0.3	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
<i>IL8</i>	NM_000584.3	F: GAACTGAGAGTGATTGAGAGTGGA R: CTCTTCAAAAACCTTCCACAAC	134	1.86 ± 0.1	Ohki y col., 2002
<i>TNFα</i>	NM_000594.3	F: CCCAGGGACCTCTCTAATCA R: GCTACAGGCTTGTCACCTCGG	80	1.98 ± 0.2	Uray y col., 2002
<i>IL10</i>	NM_000572.2	F: GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG R: TCACATGCGCCTTGATGTCTG	112	1.79 ± 0.1	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
<i>IL13</i>	NM_002188.2	F: CCTCATGGCGCTTTTGTTGAC R: TCTGGTTCTGGGTGATGTTGA	134	1.88 ± 0.4	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos de citoquinas pro y antiinflamatorias empleados en qPCR.

Gen	N°GenBank	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>DPP4</i>	NM_001935.3	F: GTGGCGTGTTC AAGTGTGG R: CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG	111	2.01 ± 0.32	Varona y col., 2010
<i>ALPI</i>	NM_001631.3	F: GTGCGACCAGACGTGAATGA R: CCATGACATGCGCTACGAA	175	1.88 ± 0.21	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
TJP1 (ZO-1)	NM_003257.3	F: CGAGTTGCAATGGTTAACGGA R: TCAGGATCAGGACGACTTACTGG	146	1.73 ± 0.04	Orbán y col., 2008
<i>CLDNI</i>	NM_021101.4	F: CCGGCGACAACATCGTGAC R: CGGGTTGCTTGCAATGTGC	136	1.66 ± 0.03	Kaarteenaho y col., 2010
<i>OCLN</i>	NM_002538.2	F: AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATA C R: ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG	133	1.73 ± 0.04	Cui y col., 2010
<i>FIIR</i> (JAM-1, JAM-A)	NM_016946.4	F: TGGCATTGGGCAGTGTACAG R: GTCTCCTTGGTCAAACCTCCAC	134	2.03 ± 0.24	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
<i>CDH1</i> (E-cadherin)	NM_004360.3	F: CGAGAGCTACACGTTACGG R: GGGTGTGCGAGGAAAAATAGG	119	1.51 ± 0.02	Avendaño y col., 2009

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos de enzimas marcadores de diferenciación y proteínas de las uniones intercelulares empleados en qPCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1

**Desarrollo de una metodología analítica para la
cuantificación del fluoruro en alimentos**

La potenciometría directa con electrodo selectivo (ISE) es una de las técnicas de cuantificación de fluoruro que presenta un mayor número de ventajas para su uso en laboratorios de control: bajo coste, sencillez, rapidez y amplio rango de medida. Su aplicación a alimentos líquidos resulta sencilla ya que únicamente requiere el ajuste de la fuerza iónica y del pH de la muestra mediante la adición de una disolución amortiguadora de la fuerza iónica total (TISAB). Su uso en alimentos sólidos por el contrario, hace necesaria puesta en disolución del fluoruro mediante un método de digestión que, en ocasiones, se combina con un proceso posterior de destilación o difusión del fluoruro. La fusión alcalina es el método de digestión más utilizado para alimentos sólidos. En este capítulo de la tesis, se presenta el desarrollo de un método de digestión por vía húmeda mediante horno de microondas con el objetivo de disponer de una alternativa a la fusión alcalina que resulte rápida y menos dependiente del operador.

RESULTADOS

La determinación de fluoruro en alimentos por electrodo selectivo requiere la digestión de las muestras, la neutralización del digerido y el ajuste de la fuerza iónica y del pH con disolución TISAB para la cuantificación. A continuación se describe la optimización de cada una de estas etapas.

1. Optimización de las condiciones para la digestión por microondas

Los parámetros más relevantes a considerar en la digestión ácida en horno de microondas son: masa de la muestra, volumen y concentración de los reactivos oxidantes, temperatura y tiempo de digestión.

En este estudio se han utilizado inicialmente las condiciones de microondas y el peso de muestra que se han evidenciado válidas en el laboratorio para el análisis de contaminantes inorgánicos como el mercurio (Calatayud y col., 2012a) y que por lo tanto, aseguran una destrucción total de la materia orgánica: 180 °C, 15 min, 800 W para el ciclo de digestión y 0.5 g de muestra liofilizada. Con estas condiciones se ha ensayado el efecto de distintos oxidantes: 4 mL de HNO₃ 14 mol/L; 4 mL de HNO₃ 7 mol/L; 4 mL de HNO₃ 7 mol/L y 1 mL H₂O₂.

Los resultados (figura 1) muestran que la concentración de fluoruro detectada es superior en las muestras digeridas con HNO₃ 7 mol/L que en las tratadas con HNO₃ 14 mol/L. Esta diferencia es significativa en todas las muestras analizadas a excepción de la muestra de pescado blanco ($p < 0.05$). Cabe señalar que el uso de ácido diluido puede prevenir la formación de sales insolubles y mejorar la cuantificación de algunos minerales (Gonzalez y col., 2009). Por lo que respecta al efecto del tratamiento conjunto de HNO₃ 7 mol/L y H₂O₂, los resultados obtenidos en tres muestras (gamba-cigala-langostino; sardina-boquerón; mejillones) evidencian que el contenido de fluoruro es más elevado en ausencia de H₂O₂ en la muestra de mejillones y gamba-cigala-langostino ($p < 0.05$). Tras este estudio, se selecciona HNO₃ 7 mol/L como el reactivo más adecuado para la digestión por horno de microondas.

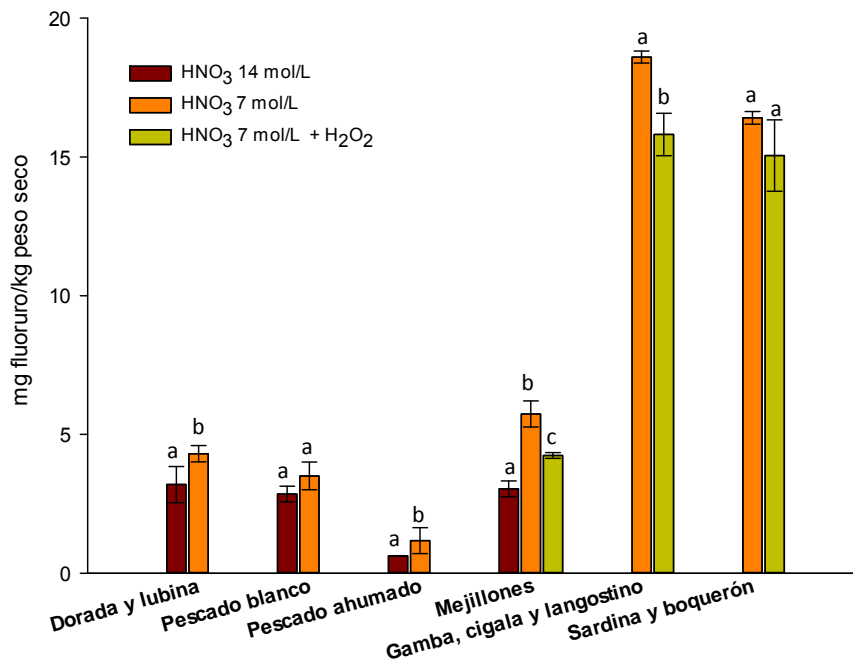


Figura 1. Efecto del reactivo oxidante empleado en la digestión por horno de microondas sobre la cuantificación de fluoruro mediante ISE. Concentración de fluoruro expresada como mg/kg (media \pm desviación estándar, n=3). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados a cada muestra.

2. Optimización de las condiciones de neutralización

El digerido resultante del tratamiento de las muestras en el horno de microondas presenta una elevada acidez y debe ser neutralizado hasta pH próximo a 7 antes de proceder a la adición de TISAB y cuantificación por ISE. Esta neutralización debe realizarse de tal forma que no conlleve una dilución elevada de la muestra, factor que afecta negativamente al rango de concentración de fluoruro que puede cuantificarse.

Siguiendo las pautas de Grobler y Louw (1998) se ha utilizado NaOH para la neutralización. Inicialmente, se adiciona NaOH 8 mol/L hasta alcanzar un pH próximo a 2. Esto produce una reacción exotérmica que afecta al pH, por lo que debe esperarse a que la disolución alcance la temperatura ambiente antes de continuar con la neutralización. Con posterioridad se adiciona NaOH 1.8 mol/L hasta alcanzar un pH 7. Tras este proceso de neutralización el volumen de la disolución oscila entre 11 y 13 mL. Finalmente se adiciona agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 15 mL. La neutralización se realiza el mismo día en que se lleva a cabo la digestión.

En la literatura se ha descrito que el contenido de fluoruro en algunos alimentos es muy bajo. La dilución requerida para la neutralización podría dificultar la cuantificación de los productos con baja concentración de este elemento. Por ello se ha evaluado si la digestión de microondas puede ser aplicada a pesos de muestra superiores, comparando los resultados obtenidos en condiciones iniciales (0.5 g muestra y 4 mL de HNO₃ 7 mol/L) con los hallados tras duplicar el peso de muestra (1 g de producto liofilizado) y el volumen de ácido nítrico (8 mL de HNO₃ 7 mol/L). En ambos casos los digeridos se neutralizan y se llevan a un volumen final de 15 mL. Los resultados obtenidos (tabla 1) indican que las concentraciones de fluoruro detectadas no difieren significativamente en ambas condiciones. Esto pone de manifiesto que puede incrementarse la toma de muestra para aquellos productos que debido a su baja concentración de fluoruro no pueden ser cuantificados en las condiciones estándar (0.5 g de muestra y 4 mL de HNO₃ 7 mol/L).

Muestra	Condiciones microondas (muestra/HNO₃)	Fluoruro (mg/kg)
Pescado ahumado	0.5 g/4 mL	2.38 ± 0.12
	1 g/8 mL	2.27 ± 0.04
Sardina-boquerón	0.5 g/4 mL	12.5 ± 0.7
	1 g/8 mL	12.2 ± 0.3

Tabla 1. Efecto de las condiciones de microondas (peso muestra y volumen de reactivos) sobre la cuantificación de fluoruro mediante ISE. Concentración de fluoruro expresada como mg/kg (media ± desviación estándar, n=3).

3. Optimización de las condiciones de cuantificación mediante potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro

3.1. Selección del TISAB

En la cuantificación por electrodo selectivo es necesario el ajuste de la fuerza iónica de la muestra. Esta etapa, que siempre conlleva una dilución adicional de la muestra, se lleva a cabo mediante la adición de una disolución de TISAB, tampón que presenta un pH alrededor de 5 y que por tanto permite que el ion fluoruro sea la forma predominante. Además contiene ácido ciclohexilamino-dinitrilotetraacético, el cual forma quelatos estables con cationes, liberando el ion fluoruro de los complejos que forma con ellos y que generan interferencias en la cuantificación (Martín Delgado y col., 1993).

La cantidad de TISAB a utilizar para la determinación de fluoruro mediante ISE viene generalmente especificada por la casa comercial que fabrica el electrodo. En la mayoría de los casos se recomienda el uso de

TISAB II (50% v/v) o TISAB III (10% v/v). La figura 2 muestra una representación gráfica del logaritmo de la concentración de fluoruro frente al potencial de la lectura (mV) para distintos patrones de fluoruro (0.010, 0.015, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 mg/L) preparados en TISAB II (50%, v/v) o en TISAB III (10%, v/v). Con TISAB II se observa una relación lineal en un rango de 0.010-10 mg/L, con un coeficiente de correlación superior a 0.999 y una pendiente de -58.16 mV. En las curvas obtenidas con TISAB III sin embargo, la respuesta no es lineal por debajo de 0.025 mg/L, resultado coincidente con el obtenido previamente por Kjellevoid Malde y col. (2001). En el rango 0.025-10 mg/L, la curva de calibrado con TISAB III presenta un adecuado coeficiente de correlación (0.9999) y una pendiente (-57.64 mV).

Se ha evaluado también la idoneidad del TISAB II (20%, v/v) con el fin de minimizar el consumo de este reactivo. La pendiente y la ordenada en el origen de las curvas de calibrado no difieren significativamente de las halladas con TISAB II al 50% (v/v). Asimismo se ha analizado si este porcentaje de TISAB II es suficiente para la cuantificación de muestras en las que, a diferencia de los patrones, pueden existir cationes interferentes. Los resultados para la muestra certificada de té NCS ZC73014 (67 ± 1 mg/kg peso seco) se encuentran dentro del intervalo certificado (57 ± 15 mg/kg peso seco).

Tras este estudio se opta por seleccionar TISAB II 20% (v/v) para la preparación de las muestras, ya que permite un mayor rango lineal de trabajo.

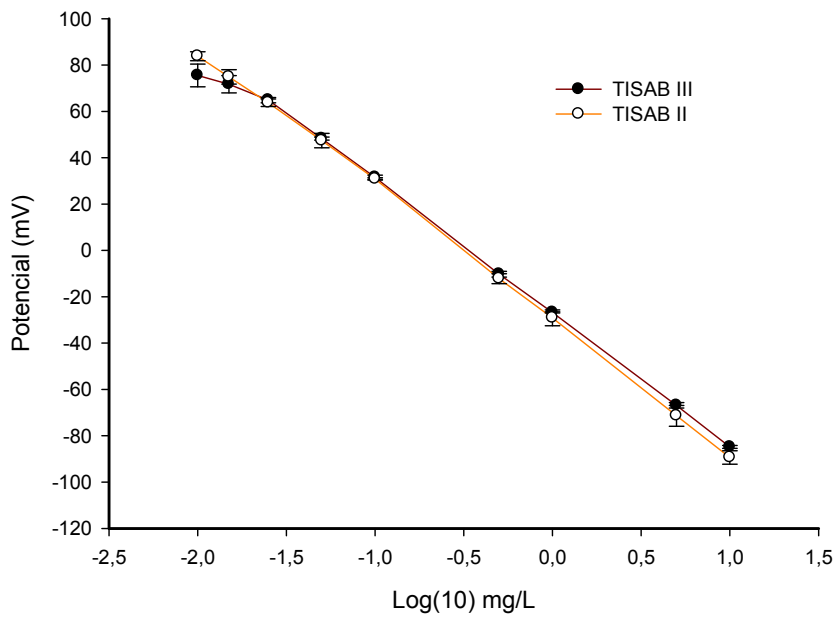


Figura 2. Curva de calibrado de fluoruro obtenida con patrones preparados en TISAB II al 50% (v/v) y TISAB III al 10% (v/v). Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=3).

3.2. Curva de calibrado

Kjellevold Malde y col. (2001) han puesto de manifiesto que en la cuantificación de fluoruro mediante ISE la preparación de la curva de calibrado en condiciones distintas a las utilizadas para la preparación de las muestras afecta los resultados obtenidos. En el presente apartado se ha evaluado si existen diferencias significativas entre las curvas de calibrado obtenidas con patrones acuosos y las obtenidas con patrones preparados en el blanco de digestión (tabla 2).

La linealidad es adecuada en ambos casos, pero existen diferencias significativas en la pendiente y en la ordenada en el origen ($p < 0.05$). Hay

pues un efecto de los reactivos utilizados en la digestión que debe ser considerado en la preparación de la curva de calibrado.

Serie	Rango (mg/L)	Pendiente	Ordenada origen	r ²
A (n=3)	0.010 - 10	-57.87 ± 1.11 ^a	-29.04 ± 1.32 ^a	0.9995
B (n=3)	0.010 - 10	-55.06 ± 0.05 ^b	-22.59 ± 0.98 ^b	0.9993

Tabla 2. Comparación de las curvas de calibración obtenidas con patrones preparados en agua desionizada (serie A) y en blanco de digestión (serie B). Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). Los números con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre series.

3.3. Efecto del volumen de muestra en la cuantificación

El contenido de fluoruro en las muestras de alimentos es muy variable, por lo que la dilución utilizada para la lectura por ISE puede variar según la muestra a cuantificar.

La tabla 3 presenta el efecto de la dilución en la cuantificación de fluoruro en muestras con concentraciones baja, media y alta de este elemento. Se han ensayado diluciones desde 1/5 (1 parte de digerido + 1 parte TISAB II + 3 partes de agua destilada) a 3/5 (3 partes de digerido + 1 parte TISAB II + 1 parte de agua destilada). Los resultados obtenidos indican que un aumento del volumen de muestra no afecta significativamente a la cuantificación y que por tanto, no hay interferencias de matriz. Ello permite aumentar el rango de concentraciones cuantificable con la metodología desarrollada.

Muestra	Dilución	Fluoruro (mg/kg)
Té (NCS ZC73014)	1/5	68.95 ± 0.78
	2/5	68.22 ± 0.22
Gamba-cigala-langostino	1/5	18.69 ± 0.11
	2/5	18.71 ± 0.28
	3/5	18.52 ± 0.55
Salmón-trucha	2/5	4.06 ± 0.18
	3/5	4.16 ± 0.20

Tabla 3. Efecto del volumen de la dilución en la cuantificación de fluoruro. Concentración de fluoruro expresada como mg/kg (media ± desviación estándar, n=3).

4. Comparación con el método de digestión por fusión alcalina

Se ha utilizado la fusión alcalina como método de referencia con el cual comparar los resultados obtenidos con la digestión por horno de microondas. La validez del método de fusión alcalina utilizado se ha corroborado mediante el análisis de la muestra certificada de té NCS ZC73014 (valor hallado: 52 ± 2 mg/kg peso seco; valor certificado: 57 ± 15 mg/kg peso seco).

La tabla 4 muestra las concentraciones de fluoruro halladas tras la fusión alcalina y tras la digestión en microondas. En las tres muestras analizadas los intervalos de concentración obtenidos por ambos métodos no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Muestra	Fusión alcalina (mg/kg)	Digestión microondas (mg/kg)
Sardina y boquerón	17.9 ± 1.4	17.2 ± 0.65
Dorada y lubina	4.47 ± 0.85	4.52 ± 0.46
Gamba, cigala y langostino	14.9 ± 3.7	18.6 ± 0.29

Tabla 4. Concentraciones de fluoruro cuantificadas en las muestras digeridas por fusión alcalina y por horno de microondas. Valores expresados como mg/kg (media ± desviación estándar, n=3).

5. Estabilidad de las muestras

Se ha evaluado la estabilidad de patrones y muestras almacenadas en refrigeración tras su preparación. En el caso de los patrones, se compara la curva de calibrado obtenida con patrones preparados diariamente con la generada a partir de patrones almacenados en refrigeración (4 °C) durante varios días. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) ponen de manifiesto que hasta los 30 días de almacenamiento no existen variaciones significativas ($p < 0.05$) en la pendiente ni en la ordenada en el origen respecto a la curva preparada diariamente.

Por lo que respecta a las muestras, se ha evaluado la estabilidad del material de referencia de té (NCS ZC73014) digerido por microondas, diluido con TISAB para su posterior análisis y almacenado durante varios días en refrigeración. La figura 3 muestra que durante 30 días de almacenamiento la concentración de fluoruro hallada en la muestra (50 a 56 mg/kg peso seco) se encuentra dentro del valor certificado (42-72 mg/kg peso seco).

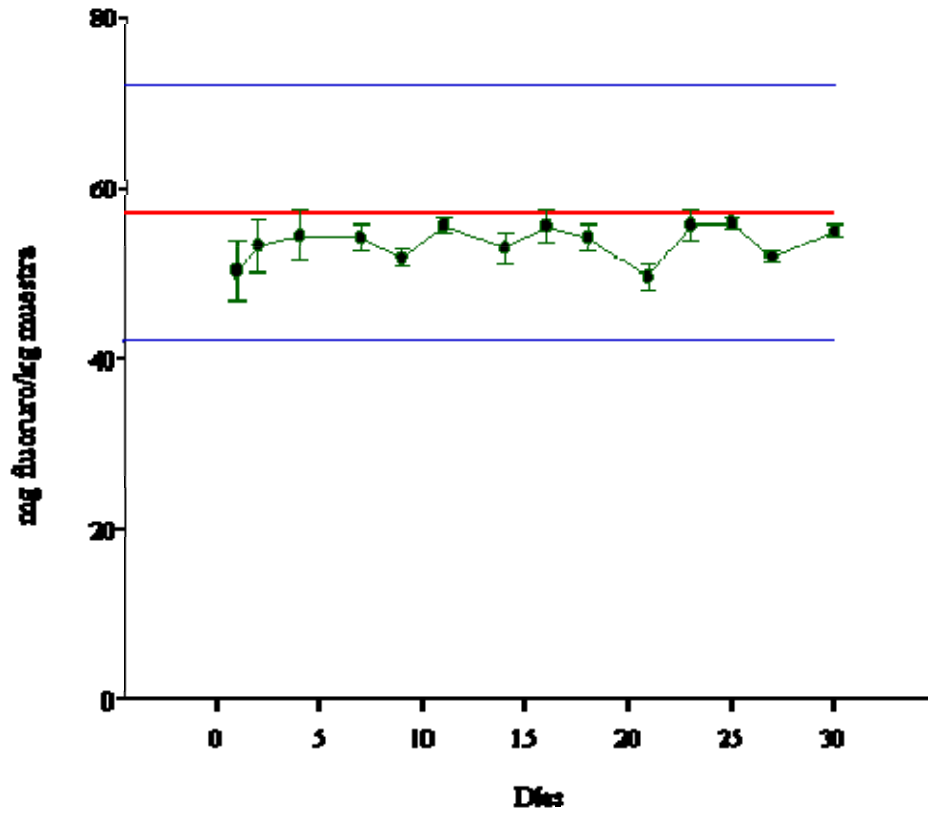


Figura 3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la concentración de fluoruro de la muestra de referencia certificada de té. Concentración de fluoruro expresada como mg/kg (media \pm desviación estándar, $n=3$). La concentración de fluoruro certificada en la muestra se indica con la línea roja (media) y las líneas azules (incertidumbre).

6. Características analíticas

6.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Para la determinación de ambos parámetros se ha utilizado la dilución 3/5, que tal como se ha especificado anteriormente permite el análisis de muestras de menor concentración.

El límite de detección de la metodología (LD) se ha determinado como tres veces la desviación estándar de la concentración de fluoruro en los blancos de digestión (n=15). El LD hallado es de 0.0018 mg/L. El límite de cuantificación (LQ), concentración mínima del analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se ha calculado como 10 veces la desviación estándar de la concentración de fluoruro en los blancos de digestión. El LQ hallado es de 0.0052 mg/L. En la tabla 5 figuran los límites expresados en mg/kg, utilizando para el cálculo la dilución 3/5.

Peso muestra (g)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)
0.5	0.090	0.260
1	0.045	0.130

Tabla 5. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) de la metodología desarrollada (digestión por horno de microondas y cuantificación por ISE) para la cuantificación de fluoruro en alimentos.

En el caso de utilizar para el cálculo del LQ la menor cantidad de fluoruro detectada con el electrodo selectivo utilizado (0.01 mg/L correspondiente al patrón más bajo de la curva de calibrado), los valores del

LQ se incrementan. Considerando una dilución de 3/5, el LQ es 0.50 mg/kg para 0.5 g de muestra y 0.25 mg/kg para 1 g de muestra.

6.2. Exactitud

Para evaluar la exactitud de la metodología desarrollada se han utilizado los siguientes criterios: recuperación de patrones de fluoruro, análisis de muestras control y recuperación de adiciones en muestras de alimentos.

6.2.1. Recuperación de patrones de fluoruro

Al realizarse la digestión en un sistema cerrado se descartan las pérdidas por volatilización en forma de fluoruro de hidrogeno (HF). No obstante, es necesario evaluar si el tratamiento de digestión produce interferencias en la cuantificación de fluoruro o si existen cesiones o adsorciones por parte del material empleado. Para ello, se procede a la digestión de patrones de fluoruro a cuatro niveles de concentración (15, 25, 50 y 100 mg/L). Los digeridos, cuantificados frente a una curva de calibrado externa preparada con 20% (v/v) de TISAB II, muestran recuperaciones entre 70-75%, inferiores a los valores considerados aceptables (80-110%; Wood y col., 1998).

Si se utiliza la curva de calibrado realizada con los blancos de digestión (apartado 3.2), los patrones de fluoruro digeridos muestran recuperaciones entre 84 y 93% (tabla 6), valores que se sitúan dentro de los límites aceptables. Esto indica que debe considerarse el proceso de digestión en la preparación de la curva de calibrado.

Fluoruro adicionado (mg/L)	Fluoruro encontrado (mg/L)	Recuperación (%)
15	12.8 ± 0.04	85 ± 3
25	21.1 ± 0.06	84 ± 2
50	46.4 ± 0.42	93 ± 3
100	93.1 ± 1.11	93 ± 2

Tabla 6. Recuperación de fluoruro tras la digestión de patrones por horno microondas. Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3).

6.2.2. Análisis de muestras de referencia

Apenas existen muestras de referencia de alimentos con un contenido de fluoruro certificado o informado. Hasta hace poco tiempo, se comercializaba una muestra de tejido de ostra (NIST 1566a) con un contenido de fluoruro informado. Este material ha dejado de fabricarse y a su sustituto (NIST 1566b) no se le ha asignado una concentración de fluoruro. Hoy en día, sólo tenemos conocimiento de la comercialización de una muestra de té con un contenido certificado de fluoruro (NCS ZC73014), muestra que ha sido utilizada para evaluar la adecuación del método. Se ha analizado también una muestra de control interno proporcionada por el laboratorio de Nutrición de Bergen (Noruega), que corresponde a harina de bacalao.

La concentración de fluoruro obtenida tras el análisis de tres réplicas de ambas muestras (tabla 7) se encuentra dentro del valor certificado o asignado, hecho que pone de manifiesto la adecuación del método desarrollado.

Muestra	Fluoruro hallado (mg/kg)	Fluoruro certificado o asignado (mg/kg)
Té (NCS ZC73014)	68 ± 1	57 ± 15 ^(a)
Bacalao	28.0 ± 0.5	25.9 ± 3.2 ^(b)

Tabla 7. Concentraciones de fluoruro halladas en un material de referencia certificado y en una muestra de control interno, expresadas como mg/kg (media ± desviación estándar, n=3). ^(a) Valor certificado expresado como media ± incertidumbre. ^(b) Valor asignado expresado como media ± desviación estándar.

6.2.3. Recuperación de fluoruro en muestras de alimentos

Se ha evaluado la recuperación a tres niveles de adición. Para ello se han utilizado tres muestras de pescado con concentraciones de fluoruro muy distintas (salmón-trucha, dorada-lubina y gamba-cigala-langostino) y tres muestras de productos vegetales (plátano, manzana-pera, zanahoria-calabaza). Los resultados obtenidos (tabla 8) indican que las recuperaciones son satisfactorias en todos los niveles de adición (81% a 96%), independientemente de la concentración inicial existente en la muestra y del tipo de alimento.

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos de exactitud ponen de manifiesto que el método desarrollado no presenta pérdidas ni interferencias en las distintas etapas que lo integran (digestión, neutralización y cuantificación por ISE).

Producto	Fluoruro en muestra (mg/kg)	Adición (mg/kg)	Recuperación (%)
Salmón y trucha	1.15 ± 0.05	1	86 ± 2
		5	81 ± 2
		25	85 ± 2
Dorada y lubina	4.52 ± 0.46	5	86 ± 7
		10	87 ± 4
		25	85 ± 5
Gamba, cigala y langostino	18.7 ± 0.1	20	86 ± 4
		40	85 ± 6
		60	96 ± 10
Plátano	1.06 ± 0.03	1	84 ± 1
		5	84 ± 1
		25	85 ± 1
Manzana-pera	1.27 ± 0.08	1	94 ± 1
		5	86 ± 1
		25	92 ± 1
Zanahoria-calabaza	1.15 ± 0.03	1	101 ± 1
		5	91 ± 1
		25	91 ± 1

Tabla 8. Recuperación de fluoruro en productos de la pesca y productos vegetales tras la adición de distintas concentraciones de fluoruro. Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3).

6.3. Precisión

La precisión del método ha sido evaluada en condiciones de repetibilidad en muestras con diferentes concentraciones de fluoruro (0.74-18.69 mg/kg). La precisión obtenida, expresada como desviación estándar relativa de los resultados de al menos tres repeticiones de cada muestra, oscila entre 2 y 8% (tabla 9).

Muestra	n° muestras	Fluoruro (mg/kg)	Precisión (%)
Salmón y trucha	6	1.15 ± 0.05	2
Salazones de pescado	6	8.51 ± 0.38	4
Sardina y boquerón	6	17.2 ± 0.7	4
Gamba, cigala y langostino	6	18.7 ± 0.1	2
Zanahoria-calabaza	3	1.15 ± 0.03	2
Judía verde	3	1.12 ± 0.09	8
Plátano	3	1.06 ± 0.03	3
Manzana y pera	3	1.27 ± 0.08	6
Patata	3	0.867 ± 0.07	3

Tabla 9. Precisión del método. Concentraciones de fluoruro expresadas como mg/kg (media ± desviación estándar).

DISCUSIÓN

La digestión en medio ácido asistida por microondas se considera una alternativa eficaz en la preparación de muestras de alimentos para el posterior análisis de compuestos inorgánicos mediante técnicas electroquímicas (Gonzalez y col., 2009). Los hornos de microondas existentes en la actualidad permiten el tratamiento simultáneo de un elevado número de muestras. Por lo general, con tiempos cortos de tratamiento a altas temperaturas es posible la destrucción de la materia orgánica sin que existan pérdidas por volatilización del analito. Estas características pueden suponer grandes ventajas para el análisis de fluoruro en alimentos. La digestión por fusión alcalina, el método de destrucción de materia orgánica más descrito para este elemento, es complejo y tedioso en su aplicación y además requiere una elevada manipulación de la muestra. La simple consideración del tiempo del proceso (menos de 30 minutos para horno de microondas frente 24 horas para la vía seca) ya supone una razón para abordar el desarrollo y optimización de una metodología por microondas para el análisis de fluoruro en alimentos.

Se ha puesto de manifiesto que el uso de sistemas cerrados para la digestión de las muestras supone una ventaja frente a los tratamientos en sistemas abiertos. Así, la digestión ácida con nítrico en recipientes cerrados de teflón (120 °C; 6 horas) ha proporcionado recuperaciones de fluoruro en muestras de plantas, superiores a las halladas en digestiones ácidas o alcalinas en sistemas abiertos (Keerthisinghe y col., 1991). La mejora es atribuible a la completa solubilización del fluoruro de la muestra y a la eliminación de las pérdidas por volatilización. La aceleración del proceso mediante la combinación de sistemas cerrados y tratamiento por microondas, no fue descrita hasta 1998 por Grobler y Louw, que la aplicaron con

excelentes recuperaciones (Grobler y Louw, 1998). Este uso puede considerarse tardío respecto a la gran aplicación que la digestión por microondas ha tenido desde la década de los 80 para la cuantificación de otros elementos traza y macronutrientes (Smith y Arsenault, 1996). Los laboratorios continúan optimizando metodologías por vía seca o aislamientos por difusión tras tratamiento con ácido perclórico para la determinación de fluoruro en alimentos (Kjelleveold Malde y col., 2001; Opydo-Szymaczek y Opydo, 2011 a,b). Únicamente Usyduş y col. (2008) describen recientemente el uso de horno de microondas para la digestión de alimentos previa a la cuantificación de fluoruro, si bien no detallan las condiciones de trabajo ni evidencian la adecuación de la metodología.

En el presente estudio se ha optimizado una metodología para la digestión de muestras por horno de microondas y posterior cuantificación por ISE. Las características analíticas del método optimizado son adecuadas para el análisis de fluoruro en alimentos y no difieren de las descritas para metodologías basadas en mineralización por fusión alcalina con detección por ISE. Una ventaja adicional es la posibilidad de utilizar el digerido por horno de microondas para el análisis de otros minerales y elementos traza. El método desarrollado constituye pues, una alternativa válida a la fusión alcalina. Su sencillez y el uso de equipos disponibles en laboratorios de control podrían contribuir a incrementar las investigaciones sobre contenidos de fluoruro en los alimentos ingeridos por la población y a una mejor evaluación del riesgo/beneficio asociado a este elemento. Este ha sido uno de los objetivos del siguiente capítulo de la presente tesis doctoral.

Capítulo 2

Contenido de fluoruro en alimentos y su bioaccesibilidad

Los datos de contenido de fluoruro en alimentos son escasos si se compara con la abundante información disponible para otros elementos traza. Esta diferencia es especialmente destacable en España, donde sólo se tiene constancia de datos de concentración en un limitado número de muestras de bebidas y alimentos infantiles (Hidalgo de Cisneros y Pastor Sanchez, 1984; García y col., 1992; Martín Delgado y col., 1992, 1993; Moretó y Jaso-Margarit, 1993; Martínez y col., 1998). Con objeto de ampliar la información existente sobre contenidos e ingesta de fluoruro a partir de alimentos en poblaciones españolas, en el presente estudio se ha aplicado la metodología optimizada en capítulo 1 a la cuantificación de fluoruro en muestras de alimentos que forman parte del estudio de Dieta Total llevado a cabo en la Comunidad Valenciana. Adicionalmente, se han analizado alimentos consumidos en áreas de Argentina en las que existen elevados contenidos de fluoruro en las aguas de consumo. Finalmente, además de evaluar la exposición teniendo en cuenta el contenido en el producto, se ha estimado la cantidad del elemento que puede ser solubilizado durante la digestión gastrointestinal del producto alimentario. Para este estudio de bioaccesibilidad se ha aplicado un método *in vitro* de digestión gastrointestinal a las muestras procedentes del estudio de Dieta Total y a las muestras consumidas por las poblaciones argentinas.

RESULTADOS

1. Contenidos de fluoruro en alimentos

1.1. Influencia de la liofilización sobre el contenido de fluoruro

Las muestras de alimentos que se han analizado en este capítulo han experimentado un proceso de liofilización, tratamiento de deshidratación habitual en los laboratorios para la conservación de muestras de alimentos. Sin embargo, este proceso de liofilización podría producir pérdidas del analito de interés, por lo que es necesario estudiar su estabilidad durante el proceso.

La figura 1 muestra el efecto de la liofilización sobre las concentraciones de fluoruro en cuatro especies de productos de la pesca. Los resultados indican que no existen pérdidas de fluoruro durante el proceso de liofilización. En consecuencia, los resultados hallados en muestras liofilizadas se consideran representativos de los existentes en las muestras no liofilizadas.

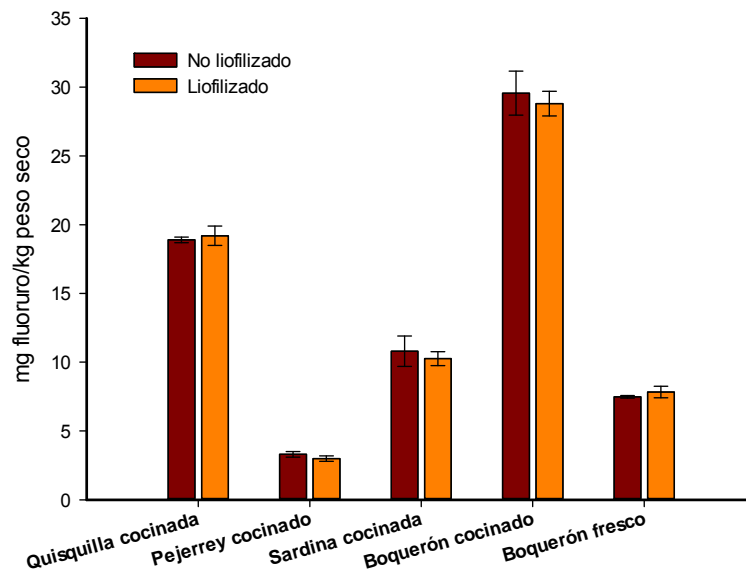


Figura 1. Influencia de la liofilización sobre el contenido de fluoruro. Valores expresados como mg/kg peso seco (media \pm desviación estándar, n=3).

1.2. Contenidos de fluoruro en alimentos consumidos en la Comunidad Valenciana

La información disponible sobre contenido de fluoruro en alimentos pone de manifiesto que los productos de la pesca, las frutas y ciertos productos vegetales son los alimentos sólidos que presentan las concentraciones más elevadas de este elemento (USDA, 2004; Fawell y col., 2006). Por este motivo se han seleccionado estos grupos de alimentos del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana.

El análisis inicial de un número reducido de estas muestras ha puesto de manifiesto que las concentraciones de fluoruro son inferiores a 0.4 mg/kg peso fresco en la mayoría de los productos vegetales: zanahoria-calabaza (0.173 mg/kg), judía verde (0.146 mg/kg), plátano (0.360 mg/kg), manzana-

pera (0.267 mg/kg) y patata (0.173 mg/kg). Únicamente la muestra de arroz presenta contenidos destacables (2.17 mg/kg peso fresco). En cuanto a las muestras del grupo “pescados y derivados”, las concentraciones de fluoruro son superiores a las halladas en los productos vegetales. Atendiendo a los resultados de este análisis preliminar se ha decidido continuar el estudio únicamente con las muestras que presentan mayores concentraciones, procediéndose al análisis de la totalidad de las muestras incluidas en “pescados y derivados” (11 productos diferentes; 10 muestras de cada producto) y de las muestras de arroz (10 muestras). La tabla 1 presenta el rango, la media y la mediana de las concentraciones de fluoruro halladas en cada uno de estos productos.

Las concentraciones de fluoruro oscilan entre 0.304 y 13.3 mg/kg peso fresco. Los valores más elevados se han cuantificado en las muestras de gambas-langostino-cigala, sardina-boquerón y salazones de pescado, con valores medios en torno a 4 mg/kg peso fresco. En las restantes muestras, el valor medio de fluoruro es igual o inferior a 1.5 mg/kg de peso fresco.

Alimento	Rango	Media \pm SD	Mediana \pm SD
Cereales			
Arroz	2.17-2.49	2.31 \pm 0.12	2.30 \pm 0.12
Pescados			
Sardina y boquerón	3.04-5.54	4.12 \pm 0.87	4.14 \pm 0.87
Dorada y lubina	0.882-1.32	1.04 \pm 0.15	0.968 \pm 0.151
Pescado blanco	0.534-0.853	0.684 \pm 0.119	0.693 \pm 0.119
Bonito y atún	0.564-0.850	0.712 \pm 0.102	0.724 \pm 0.102
Emperador y pez espada	0.623-0.836	0.729 \pm 0.066	0.742 \pm 0.066
Salmón y trucha	0.304-0.609	0.407 \pm 0.084	0.388 \pm 0.084
Salazones de pescado	1.78-5.05	3.96 \pm 0.98	3.95 \pm 0.98
Pescado ahumado	0.728-1.32	0.993 \pm 0.219	0.919 \pm 0.219
Mariscos			
Mejillones	0.523-1.56	1.00 \pm 0.31	1.03 \pm 0.31
Calamar y sepia	0.403-0.973	0.692 \pm 0.198	0.643 \pm 0.198
Gamba, cigala y langostino	1.85-13.3	4.77 \pm 3.31	3.75 \pm 3.31

Tabla 1. Rango de concentraciones de fluoruro, media y mediana en arroz y productos de la pesca. De cada producto se ha analizado diez muestras diferentes, cada una de ellas por triplicado. Resultados expresados como mg/kg de peso fresco.

A partir de estos datos pueden estimarse ingestas de fluoruro para la población adulta. Para ello, se han combinado las concentraciones de fluoruro halladas con los datos de consumo de alimentos obtenidos en la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE, 2011). La encuesta, representativa del consumo de la población adulta española, ha utilizado la historia dietética de tres días para obtener los datos de consumo de alimentos y proporciona datos de consumo medio diario (g/día/persona) considerando

la población total (consumidora y no consumidora), así como datos de consumos extremos (99%).

Las agrupaciones de alimentos realizadas en el estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana no son totalmente coincidentes con las que figuran en la ENIDE, y por ello sólo se han evaluado las ingestas de aquellos productos que cuentan con datos de consumo. En el caso de las agrupaciones de productos pesqueros, por ejemplo sardina-boquerón, se ha considerado la misma concentración de fluoruro para ambos productos, y el dato de consumo de cada uno de ellos aportado por la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética.

La tabla 2 muestra las ingestas de fluoruro calculadas. El arroz es el producto que aporta más fluoruro a la ingesta de la población total (48 $\mu\text{g}/\text{día}$). Los productos de la pesca que contribuyen en mayor medida a la ingesta son gamba, sardina y boquerón (10-24 $\mu\text{g}/\text{día}$). Los consumidores extremos de estos productos pesqueros o de arroz alcanzan ingestas de fluoruro entre 274 y 412 $\mu\text{g}/\text{día}$. Los menores aportes ($< 2 \mu\text{g}/\text{día}$) provienen del consumo de emperador y pez espada, salazones de pescado, lubina y cigalas. Considerando la totalidad de los alimentos analizados (tabla 2), la ingesta de fluoruro alcanza los 120 $\mu\text{g}/\text{día}$, de los cuales el aporte de los productos de la pesca es de 72 $\mu\text{g}/\text{día}$.

	Fluoruro ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) (a)	Consumo g/día (b)		Ingestas ($\mu\text{g/día}$)	
		Media	Extremo (99%)	Media	Extrema (99%)
Cereales					
Arroz	2.31	20.8	160	48.0	370
Productos de la pesca					
Sardina	4.12	3.58	100	14.7	412
Boquerón	4.12	2.45	66.67	10.1	274
Dorada	1.04	2.89	100	3.01	104
Lubina	1.04	0.91	50	0.946	52
Bonito y atún	0.712	1.62	50	1.150	36
Emperador y pez espada	0.729	1.97	65	1.44	47
Salmón	0.407	2.99	68.33	1.22	28
Trucha	0.407	1.27	56.67	0.517	23
Salazones de pescado	3.96	0.39	13.33	1.54	53
Mejillones	1	3.15	66.67	3.15	67
Calamar y sepia	0.692	7.85	100	5.43	69
Gamba	4.77	5.07	72.08	24.2	344
Cigala	4.77	0.34	16.67	1.62	79
Langostino	4.77	1.28	40	6.11	192

Tabla 2. Ingesta de fluoruro a través del consumo de productos de la pesca y arroz.
(a) Concentraciones medias de fluoruro halladas en los distintos productos (tabla 1);
(b) Datos de consumo obtenidos de ENIDE (2011).

1.3. Alimentos cocinados procedentes de áreas con contaminación natural por fluoruro

Los alimentos objeto de estudio (n=29) son muestras de alimentos sólidos pertenecientes a raciones alimentarias duplicadas del desayuno y de la comida servidas durante varios días en escuelas de poblaciones rurales cercanas a la localidad Taco Pozo, en la provincia de Chaco (Argentina). En todas las escuelas los desayunos consistieron en una porción de pan y los almuerzos incluyeron en la mayoría de los casos un cocido de pasta con carne.

La tabla 3 muestra el rango y la media de las concentraciones de fluoruro en los desayunos y comidas recogidas en cada una de las escuelas. Las concentraciones de fluoruro encontradas en los desayunos oscilan entre 0.895 y 1.97 mg/kg peso fresco, siendo el rango ligeramente superior en las comidas (0.782 a 2.98 mg/kg peso fresco).

		Fluoruro (mg/kg peso fresco)	
Localidad	Muestra	Rango	Media \pm SD
El Quinto	Desayuno (n=3)	1.62-1.97	1.78 \pm 0.18
	Almuerzo (n=3)	1.25-2.98	1.88 \pm 0.96
San Telmo	Almuerzo (n=4)	0.898-1.03	0.972 \pm 0.061
Rosillo	Desayuno (n=3)	0.895-1.29	1.10 \pm 0.20
	Almuerzo (n=4)	0.782-1.47	1.07 \pm 0.36
Carballo	Desayuno (n=2)	1.15-1.16	1.16 \pm 0.01
	Almuerzo (n=4)	1.40-2.68	1.93 \pm 0.58
Brasil	Desayuno (n=3)	1.15-1.33	1.23 \pm 0.09
	Almuerzo (n=3)	1.79-2.03	1.91 \pm 0.17

Tabla 3. Concentraciones de fluoruro en alimentos recogidos en las escuelas de la provincia de Chaco (Argentina). Valores expresados como mg/kg peso fresco.

Con los datos de contenidos y el consumo medio de los alimentos informado por la población (45 g de pan en el desayuno y 300 g del alimento que constituye la comida), se ha calculado la ingesta de fluoruro (tabla 4). Los desayunos aportan entre 50 y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$, y las comidas entre 292 y 579 $\mu\text{g}/\text{día}$. Ambas raciones aportarían entre 371 y 644 $\mu\text{g}/\text{día}$. En las zonas estudiadas es habitual que en la merienda se ingieran los mismos productos que en el desayuno, y que en la cena se consuma el mismo plato que en la comida, por lo que la ingesta de fluoruro se duplicaría alcanzando valores entre 583 y 1288 $\mu\text{g}/\text{día}$. A esta ingesta debería sumarse el aporte del agua de bebida y del mate, infusión muy consumida en la zona incluso por la población infantil.

Localidad	Ingesta de fluoruro ($\mu\text{g}/\text{día}$)	
	Desayuno	Almuerzo
El Quinto	80 ± 8	564 ± 288
San Telmo	n.a	292 ± 18
Rosillo	50 ± 9	321 ± 108
Carballo	52 ± 1	579 ± 174
Brasil	55 ± 4	573 ± 51

Tabla 4. Ingesta media de fluoruro a través de los alimentos consumidos en el desayuno y en la comida para las diferentes localidades argentinas estudiadas. Valores expresados como $\mu\text{g}/\text{día}$. n.a: no analizado.

Las concentraciones de fluoruro halladas en los alimentos cocinados podrían ser atribuibles tanto al contenido existente en el alimento crudo como a un aporte de fluoruro a través del proceso de elaboración del alimento. El agua utilizada para cocinar podría contribuir de forma muy significativa a la concentración existente en el producto listo para el consumo, y por lo tanto, a la ingesta de fluoruro por la población de la zona. Por este motivo, se han analizado las muestras de agua utilizadas para elaborar los alimentos y que proceden de pozos o de aljibes. Las concentraciones de fluoruro halladas en las aguas (tabla 5) oscilan entre 1.30 y 3.50 mg/L, encontrándose mayoritariamente por encima del valor máximo recomendado por la OMS (1.5 mg/L; OMS, 2006).

Localidad	Localidad	Fluoruro (mg/L)
El Rosillo	Aljibe de la escuela	3.00
San Telmo	Aljibe de la escuela	2.70
	Agua del pozo	1.30
Brasil	Agua de pozo 1	3.50
	Agua del pozo 2	2.20
El Quinto	Agua de pozo	3.40
Carballo	Aljibe domicilio particular	3.30
	Agua de pozo	2.20

Tabla 5. Concentración de fluoruro en muestras de agua consumidas en las poblaciones argentinas objeto de estudio. Valores expresados como mg/L.

1.4. Efecto del cocinado sobre la concentración de fluoruro en alimentos

El estudio se ha realizado en muestras de arroz, alubias y pasta cocinada con agua con 6 mg/L de fluoruro. La proporción muestra-agua utilizada para la cocción ha sido 1-8 para la pasta y 1-4 para el arroz y las alubias. Las muestras de alubias se han sometido a una etapa previa de remojo con agua con fluoruro durante 10 horas.

La figura 2 muestra las concentraciones halladas en los productos crudos y cocinados, expresadas en mg/kg de peso seco con objeto de poder realizar comparaciones. Se pone de manifiesto que el cocinado produce un gran incremento en el contenido de fluoruro en todos los productos. Este incremento es superior en alubias (48 veces) que en arroz y pasta (22 veces). Si las concentraciones de fluoruro se expresan en peso húmedo, los valores tras el cocinado son de 3.59 mg/kg en arroz cocinado, 4.77 mg/kg en pasta cocinada y 8.54 mg/kg en alubias cocinadas.

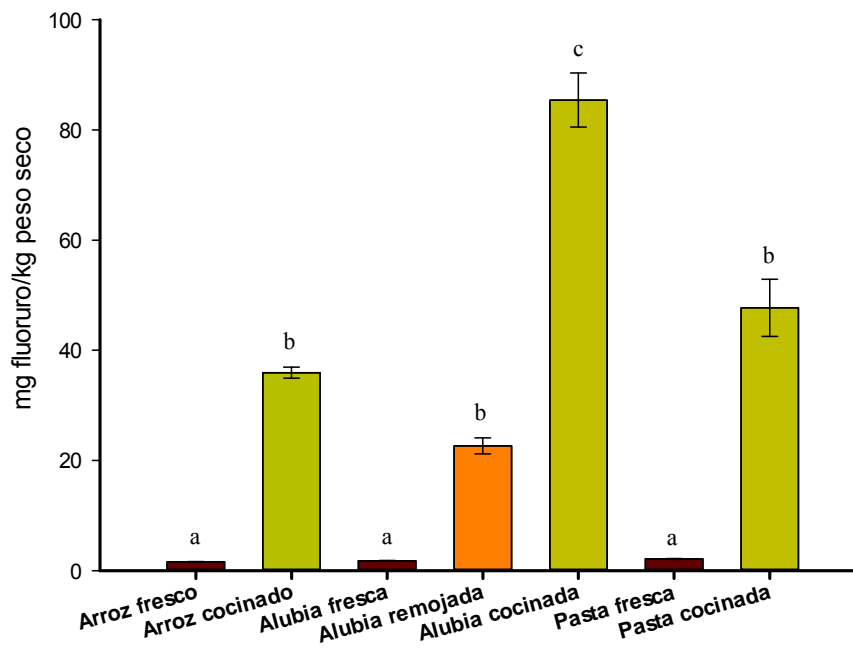


Figura 2. Efecto del cocinado de cereales y legumbres en agua con 6 mg/L de fluoruro. Valores expresados como mg/kg peso seco (media \pm desviación estándar; n=3). Las diferentes letras en las barras para un mismo alimento indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

2. Bioaccesibilidad de fluoruro desde alimentos

2.1. Características analíticas del método de digestión gastrointestinal

El método de digestión gastrointestinal *in vitro* aplicado en este trabajo ha sido previamente utilizado para el estudio de la bioaccesibilidad de contaminantes (Hg, As, Cd) y nutrientes (Se, Ca, Fe) (Cámara y col., 2005; Moreda-Piñeiro y col., 2011, 2012). No se trata pues de un desarrollo metodológico novedoso, pero dado que no existen datos previos sobre su uso

para el estudio de la bioaccesibilidad de fluoruro, ha sido necesario evaluar la idoneidad del método mediante la determinación de sus características analíticas.

Se ha determinado el fluoruro aportado por los reactivos utilizados en la totalidad del método, que incluye tanto la digestión gastrointestinal como la cuantificación por ISE. El contenido de fluoruro de los blancos presenta un valor medio de 0.034 ± 0.006 $\mu\text{g/mL}$ de digerido gastrointestinal, equivalente a 0.343 ± 0.057 mg/kg de muestra fresca. Este aporte de los reactivos no es despreciable y debe ser considerado al evaluar la concentración de fluoruro solubilizado desde las muestras.

Para la determinación del límite de detección se han analizado 16 blancos en condiciones de precisión intermedia (reproducibilidad intra-laboratorio). El LD, calculado como tres veces la desviación estándar del análisis de estos blancos, es de 0.172 mg de fluoruro/ kg de muestra. El LQ, calculado como diez veces la desviación estándar de los blancos, es de 0.517 mg de fluoruro/ kg de muestra.

La precisión del método ha sido evaluada en condiciones de repetibilidad en cuatro muestras con diferentes concentraciones de fluoruro bioaccesible. Cada muestra ha sido analizada por triplicado. La precisión, expresada como desviación estándar relativa de los resultados del ensayo, es aceptable con valores que oscilan entre 2 y 10% (tabla 6).

Muestra	Fluoruro bioaccesible (mg/kg producto)	CV (%)
Sardina-boquerón	14.5	2
Boquerón	4.8	10
Quisquilla	3.7	4
Gamba-cigala-langostino	26.7	6

Tabla 6. Precisión del método utilizado para evaluar la bioaccesibilidad de fluoruro desde productos de la pesca.

La exactitud del método de bioaccesibilidad no puede evaluarse según los protocolos habituales. No existen materiales de referencia para el método de bioaccesibilidad por lo que no puede utilizarse este procedimiento para estimar la recuperación. Por otra parte, la alternativa de adicionar fluoruro sobre la muestra no es adecuada, ya que las interacciones muestra-fluoruro adicionado, así como las condiciones del método podrían producir la precipitación del elemento durante las etapas gástrica e intestinal, dando lugar a bajas recuperaciones del fluoruro en la fracción bioaccesible que no son indicativas de un método no aceptable. Por estas razones, se ha ensayado la recuperación en ausencia de muestra. Así, se ha aplicado el método de digestión gastrointestinal simulada a patrones de fluoruro de concentraciones que abarcan el contenido habitual en alimentos (1, 5, 10 y 20 mg/L). Cada patrón se ha ensayado por triplicado en condiciones de repetibilidad. El análisis de la fracción soluble mediante ISE se ha llevado a cabo frente a una curva de calibrado con patrones acuosos. Las recuperaciones son aceptables en todo el rango de concentraciones ensayado ($102\pm 1\%$ para 1 mg/L; $101\pm 2\%$ para 5 mg/L; $101\pm 4\%$ para 10 mg/L; $95\pm 4\%$ para 20 mg/L). Este

resultado pone de manifiesto que los parámetros físicos (temperatura, agitación, filtración) y químicos (pH, enzimas, sales biliares), no afectan negativamente a la cuantificación del fluoruro bioaccesible.

Se han realizado dos evaluaciones adicionales de la metodología. Se ha calculado el balance de masas del proceso de digestión gastrointestinal, comparando el fluoruro en la muestra con el presente en la fracción bioaccesible y en el residuo de la digestión. Los resultados en las dos muestras ensayadas (boquerón y quisquilla) indican recuperaciones completas, superiores al 97% para ambas muestras. Por otra parte, mediante la adición de patrones de fluoruro a la fracción soluble obtenida de dos muestras (boquerón y sardina), se ha comprobado la ausencia de interferencias en la cuantificación por ISE.

2.2. Bioaccesibilidad de fluoruro desde alimentos

El método de digestión gastrointestinal ha sido aplicado a muestras de productos de la pesca liofilizados procedentes del estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana y a raciones de alimentos recogidas en las escuelas argentinas.

Por lo que respecta a los productos de la pesca (tabla 7), las concentraciones de fluoruro bioaccesible varían entre 0.398 y 4.08 mg/kg de peso fresco. La bioaccesibilidad es muy variable, con porcentajes que oscilan entre 53% y 87%.

Fluoruro (mg/kg peso fresco)			
Muestra	Muestra	Fracción bioaccesible	Bioaccesibilidad (%)
Sardina y boquerón	4.70 ± 0.178	4.08 ± 0.01	87
	2.10 ± 0.113	1.60 ± 0.17	76
Dorada y lubina	1.32 ± 0.13	1.06 ± 0.06	80
Pescado blanco	0.787 ± 0.029	0.420 ± 0.013	53
Emperador y pez espada	0.724 ± 0.105	0.454 ± 0.053	63
Bonito y atún	0.526 ± 0.081	0.398 ± 0.034	76
Calamar y sepia	0.647 ± 0.021	0.523 ± 0.029	81
Mejillones	0.749 ± 0.060	0.429 ± 0.022	57

Tabla 7. Concentración de fluoruro en la muestra y en la fracción bioaccesible y bioaccesibilidad en productos de la pesca liofilizados. Valores expresados como media ± desviación estándar (n=2).

En las muestras de almuerzos y desayunos de las escuelas argentinas (tabla 8), la concentración de fluoruro en la fracción bioaccesible oscila entre 0.429 y 1.69 mg/kg peso fresco. La bioaccesibilidad varía entre 32 y 103%, un rango más amplio que el observado en los productos de la pesca. La mediana de la bioaccesibilidad, sin embargo, está muy próxima en ambos tipos de muestras: alimentos cocinados de las escuelas (74±20%); productos de la pesca (76±12%).

		Fluoruro bioaccesible (mg/kg peso fresco)		
Localidad	Muestra	Rango	Media \pm SD	Rango bioaccesibilidad
El Quinto	Desayuno (n=3)	1.39-1.69	1.66 \pm 0.23	86-103 %
	Almuerzo (n=3)	0.895-1.62	1.28 \pm 0.36	54-95 %
San Telmo	Almuerzo (n=4)	0.668-0.948	0.785 \pm 0.116	69-94 %
Rosillo	Almuerzo (n=3)	0.429-1.11	0.784 \pm 0.341	48-86 %
	Almuerzo (n=4)	0.555-1.38	0.609 \pm 0.076	58-94 %
Carballo	Desayuno (n=2)	0.704-0.884	0.794 \pm 0.127	61-76 %
	Almuerzo (n=4)	1.20-1.87	1.468 \pm 0.286	45-94 %
Brasil	Desayuno (n=3)	0.580-0.893	0.774 \pm 0.202	49-74 %
	Almuerzo (n=3)	0.573-0.703	0.648 \pm 0.067	32-38 %

Tabla 8. Concentración de fluoruro en la fracción bioaccesible (rango y media \pm desviación estándar) y bioaccesibilidad de fluoruro en alimentos procedentes de las escuelas argentinas.

DISCUSIÓN

El fluoruro, como muchos otros elementos, presenta efectos beneficiosos y tóxicos para el ser humano en función de la dosis de exposición. Su ingesta en dosis que oscilan entre 0.01 mg/día para niños menores de seis meses y 4 mg/día para adultos, previene la caries dental (IOM, 1997). Por el contrario, la ingesta de 10 mg/día durante periodos prolongados, al menos de 10 años, pueden producir fluorosis esquelética (IOM, 1997).

Los contenidos de fluoruro en el agua de bebida se emplean como el primer indicador de un posible riesgo asociado a su ingesta, mientras que el aporte de los alimentos no suele ser objeto de estudio. Este elemento no está generalmente incluido en los planes de vigilancia de la seguridad alimentaria que establecen los organismos pertinentes de cada país, por lo que la información disponible no es abundante. Estados Unidos y Canadá han llevado a cabo estudios sobre fluoruro en la dieta en distintos periodos de tiempo (Health Canada, 2010; US EPA, 2010). Otros países cuentan con investigaciones puntuales (EFSA, 2005). España no dispone de datos sobre ingestas de fluoruro y la información científica publicada sobre fluoruro en alimentos es muy escasa. Los estudios de Dieta Total que están llevando a cabo Comunidades Autónomas como Cataluña, País Vasco y la Comunidad Valenciana, permiten disponer de muestras idóneas para generar datos de fluoruro en alimentos consumidos en España, representativos de la ingesta real de la población.

Generalmente las muestras de alimentos destinadas al análisis se conservan en el laboratorio en refrigeración, congelación o bien tras ser sometidas a un proceso de liofilización. Esta última técnica supone un coste adicional, pero es recomendable para el análisis de minerales y elementos traza ya que concentra los analitos. El efecto de este proceso sobre micronutrientes ha sido objeto de diversas investigaciones (Maher, 1983; George y col., 2011). Se ha evidenciado la pérdida de Cr durante la liofilización de algas y animales marinos, si bien los cambios no son significativos para otros elementos (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sb y Zn) (Maher, 1983). Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis, suponen el primer aporte acerca del comportamiento del fluoruro presente en los alimentos durante el proceso de liofilización e indican que no hay pérdidas. Teniendo en cuenta el bajo contenido de fluoruro de gran parte de

los alimentos es conveniente aplicar este proceso de concentración previo a su análisis.

Las muestras incluidas en el estudio de Dieta Total de la Comunidad Valenciana han sido analizadas con el objeto de aportar los primeros datos sobre concentración de fluoruro en productos de origen vegetal y en productos de la pesca comercializados en España. Los contenidos en frutas y vegetales son inferiores a 0.5 mg/kg peso fresco, valores coincidentes con los descritos en la bibliografía (Jin y col., 2000; Fawell y col., 2006; Casarin y col., 2007; US EPA, 2010; Paul, 2011). En el arroz, la concentración media (2.31 mg/kg peso fresco) también está dentro de los valores habituales en este cereal (Chen y col., 1997; Buzalaf y col., 2004). La presencia de fluoruro en los productos vegetales depende de factores como el pH del suelo, las condiciones de crecimiento y la concentración de fluoruro en el agua de riego (Malde y col., 1997). La mayor concentración de fluoruro en arroz que en el resto de productos de origen vegetal podría deberse al empleo de fluoruro de sulfuro para el control de las plagas de insectos durante su almacenamiento y procesado. Este producto está registrado en Estados Unidos y en muchos países de Europa, entre ellos España, para el uso en granos de cereales, fruta deshidratada y frutos secos con una dosis máxima recomendada de 1500 g horas/L (FAO, 2005). Para el arroz, el límite máximo residual (MRL) de fluoruro de sulfuro es de 0.04 mg/kg y para el fluoruro inorgánico de 10 mg/kg. Los valores de fluoruro encontrados en arroz blanco tras la fumigación con el fluoruro de sulfuro oscilan entre 1.54 y 16.1 mg/kg, dependiendo de la dosis administrada (APVMA, 2007).

En los productos de la pesca, las concentraciones de fluoruro más elevadas las aportan las muestras de gamba-cigala-langostino, sardina-boquerón y salazones de pescado. La alta concentración hallada en los salazones de pescado podría ser atribuible al fluoruro aportado por la sal

utilizada en el proceso. Generalmente se utiliza sal marina no refinada, que además de NaCl contiene trazas de fluoruro, en cantidad variable en función del origen del agua de mar (Rao, 1971). En cuanto a las muestras de sardina-boquerón cabe la posibilidad de que la eliminación del tejido esquelético no haya sido completa debido a su pequeño tamaño. Estos restos óseos presentan concentraciones de fluoruro muy superiores a las del músculo del pescado (Malde y col., 1997). Por lo que respecta a los crustáceos, existen antecedentes que indican que sus concentraciones en fluoruro son siempre superiores a la de otros productos de la pesca. (USDA, 2004). Las altas concentraciones podrían ser consecuencia de la presencia de restos de exoesqueleto o hepatopáncreas en la muestra destinada al análisis, donde las concentraciones de fluoruro también son superiores a las del músculo (Malde y col., 1997).

Un grupo que no se ha considerado en el estudio de Dieta Total es el de las conservas de pescado. Recientemente, Usydyus y col. (2008) han descrito concentraciones muy elevadas de fluoruro en conservas de pescados en aceite o en salsa de tomate (15.4 a 28.8 mg/kg peso fresco). Sería interesante contemplar este grupo de alimentos en próximas investigaciones, ya que el consumo medio de conservas en España (14.70 g/día) es similar al de pescados grasos (15.68 g/día), y sólo es superado por el consumo de pescado magro (41.41 g/día).

La ingesta de fluoruro estimada a partir de los datos de contenidos analizados en el presente capítulo indican que la ingesta de fluoruro a través del consumo de productos de la pesca y arroz alcanza 0.12 mg/día. Esta ingesta es similar a la descrita para la población adulta de Estados Unidos y Canadá a partir de los alimentos sólidos (0.10 a 0.39 mg/día; Health Canada 2010; US EPA, 2010). La Sociedad Española de Nutrición Comunitaria ha marcado como objetivo nutricional para la población española una ingesta de

fluoruro de 1 mg/día (Serra-Majem y Aranceta, 2001). El consumo de productos de la pesca y arroz puede suponer un 12% de esta ingesta recomendada.

La escasa información sobre fluoruro en alimentos consumidos en la mayoría de los países, contrasta con la abundancia de datos para zonas en las que existe una contaminación de origen natural por este elemento. Asia y África, disponen de numerosos estudios de exposición poblacional a fluoruro. En Iberoamérica, países como México, Chile y Brasil cuentan con estudios que evalúan la ingesta de fluoruro a través de agua y/o alimentos, su excreción urinaria así como su efecto sobre la aparición de caries en la población infantil (Martínez-Mier y col., 2003; Villa y col., 2008; Miziara y col., 2009). En Argentina, sin embargo, se han realizado mayoritariamente estudios de carácter medioambiental (Smedley y col., 2002; Ávila-Carreras y col., 2008; Martínez y col., 2012), donde se han identificado regiones con altas concentraciones de fluoruro en agua: La Pampa, Buenos Aires, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fé, Córdoba y Jujuy. Sin embargo, no existen estudios que determinen los contenidos de fluoruro en alimentos consumidos por la población y en los que se evalúe la ingesta de este elemento.

En la presente tesis se ha analizado el aporte de fluoruro a través de los alimentos consumidos en un área de la provincia de Chaco en la que las aguas subterráneas, que constituyen la única fuente de agua disponible, contienen elevadas concentraciones de este elemento. Las concentraciones de fluoruro en los alimentos oscilan entre 0.782 y 2.03 mg/kg peso fresco, valores muy superiores a los reportados para este tipo de producto alimentario en zonas no contaminadas (Viswanathan y col., 2010). Esto podría atribuirse al aporte de fluoruro por el agua utilizada en la preparación del alimento, la cual contiene entre 1.30 y 3.50 mg/L. Este efecto ha sido

descrito por Casarin y col. (2007) y Viswanathan y col. (2010), y confirmado en la presente tesis empleando matrices alimentarias similares a las consumidas por la población argentina. El consumo de estos alimentos podría dar lugar a ingestas de fluoruro de hasta 1.29 mg/día, muy superiores a las estimadas para los consumidores de la Comunidad Valenciana. Esta ingesta se halla dentro de las recomendaciones emitidas por National Research Council de Canadá para niños menores de 12 años (2.5 mg/día; Health Canada, 2010). Los alimentos argentinos aportarían el 50% de esta recomendación, mientras que en la población española estudiada los alimentos sólo contribuirían con un 5% al valor recomendado. La situación de esta población infantil argentina no sería preocupante, si al consumo de los alimentos no se añadiese la ingesta realizada a través del agua, al menos 1 litro diario, y de las bebidas preparadas con agua, como la infusión de mate de la que los niños consumen al menos 250 mL/día y la leche reconstituida a partir de leche en polvo. Considerando la elevada concentración de fluoruro en el agua, las altas temperaturas que en la zona se alcanza en la época estival y la intensa actividad física de los niños que conlleva un incremento en el consumo de agua, es muy probable que la ingesta alcance valores muy elevados. Podría llegar a superarse el valor de 0.2 mg/kg peso corporal/día (equivalente a 6 mg/día para un niño de 30 kg de peso), valor a partir del cual pueden manifestarse efectos adversos asociados con la fluorosis esquelética (Health Canada, 2010). Los efectos adversos en forma de fluorosis dental ya se observan en la población infantil de esta zona.

Como se ha descrito en la introducción de la tesis, los datos de contenidos de fluoruro en los alimentos, aún utilizándose como indicadores de riesgo/beneficio, no están exentos de sesgo. Las etapas de solubilización del fluoruro desde el alimento y de absorción a través del epitelio intestinal, condicionan, entre otros procesos, la cantidad de fluoruro que llega a torrente

circulatorio y ejerce su acción. Se ha evaluado en este capítulo la bioaccesibilidad de fluoruro desde los productos de la pesca; parámetro indicativo de la máxima biodisponibilidad oral, es decir de la cantidad máxima del elemento que puede ser absorbida tras su paso por el tracto digestivo.

Los antecedentes sobre solubilización de fluoruro desde los alimentos se reducen al estudio realizado por Buzalaf y col. (2004) en cereales infantiles, bebidas y galletas. Los autores, que únicamente emulan la etapa gástrica de la digestión, encuentran grandes diferencias de solubilización entre muestras (20-100%). La bioaccesibilidad de fluoruro evaluada en este capítulo para los productos de la pesca oscila entre el 53% y el 87%, mientras que en los alimentos de Argentina varía entre el 32% y el 103%. En ambos casos, la bioaccesibilidad introduce un cambio en la estimación del riesgo/beneficio respecto a la obtenida al considerar los contenidos en el alimento, ya que disminuye el nivel de exposición. La variabilidad en los valores de bioaccesibilidad entre productos alimentarios y entre muestras de un mismo producto alimentario podría ser consecuencia de la composición mineral de la muestra. Se sabe que a pH próximos a la neutralidad el fluoruro forma complejos insolubles con cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Al^{+3} . Estos cationes están presentes en la mayor parte de los alimentos, si bien a concentraciones muy diferentes, lo cual podría condicionar la solubilidad del fluoruro y por lo tanto, su posterior absorción por el epitelio intestinal. Como afectan estos minerales a la solubilización de fluoruro, así como el efecto de otros factores del proceso gastrointestinal, son objeto de estudio en el próximo capítulo de tesis.

Capítulo 3

Factores que afectan a la bioaccesibilidad del fluoruro

Los métodos *in vitro* para llevar a cabo ensayos de bioaccesibilidad suelen ser métodos estáticos, donde las condiciones de ensayo permanecen fijas a lo largo de la simulación digestiva. Estos métodos son ampliamente empleados debido a su sencillez, pero *in vivo* las condiciones se modifican durante el proceso digestivo, y estos cambios pueden afectar la solubilización final del compuesto en estudio. En este capítulo se ha evaluado el efecto de las modificaciones de algunos parámetros sobre la solubilización de fluoruro.

Según se ha puesto de manifiesto en el capítulo 2 de esta tesis, los productos de la pesca presentan concentraciones de fluoruro superiores a las de otros grupos de alimentos. Con respecto a la bioaccesibilidad de este elemento, las concentraciones solubilizadas son especialmente elevadas en las muestras de boquerón, sardina y crustáceos (> 1 mg/kg de peso fresco). Por ello, estas especies constituyen matrices idóneas para evaluar el efecto que determinados factores (pH, pepsina, sales biliares y presencia de cationes) podrían ejercer sobre la solubilización de fluoruro desde los alimentos. Para llevar a cabo esta investigación se han utilizado muestras cocinadas (sardina, boquerón, gamba, quisquilla y pejerrey) compradas en supermercados de la ciudad de Valencia.

RESULTADOS

1. Influencia de la etapa digestiva sobre la bioaccesibilidad de fluoruro

Con el objeto de conocer la etapa de la digestión (gástrica o intestinal) determinante en la bioaccesibilidad de fluoruro, se ha evaluado su solubilización en la etapa gástrica y tras la digestión gastrointestinal completa de distintas muestras de productos de la pesca (figura 1). Los resultados muestran que la etapa gástrica solubiliza un porcentaje muy variable del fluoruro presente en las muestras, desde un 25% en sardinas hasta un 94% en boquerón. La etapa intestinal produce un descenso significativo de la solubilización respecto a la etapa gástrica en todas las muestras analizadas (56 ± 13 %), por lo que la bioaccesibilidad del fluoruro tras la aplicación de la digestión gastrointestinal completa oscila entre 9% (sardina) y 54% (boquerón).

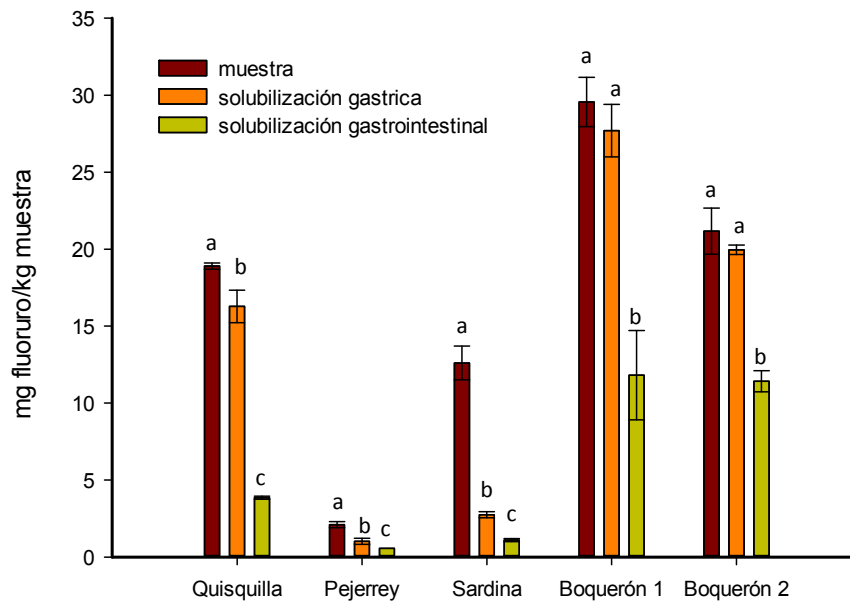


Figura 1. Influencia de la etapa del proceso digestivo sobre el contenido de fluoruro solubilizado en muestras de pescados y crustáceos. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, $n=3$). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

2. Influencia del pH de la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de fluoruro

La mayoría de los métodos estáticos de digestión gastrointestinal utilizan pH 2 durante la etapa gástrica. No obstante, tras una ingesta de alimentos se produce un aumento del pH estomacal, que dependiendo del alimento y el individuo puede llegar a alcanzar valores cercanos a la neutralidad en los primeros momentos (Dressman y col., 1990; Oomen y col., 2002). En el presente estudio se ha evaluado el efecto de distintos valores de pH (2, 3, 4, 5 y 6) sobre la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica. La figura 2 muestra el fluoruro solubilizado a los distintos pHs ensayados. En las

muestras de sardina, boquerón y quisquilla el aumento del pH produce un importante descenso de la solubilización, de forma que a pH 6 menos del 13% del fluoruro presente inicialmente en la muestra aparece en la fracción soluble. En la muestra de gamba el cambio de pH produce un descenso progresivo de la solubilización (81% a pH 2; 50% a pH 6), si bien las variaciones son menos drásticas.

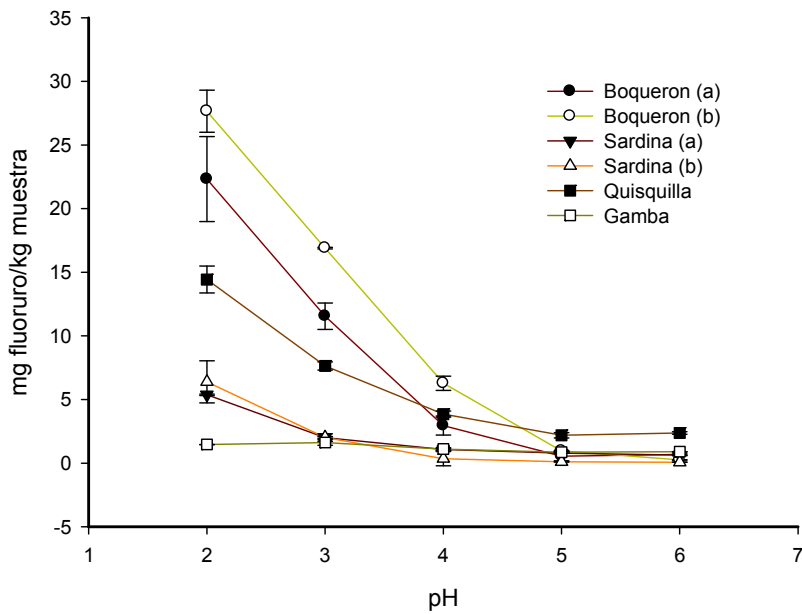


Figura 2. Influencia del pH sobre la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica desde pescados y crustáceos. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, n=3).

3. Influencia de la concentración de pepsina de la etapa gástrica sobre la bioaccesibilidad de fluoruro

La concentración habitual de pepsina utilizada en los modelos estáticos *in vitro* (0.1-0.2 mg/mL; Oomen y col., 2002; Laparra y col., 2003) es la presente en el estómago en ayunas, pero no emula lo que ocurre tras la ingesta de alimentos. Investigaciones previas indican que el contenido de pepsina aumenta tras la ingesta de alimentos (Kalantzi y col., 2006). Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de pepsina sobre la solubilización de fluoruro, se ha analizado la bioaccesibilidad de este elemento en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de pepsina en la etapa gástrica.

La figura 3 muestra las concentraciones de fluoruro solubilizadas en la etapa gástrica con las distintas concentraciones de pepsina ensayadas. En ausencia de pepsina se produce una solubilización importante de fluoruro, que oscilan entre el 50% y el 80% del máximo solubilizado en presencia de pepsina, lo cual muestra que no es un factor determinante en la liberación del fluoruro desde la matriz. Por otro lado, el aumento de la concentración de pepsina no supone una mayor solubilización del fluoruro, hecho que confirma su escasa influencia en la bioaccesibilidad de este elemento desde productos pesqueros.

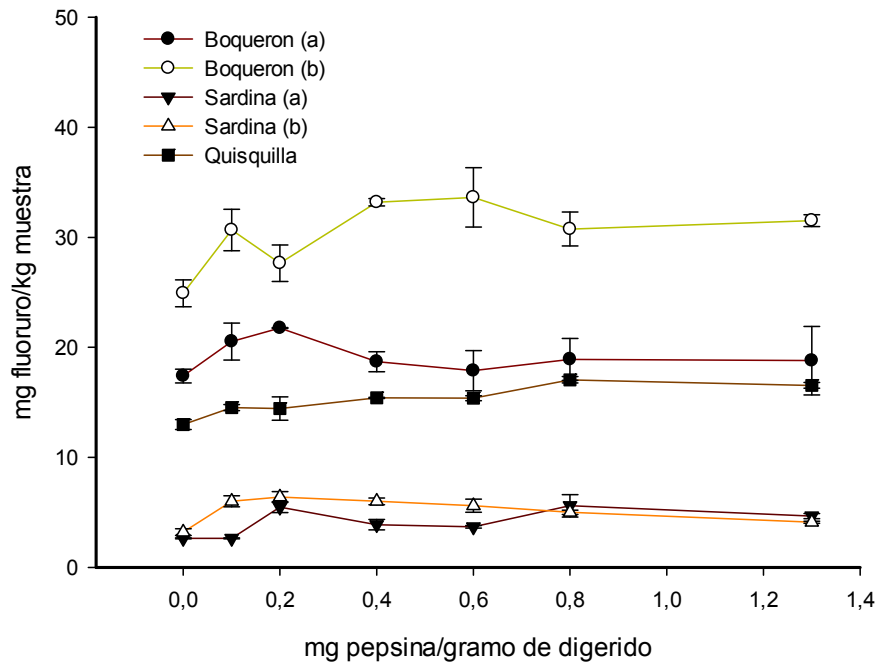


Figura 3. Influencia de la concentración de pepsina sobre la solubilización de fluoruro en la etapa gástrica en muestras de pescados y crustáceos. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, n=3).

4. Efecto de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la bioaccesibilidad de fluoruro

El fluoruro tiene gran afinidad por cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} . Tanto los productos de la pesca como el resto de alimentos que son consumidos durante una comida aportan estos cationes, en ocasiones en cantidades importantes. Estos elementos podrían afectar a la solubilización del fluoruro desde los productos de la pesca al formar sales insolubles.

Con objeto de evaluar este efecto se ha llevado a cabo la digestión gastrointestinal de dos muestras cocinadas de pescado (sardina y boquerón)

tras la adición de estos cationes. Las adiciones de cationes se han realizado en base a las concentraciones halladas en otros alimentos que podrían ser consumidos junto a los productos de la pesca. Así, para el Ca^{+2} se ha realizado una adición 25 mM, equivalente en las condiciones de peso de muestra y de volumen de digestión aplicadas en el método, al aporte de un producto que contenga 1000 mg de Ca^{+2} por 100 g de producto, cantidad que puede ser aportada por determinados productos lácteos. Para el Mg^{+2} , la adición ha sido de 10 mM, equivalente a 400 mg/100 g de producto, cantidad que puede ser aportada por frutos secos. En el caso Fe^{+3} , la adición de 0.09 mM equivale al consumo de alimentos que contengan 5 mg/100 g de producto, cantidad aportada por algunas legumbres. Finalmente, para el Al^{+3} se ha adicionado 0.019 mM que equivale a 0.5 mg/100 g de producto, concentraciones que puede encontrarse en pan, tartas, pasteles y algunas verduras (champiñones, espinacas, rábanos). Por otra parte, los productos de la pesca también contienen cantidades apreciables de calcio (314 mg/100 g de producto), magnesio (49 mg/100 g de producto) y hierro (3 mg/100 g de producto) (BEDCA, 2012).

Las figuras 4 y 5 muestran el fluoruro solubilizado en ambas etapas digestivas en presencia de cationes. Los resultados obtenidos evidencian que durante la etapa gástrica, los cationes no tiene un gran efecto sobre la solubilización de fluoruro; únicamente Mg^{+2} y Al^{+3} producen un ligero descenso en la muestra de boquerón (16%). Por lo que respecta a la etapa intestinal, todos los cationes afectan significativamente a la solubilización de fluoruro. Para el boquerón la solubilización disminuye en el siguiente orden: Fe^{+3} (18%) < Al^{+3} (35%) < Mg^{+2} (42%) < Ca^{+2} (65%). En la muestra de sardina la solubilización se reduce de forma más acentuada en presencia de Ca^{+2} (55%) que de los otros cationes (15-19%).

Los cationes ensayados pueden producir interferencias en la lectura por ISE, que podrían conllevar una subestimación de las concentraciones reales de fluoruro en la fracción bioaccesible. Así, los descensos de bioaccesibilidad observados en presencia de estos cationes podrían ser consecuencia de un problema analítico. En este ensayo se ha comprobado mediante el método de adición, que esta disminución no es resultado de interferencias en la cuantificación por ISE.

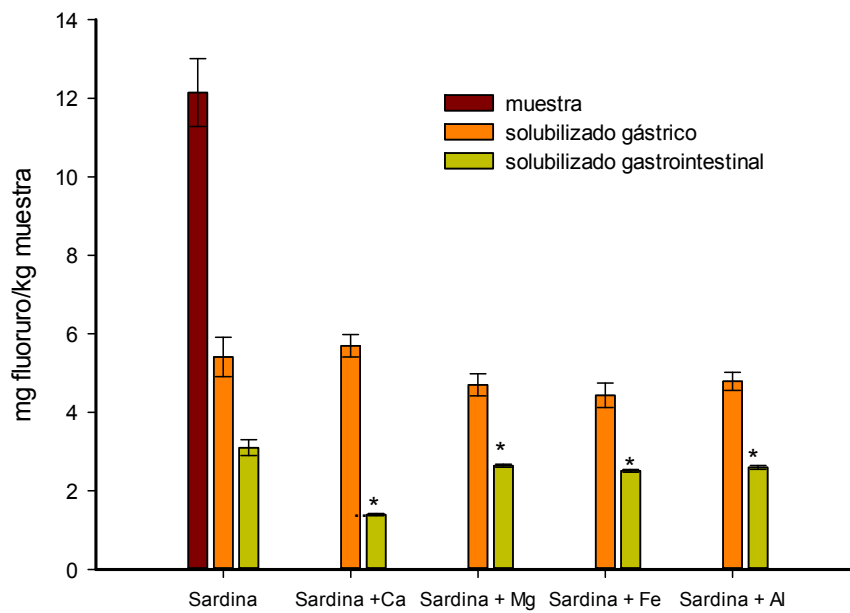


Figura 4. Influencia de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la solubilización de fluoruro desde sardina. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al bioaccesible obtenido sin adición de cationes ($p < 0.05$).

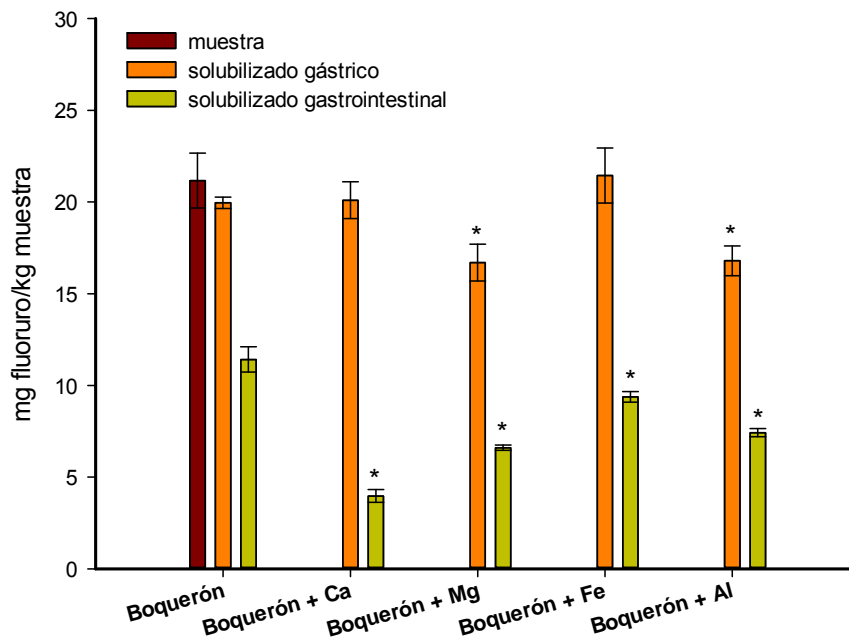


Figura 5. Influencia de la presencia de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} sobre la solubilización de fluoruro desde boquerón. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, n=3). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al bioaccesible obtenido sin adición de cationes ($p < 0.05$).

5. Efecto de la concentración de sales biliares sobre la solubilización de fluoruro

La concentración de sales biliares varía a lo largo de la digestión intestinal. Según Northfield y McColl (1973) y Heaton (1985), la concentración de la sales biliares tras una comida se incrementa bruscamente hasta valores de 15 mmoles/L y disminuye progresivamente hasta 4-6 mmoles/L. Teniendo en cuenta el importante contenido en grasas de algunos

de los productos pesqueros ricos en fluoruro, se ha considerado importante evaluar el efecto de la concentración de sales biliares en la solubilización de este elemento durante la etapa intestinal. Para tal fin, se ha utilizado una muestra de pescado graso (sardina) y una muestra de crustáceos con un bajo contenido en grasa (quisquillas). Las condiciones ensayadas durante la etapa intestinal han sido: a) ausencia de sales biliares y b) presencia de sales biliares en distintas concentraciones (0.03, 1 y 3 g de extracto biliar/100 g de disolución). La figura 6 muestra las concentraciones de fluoruro solubilizadas en estas condiciones. La presencia de sales biliares a una concentración de 0.03 g/100 g de digerido no aumenta la solubilización respecto a la digestión en ausencia de sales biliares. Sin embargo, el empleo de concentraciones mayores (1 y 3 g de sales biliares/100 g de digerido) supone un incremento significativo de la solubilización de fluoruro (1.5 y 1.9 veces) respecto al valor hallado en ausencia de estas sales o en presencia de una concentración más baja. Esta tendencia se observa para ambas muestras, y por tanto, es independiente del contenido graso del producto. Se ha comprobado que este efecto no es atribuible a un aporte de fluoruro por parte de las sales biliares.

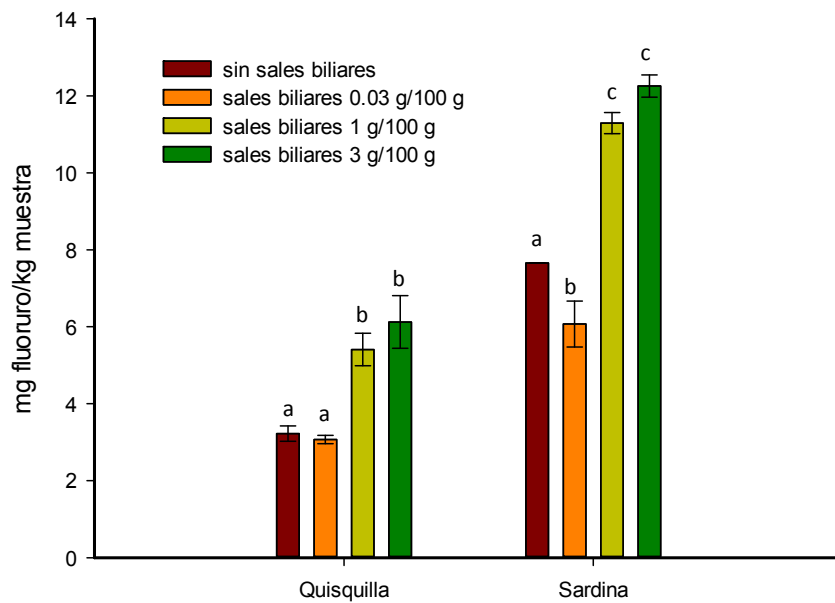


Figura 6. Influencia de la concentración de sales biliars (g de sales biliars/100 g de disolución) en la solubilización de fluoruro en muestras de quisquilla y sardina. Valores expresados como mg de fluoruro/kg de muestra (media \pm desviación estándar, n=3). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

DISCUSIÓN

El estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de nutrientes y contaminantes desde los alimentos ha experimentado un auge en los últimos años, especialmente destacable para los contaminantes, dada la escasa información que sobre ellos existía. Como se ha descrito en la introducción de la tesis, para estas investigaciones pueden utilizarse métodos estáticos y dinámicos. Los métodos estáticos son los seleccionados mayoritariamente por los

investigadores dado su fácil aplicación. En estos métodos se fija una única condición para cada uno de los parámetros (relación muestra-volumen de digestión, pH, concentraciones de pepsina, pancreatina y sales biliares). Se ha comprobado que los métodos estáticos constituyen una aproximación válida para el estudio de la bioaccesibilidad, sin embargo conocer como las modificaciones de determinados parámetros que permanecen fijos en estos métodos pueden afectar a la bioaccesibilidad de un compuesto es importante. Este fenómeno puede explicar las diferencias en la absorción de un compuesto cuando éste forma parte de distintas matrices alimentarias, o diferencias de absorción entre grupos etarios (con pHs y secreciones gastrointestinales diferentes) o en grupos con patologías gastrointestinales.

Estudios realizados en animales de laboratorio han evidenciado que la absorción gástrica del fluoruro es del 25% frente a un 75% de absorción intestinal (Nopakun y col., 1989), por lo que disponer de información sobre la solubilización en las distintas etapas digestivas (gástrica e intestinal) es relevante. El estudio realizado en la presente tesis pone de manifiesto que para todas las muestras ensayadas la extracción del elemento desde la matriz tiene lugar en la etapa gástrica. La posterior etapa intestinal no incrementa en ninguna de las muestras el contenido solubilizado, sino todo lo contrario, produce una reducción significativa y muy elevada del fluoruro soluble. En consecuencia, para la evaluación del riesgo/beneficio asociado a la ingesta de fluoruro no resulta adecuado emular únicamente la etapa gástrica del proceso digestivo, ya que aporta datos que podrían sobrestimar la absorción. Este sería el caso del único trabajo sobre bioaccesibilidad de fluoruro que se ha llevado a cabo en alimentos (Buzalaf y col., 2004), donde sólo se utilizan los datos de fluoruro soluble a pH ácido para estimar el aporte diario de este elemento.

En el capítulo 2 de esta tesis se ha puesto de manifiesto que la recuperación de patrones de fluoruro tras la aplicación del método de digestión gastrointestinal es cuantitativa, por lo que se descarta la precipitación del analito por interacciones con los enzimas o sales biliares como causa de la disminución de la solubilización durante la etapa intestinal. Esta menor solubilización del fluoruro podría atribuirse a interacciones entre este elemento y otros componentes de la matriz alimentaria, que puedan propiciarse en las condiciones de esta etapa digestiva. Existen estudios *in vivo* que evidencian que la biodisponibilidad de fluoruro está altamente influenciada por la composición de los alimentos ingeridos. Así, la biodisponibilidad de NaF en humanos disminuye si existe una administración simultánea de leche (Trautner y Einwag, 1989) o alimentos sólidos (Shulman y Vallejo, 1990).

Las características químicas del fluoruro permiten explicar en parte las modificaciones de la absorción en presencia de alimentos. El fluoruro a pHs ácidos se encuentran en forma de ácido fluorhídrico, sin embargo, a pHs cercanos a la neutralidad se encuentran en forma disociada. Debido a su carácter altamente electronegativo, el ion fluoruro tiende a reaccionar con un gran número de elementos formando complejos, algunos de los cuales presentan baja solubilidad, como es el caso del fluoruro de calcio, magnesio y aluminio. Los productos pesqueros son fuente importante de Ca^{+2} y Mg^{+2} (Jodral-Segado y col., 2003) y se ha evidenciado que su bioaccesibilidad desde estos alimentos es elevada (Velasco Reynold y col., 2010). Por ello, es de esperar que durante la digestión de los productos pesqueros haya una importante solubilización de Ca^{+2} y Mg^{+2} que favorezca la formación de complejos insolubles con el fluoruro en forma disociada, lo cual explicaría los cambios de bioaccesibilidad en la etapa intestinal respecto a la etapa gástrica.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo al adicionar Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} durante la simulación de la digestión gastrointestinal, constatan esta teoría, ya que la presencia de algunos de estos cationes, especialmente del Ca^{+2} , disminuye de forma importante la bioaccesibilidad del fluoruro en la etapa intestinal. Esta disminución no se observa o es mucho menos acentuada en la etapa gástrica. Esto confirma los resultados de los estudios *in vivo*, que han puesto de manifiesto una menor absorción de fluoruro en presencia de alimentos ricos en Mg^{+2} , Al^{+3} y Ca^{+2} (O'Dell y col., 1973; Spencer, 1980b; Cerklewski, 1987; Tsuchida y col., 1992). Todo lo anterior indica que en los estudios *in vitro* donde se evalúa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de fluoruro es necesario ensayar no sólo el alimento que contiene el fluoruro, si no cualquier alimento, tanto sólido como líquido, ingerido simultáneamente. De esta forma, se consideraría el aporte de compuestos o elementos complejantes de fluoruro que puedan solubilizarse durante la digestión.

En esta investigación también se ha evaluado el efecto de parámetros fisiológicos que se modifican *in vivo* durante el proceso de digestión y que pueden ser determinantes en la solubilización de fluoruro atendiendo a las características del mismo. Uno de ellos es el pH del proceso digestivo. Dressman y col. (1990) han observado que el pH gástrico en adultos sanos se incrementa hasta un valor medio de 5 tras la ingesta de alimentos, alcanzando incluso valores de 6.7 a los cinco minutos de la ingesta. El restablecimiento del pH ácido se consigue aproximadamente 2 horas después de ingerir el alimento. Por tanto, el mantenimiento del pH próximo a 2 durante la etapa gástrica, práctica habitual en la mayoría de modelos estáticos *in vitro*, no emula lo que ocurre *in vivo* tras la ingesta de un alimento. Por lo que respecta a la etapa intestinal, este factor no es tan determinante, ya que el pH no sufre variaciones tan acentuadas tras la

ingesta de alimentos (Charman y col., 1997), sólo existe una ligera disminución respecto al valor medio en estado de ayuno [duodeno: ayuno (5.8-6.5), tras comida (5.0-5.7); yeyuno: ayuno (6-7), tras comida (5.7-6.5)]. Para la etapa intestinal, los modelos estáticos no presentan tanta discrepancia con respecto a los valores de pH encontrados *in vivo*, ya que la mayoría de ellos suelen trabajar a valores de pH entre 5.5 y 6.5 (Oomen y col., 2002).

Teniendo en cuenta que las mayores variaciones de pH tienen lugar a nivel gástrico, la influencia de este parámetro en la bioaccesibilidad de fluoruro sólo se ha evaluado en esta etapa. Los resultados obtenidos muestran que el aumento del pH en la etapa gástrica disminuye la solubilización del fluoruro presente en las muestras de pescados analizadas (sardina y boquerón). En los crustáceos sin embargo, se aprecian diferencias entre las muestras. El efecto del pH no es tan acentuado cuando la muestra se elabora únicamente a partir del músculo del abdomen. Por el contrario, las muestras de quisquilla en las que se ha incluido el exosqueleto presentan un comportamiento similar al de los pescados, con un descenso acentuado de la solubilización al aumentar el pH. En quisquillas y pescados, las muestras presentan además del músculo, las partes calcificadas (exoesqueleto o espinas), en las que se sabe que el contenido de cationes complejantes como el Ca^{+2} y Mg^{+2} es superior al del músculo. Por tanto, es de esperar que en estas muestras se genere un mayor número de complejos insolubles entre el fluoruro y los cationes a medida que aumenta el pH.

Adicionalmente, la disminución de la bioaccesibilidad observada en los productos pesqueros al aumentar el pH también podría deberse a una disminución de la actividad de la pepsina. El pH óptimo de la pepsina está en torno a 1.5-2, entre 2.5 y 5 hay una disminución de la actividad enzimática pero persiste entorno al 60% de la misma y a partir de pH 5, la pepsina se inactiva, siendo esta inactivación irreversible a pH superiores a 7.5 (Piper y

Fenton, 1965). Para dilucidar la importancia de la actividad de la pepsina en la solubilización de fluoruro se ha llevado a cabo la digestión gástrica a pH 2 en ausencia de esta enzima y en presencia de concentraciones crecientes del mismo. Las concentraciones se han seleccionado en base a datos bibliográficos que indican una fluctuación de los niveles de pepsina durante la etapa de digestión. Así, Kalantzi y col. (2006) evaluaron el contenido de pepsina en el estómago tras la ingesta de alimentos y pusieron de manifiesto que durante la digestión oscilaba entre 0.26 y 0.58 mg/mL, siendo mayor que el contenido del enzima encontrado en ayunas (0.11-0.22 mg/mL). La cantidad de pepsina empleada en los modelos estáticos es mucho menor (Oomen y col., 2002; Laparra y col., 2003) que la reportada por estos estudios *in vivo*. Esto puede afectar a la hidrólisis final de las proteínas presentes en los alimentos y por tanto a la solubilización de moléculas o elementos unidos a las mismas, como es el caso de algunos elementos traza.

Los resultados obtenidos en esta tesis evidencian que la solubilización del fluoruro está escasamente afectada por la presencia de pepsina en el medio. Esto podría deberse a que el fluoruro no se encuentre unido de forma mayoritaria a la matriz proteica de los productos pesqueros, contrariamente a lo que ocurre para otros elementos traza (As, Hg, Se). Se conoce que el fluoruro se acumula principalmente en el exoesqueleto y el tejido esquelético formando la fluoroapatita al combinarse con el Ca y el P (Camargo, 2003) y por tanto, no está ligado directamente a proteínas. Por otra parte, el hecho de que la pepsina no afecte la bioaccesibilidad del fluoruro indica que la disminución de la fracción soluble observada al aumentar el pH durante la digestión gástrica no se debe a una disminución de la actividad de la pepsina, sino posiblemente a la formación de complejos insolubles, tal y como se ha comentado con anterioridad.

En cuanto a la etapa intestinal, aunque los resultados de este estudio indican que no contribuye a la solubilización del fluoruro, esto podría deberse a que las sales biliares empleadas o las concentraciones de las mismas no son las adecuadas para que se produzca esta solubilización. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la importancia de las sales biliares en los procesos de solubilización. Oomen y col. (2004) en una evaluación de la bioaccesibilidad de Cd y Pb desde suelos contaminados comprueban que la solubilización final de estos elementos depende del origen de las sales biliares. La concentración de estas sales, variable a lo largo de la digestión intestinal (5.2-14.5 mM; Kalantzi y col., 2006), dificulta un consenso sobre las concentraciones a utilizar en los modelos estáticos. Esto supone un problema principalmente para alimentos con un importante contenido lipídico, ya que dependiendo de la composición y concentración de las sales, la digestión será más o menos extensa y por tanto, la solubilización de elementos o moléculas unidas a lípidos o inmersos en la matriz lipídica podría verse afectada.

Los resultados obtenidos tras utilizar concentraciones crecientes de sales biliares en la etapa intestinal muestran que hay una mayor solubilización del fluoruro al aumentar la concentración de sales, independientemente de la naturaleza grasa o no de la muestra. Si la concentración de sales biliares en la digestión es igual o superior a 1 g/100g de disolución, no se observa una disminución en la solubilización de fluoruro en la etapa intestinal respecto a la etapa gástrica. Teniendo en cuenta que la respuesta es similar en pescados grasos y no grasos, el efecto de las sales biliares no se debe a una mayor digestión de los lípidos sino más bien a su capacidad para interactuar con cationes como el Ca^{+2} , fenómeno que se ve favorecido a medida que aumenta el pH (Baruch y col., 1991). Williamson y Percy-Robb (1980) demostraron que el Ca^{+2} se une al glicolato, el principal derivado colanoato

de la bilis. La eliminación del Ca^{+2} del proceso digestivo favorece la solubilización del fluoruro, tal y como se ha comprobado en este capítulo. Esta podría ser la causa del aumento de solubilización observado tras aumentar la concentración de sales biliares en el medio de digestión.

El estudio realizado en este capítulo pone de manifiesto que la bioaccesibilidad está muy influenciada por aquellas condiciones en las que se favorece la formación de complejos insolubles del fluoruro con otros elementos presentes en la matriz, corroborando lo observado *in vivo* en los estudios de absorción intestinal. Teniendo en cuenta la enorme influencia del pH y la concentración de sales biliares en la bioaccesibilidad del fluoruro, la estimación de la misma empleando un modelo estático de digestión gastrointestinal, que normalmente trabaja a pH en torno a 2 durante la etapa gástrica y a concentraciones de 0.03 g/100 g de disolución para la etapa intestinal, posiblemente no sea la mejor aproximación. Para este elemento sería adecuado emplear metodologías *in vitro* que contemplen el dinamismo de estos parámetros. El empleo de sistemas dinámicos como el SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) y el TIM (TNO intestinal model) sería una opción, sin embargo, debido al volumen elevado de digerido que generan, posiblemente dificultaría el análisis del analito empleando las técnicas habituales de determinación de fluoruro. En la última década y debida a las mejoras en el conocimiento de las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal humano se han desarrollado medios biorelevantes que reproducen con mayor exactitud las condiciones gástricas e intestinales tanto en condiciones de ayuno como tras la ingesta de alimento (Marques, 2004). El empleo de estos medios podría ser una alternativa a tener en cuenta para la evaluación de la bioaccesibilidad de este elemento.

Capítulo 4

**Estudios sobre los mecanismos de absorción
intestinal del fluoruro**

El fluoruro presente en el agua y los alimentos requiere alcanzar la circulación sistémica para ejercer su efecto. Por tanto, la absorción intestinal juega un papel importante en la evaluación del riesgo/beneficio asociado a la ingesta de este elemento traza siendo necesario realizar estudios encaminados a dilucidar los mecanismos implicados en este proceso. Se han llevado a cabo escasas investigaciones al respecto, todas ellas en modelos intestinales de origen animal (Villa y col., 1993; He y col., 1998). Los datos existentes indican un transporte mayoritario por simple difusión, aunque existen datos contradictorios sobre la influencia de factores tales como el pH, la presencia de otros iones y la temperatura. Estas diferencias pueden deberse en parte a los modelos y las condiciones de ensayo empleados. Por otro lado, ninguno de los estudios citados evalúa la absorción empleando un modelo de epitelio intestinal humano.

En el presente capítulo se muestran los ensayos realizados para evaluar los posibles mecanismos implicados en el transporte intestinal de fluoruro empleando un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano, la línea celular Caco-2. Para tal fin se han determinado los coeficientes de permeabilidad aparente y la acumulación intracelular en distintas condiciones de ensayo (pH, temperatura, apertura de las uniones intercelulares, presencia de aniones).

RESULTADOS

1. Evaluación de la viabilidad y la integridad de la monocapa celular Caco-2

La figura 1 muestra la viabilidad de células Caco-2 expuestas a fluoruro (0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 4, 24, 48 y 72 horas, evaluada mediante la medición de la actividad mitocondrial.

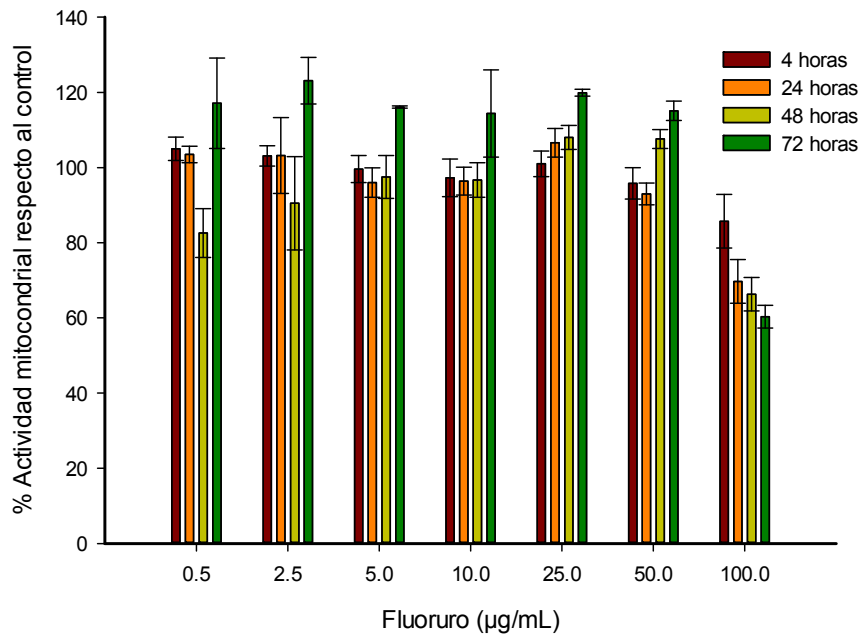


Figura 1. Porcentaje de actividad mitocondrial respecto al control en células Caco-2 expuestas a distintas concentraciones de fluoruro (0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 4, 24, 48 y 72 horas. Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=4).

Las células tratadas con fluoruro presentan una actividad mitocondrial comparable a la de las células control a concentraciones iguales o inferiores a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración más elevada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sin embargo, reduce significativamente la actividad mitocondrial a partir de las 24 horas de tratamiento (31-40%). Los resultados de viabilidad se han tenido en cuenta en el diseño de los ensayos de transporte y acumulación con el fin de trabajar con concentraciones subletales. Adicionalmente, en todos los ensayos realizados los valores de RET y la permeabilidad de LY se han mantenido dentro de los límites establecidos para considerar una monocapa íntegra (apartado 3.2.3. de metodología). Los valores de estos parámetros avalan la validez de los resultados obtenidos.

2. Transporte, acumulación celular y coeficiente de permeabilidad en dirección apical-basolateral (A-B) y basolateral-apical (B-A)

Los ensayos se han llevado a cabo en dos direcciones, A-B que supondría emular el proceso de entrada del elemento del lumen intestinal a la cavidad serosa (sentido absortivo), y en dirección B-A que emularía el proceso de eliminación al lumen intestinal (sentido secretorio).

Las figuras 2 y 3 muestran el transporte de fluoruro (expresado como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) para las diferentes concentraciones y tiempos ensayados en dirección A-B y B-A respectivamente. Los resultados obtenidos indican que el transporte de fluoruro en ambas direcciones presenta un comportamiento lineal para todas las concentraciones ensayadas (2.5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hasta los 260 minutos de ensayo.

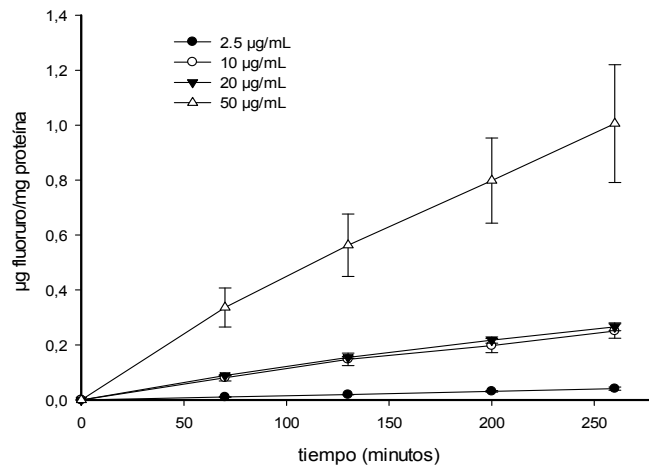


Figura 2. Transporte A-B en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 µg/mL). Valores expresados como µg/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

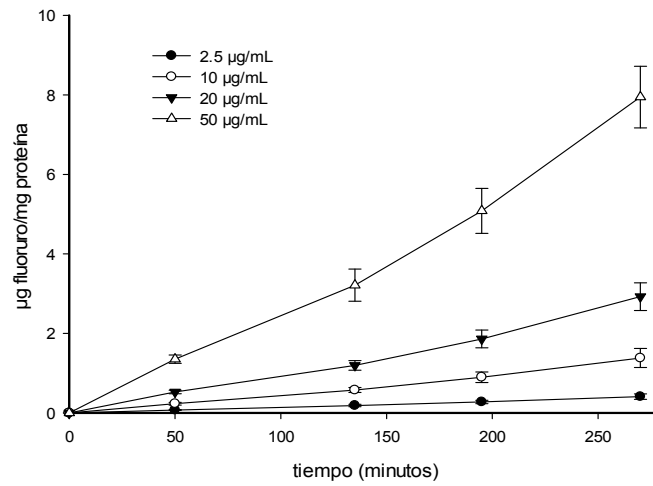


Figura 3. Transporte B-A en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 µg/mL). Valores expresados como µg/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

Los ensayos para evaluar la saturación del transporte muestran que un aumento de la concentración de fluoruro en el compartimento dador supone un aumento lineal del transporte a través de la monocapa en las dos direcciones (figura 4). Este hecho sugiere la ausencia o la baja participación de un componente saturable en el transporte de fluoruro para las condiciones ensayadas. Por otro lado, se pone de manifiesto que a igualdad de concentraciones, el transporte en sentido absorptivo (A-B) es menor que el observado en sentido secretorio (B-A).

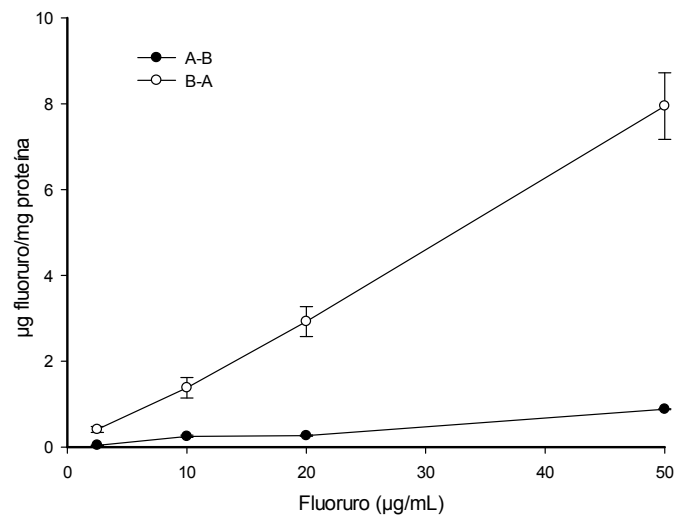


Figura 4. Transporte en sentido A-B y B-A tras exposición de células Caco-2 a distintas concentraciones de fluoruro (2.5, 10, 20 y 50 µg/mL). Valores expresados como µg/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

El coeficiente de permeabilidad aparente es un parámetro que indica la velocidad de paso de un compuesto a través del epitelio intestinal. Es muy útil para estudios comparativos ya que está corregido por la superficie de absorción, el tiempo de ensayo y la concentración. Adicionalmente existen varios estudios que han establecido modelos predictivos que correlacionan el valor de P_{app} en células Caco-2 con la magnitud de la absorción en humanos,

por tanto, los estudios en Caco-2 puede aportar información sobre la absorción del compuesto *in vivo*. Los valores de P_{app} en dirección A-B obtenidos tras 260 minutos de exposición son los siguientes: $(0.81 \pm 0.06) \times 10^{-6}$ cm/s para 2.5 $\mu\text{g/mL}$; $(0.91 \pm 0.08) \times 10^{-6}$ cm/s para 10 $\mu\text{g/mL}$; $(1.4 \pm 0.09) \times 10^{-6}$ cm/s para 20 $\mu\text{g/mL}$ y $(0.8 \pm 0.11) \times 10^{-6}$ cm/s para 50 $\mu\text{g/mL}$.

Los coeficientes de permeabilidad en dirección secretoria (B-A) son mayores a los observados en dirección A-B [$(3.7 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ cm/s para 2.5 $\mu\text{g/mL}$; $(3.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ cm/s para 10 $\mu\text{g/mL}$; $(3.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ cm/s para 20 $\mu\text{g/mL}$ y $(3.8 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ cm/s para 50 $\mu\text{g/mL}$]. Los valores del ratio de eliminación (P_{app} basolateral-apical/ P_{app} apical-basolateral) oscilan entre 2.4 y 5.3, indicando que la eliminación de fluoruro hacia el lumen está favorecida respecto a la absorción, tal y como ponen de manifiesto las curvas de transporte (figuras 2-4).

Los ensayos de acumulación muestran que los contenidos de fluoruro en el interior celular son muy bajos y no superan para ninguno de los tiempos ensayados el 1% de la cantidad adicionada. La acumulación celular de fluoruro aumenta linealmente hasta los 30 minutos (datos no mostrados). A partir de ese momento se observa una disminución gradual de la retención celular hasta las 48 horas. Atendiendo a estos resultados, el resto de experiencias de acumulación se han llevado a cabo a los 30 minutos, tiempo de máxima retención celular.

3. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de fluoruro

Los compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular como el fluoruro pueden emplear la vía paracelular para su transporte a través de las monocapas epiteliales. El efecto de la apertura de las uniones intercelulares

sobre la permeabilidad de un compuesto se utiliza como criterio para determinar la participación de esta ruta (Ménez y col., 2007). Si la permeabilidad de un soluto aumenta significativamente al abrir las uniones intercelulares, se acepta que la ruta paracelular es relevante en su transporte.

En el presente trabajo, el estudio del transporte paracelular se ha llevado a cabo mediante la modulación de las uniones intercelulares por adición de EDTA (5 mM), un agente quelante del calcio. Citi (1992) propone que la disminución de los iones Ca^{+2} en el medio modula la integridad de las uniones entre células y la organización del citoesqueleto a través de un sistema efector en el que participan las proteínas quinasa. Tras el tratamiento realizado con EDTA se produce una apertura importante de las uniones intercelulares, tal y como indica el incremento del P_{app} del LY (1.3-1.9 veces, figura 5) y la disminución de los valores de RET (figura 6). Esta apertura se mantiene tras eliminar el EDTA del medio, durante los 60 minutos de ensayo en ambas direcciones (A-B y B-A). Cabe destacar que a medida que pasa el tiempo tiende a producirse una reducción del tamaño de poro entre las células tratadas con EDTA, tal y como muestra la evolución de los valores de RET (figura 6). A los 60 minutos, las diferencias de las RET entre las células tratadas con EDTA y las células no tratadas no son tan acentuadas (35% a los 15 minutos y 14% a los 60 minutos). Sin embargo, la apertura de las uniones con EDTA se mantiene tiempo suficiente como para observar un mayor paso del LY a través del espacio intercelular en las células tratadas con este quelante (figura 5).

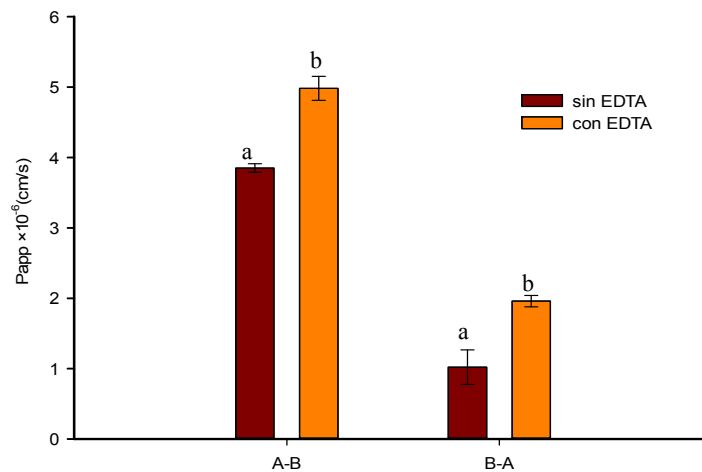


Figura 5. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY (100 μ M) en dirección A-B y B-A en células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento con EDTA. Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, n=3). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre células con o sin EDTA en dirección A-B o B-A.

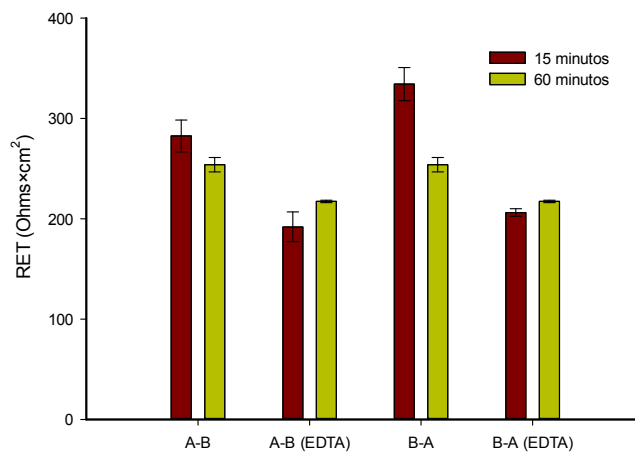


Figura 6. Valores de RET medidos a 15 y 60 minutos en células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento, en ensayos de transporte en dirección A-B y B-A. Valores expresados como Ohms x cm² (media \pm desviación estándar, n=3).

La figura 7 muestra los valores de P_{app} del fluoruro en dirección A-B y B-A para las monocapas de Caco-2 con o sin previo tratamiento con EDTA. La apertura de las uniones conlleva un aumento significativo del coeficiente de permeabilidad del fluoruro en ambas direcciones (A-B: 6.3×10^{-6} cm/s; B-A: 5.7×10^{-6} cm/s). El aumento observado en dirección B-A es inferior al observado en dirección opuesta (B-A: 2.7 veces mayor con tratamiento previo con EDTA; A-B: 3.8 veces mayor con tratamiento previo con EDTA). Estos resultados evidencian que la vía paracelular está implicada en el transporte del fluoruro, siendo mayor su participación en dirección A-B ya que la permeabilidad experimenta cambios más acentuados tras la apertura de las uniones.

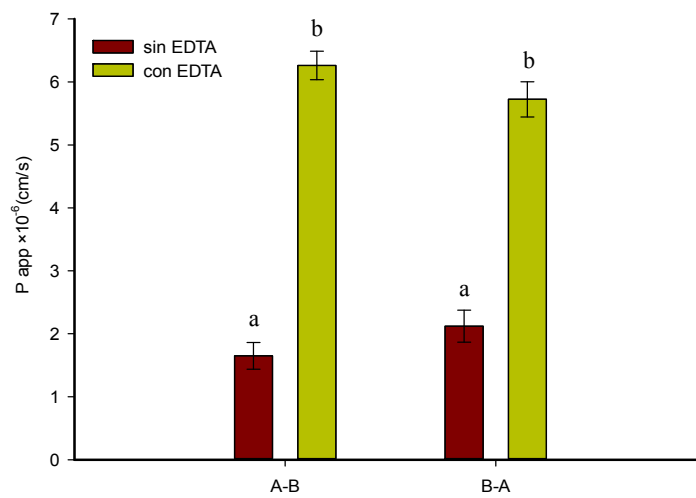


Figura 7. Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en dirección A-B y en dirección B-A de células Caco-2 tratadas previamente con EDTA o sin previo tratamiento con EDTA. Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, $n=3$). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre células con o sin EDTA en dirección A-B o B-A.

4. Efecto del pH sobre la permeabilidad y acumulación de fluoruro

En estudios realizados con otros modelos intestinales *in vitro* o con animales de experimentación se ha puesto de manifiesto la influencia del pH en el transporte de fluoruro (Whitford y col., 1977; He y col., 1998). Por tanto, se ha considerado de interés evaluar el transporte de fluoruro a los distintos pHs existentes en el intestino, los cuales oscilan entre 5.5 y 8 (Neuhoff y col., 2005).

Los resultados obtenidos tras el ensayo de transporte en dirección A-B con distintas condiciones de pH en el medio apical y basolateral se muestran en la figura 8. Se observa que un pH ácido en el medio apical (5.5), independientemente del pH basolateral (7.2 o 5.5), aumenta el transporte de fluoruro a través de la monocapa celular [P_{app} : $(2.95-3.30) \times 10^{-6}$ cm/s, 3 veces superior al P_{app} 7.2/7.2].

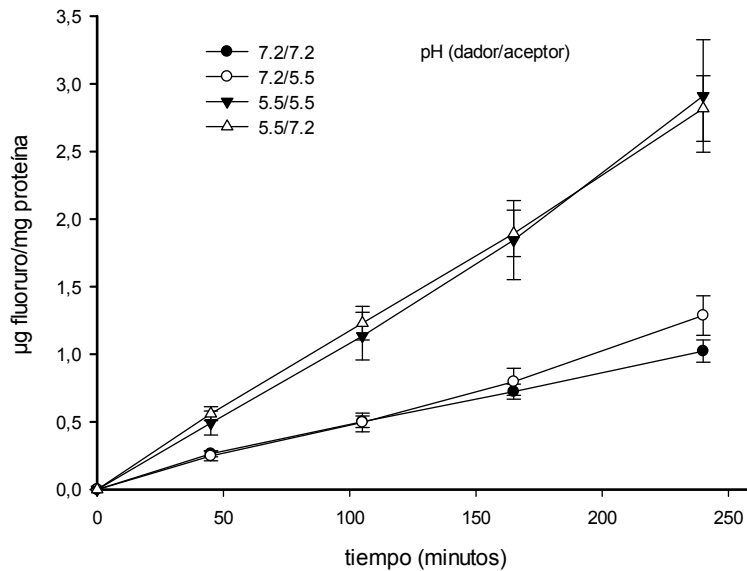


Figura 8. Transporte de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 µg/mL durante 240 minutos en sentido A-B a diferentes pHs. Valores expresados como µg/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

El transporte en sentido B-A también aumenta significativamente cuando el medio dador presenta pH más ácidos (P_{app} 5.5/7.2: 7.01×10^{-6} cm/s, 1.9 veces superior al P_{app} 7.2/7.2), tal y como se muestra en la figura 9.

Los ensayos de acumulación a pH 5.5, muestran un aumento significativo de los contenidos intracelulares de fluoruro respecto a los valores observados a pH 7.2 (pH 5.5: 1025 ± 79 ng/mg proteína; pH 7.2: 567 ± 61 ng/mg proteína). Los resultados obtenidos indican la existencia de un componente pH dependiente en el transporte de fluoruro a través de las células del epitelio intestinal.

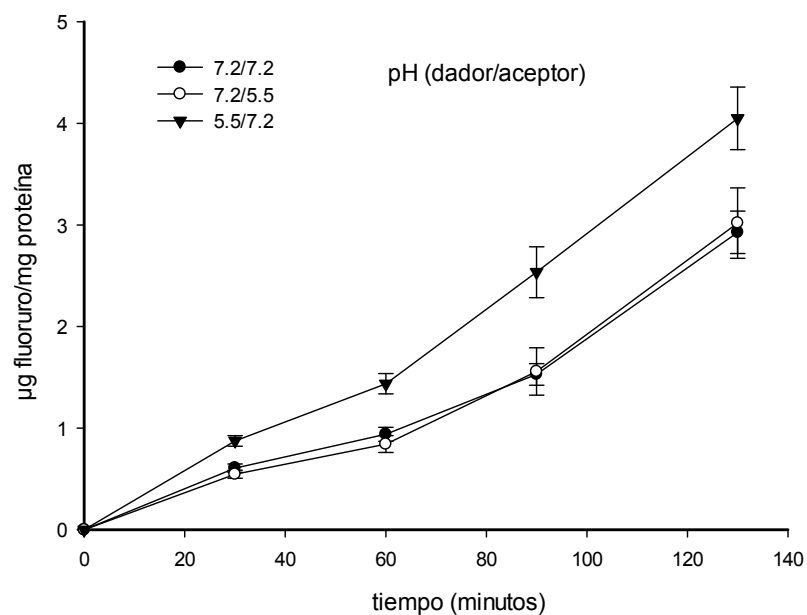


Figura 9. Transporte de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 µg/mL durante 120 minutos en sentido B-A a diferentes pHs. Valores expresados como µg/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

5. Influencia de la temperatura sobre la permeabilidad y acumulación de fluoruro

En el tracto gastrointestinal, la temperatura se mantiene constante, y por tanto los ensayos de transporte a temperaturas inferiores a 37 °C no se utilizan para emular las condiciones fisiológicas del intestino, sino para confirmar la participación de un transportador dependiente de energía. El descenso de temperatura disminuye el metabolismo celular y actúa como un inhibidor de cualquier proceso dependiente de energía. Este tipo de ensayo es uno de los más empleados para evaluar la participación de transportadores dependientes de energía (Berger y col., 2000; Rieux y col., 2005; Neuhoff y col., 2005). Una disminución del P_{app} a 4 °C respecto a 37 °C puede ser un indicativo de la participación de este tipo de transporte. El coeficiente de permeabilidad en dirección A-B obtenido a 4 °C es de $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ cm/s, valor semejante a los obtenidos a los 37 °C. Ello indica que no existe o es minoritario un transporte dependiente de energía en el proceso de absorción de este elemento.

En dirección B-A se observa una disminución significativa del transporte a baja temperatura [P_{app} (cm/s): 4 °C $(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-6}$; 37 °C $(3.0 \pm 0.5) \times 10^{-6}$], indicando la posible participación de un transporte dependiente de energía en sentido secretorio.

Los resultados obtenidos en los ensayos de acumulación intracelular de fluoruro a 4 °C (19.3 ± 4.3 ng/mg proteína), muestran una disminución estadísticamente significativa respecto a los valores observados a 37 °C (38.5 ± 5.9 ng/mg proteína).

6. Efecto de la presencia de Cl^- en el transporte y acumulación de fluoruro

Algunos trabajos sugieren que el fluoruro puede emplear los mismos mecanismos de transporte que el Cl^- (Simchowitz, 1988; Montrose y Kere, 2000). En este trabajo se ha intentado dilucidar si en el epitelio intestinal ambos aniones comparten mecanismos de transporte. Los datos de integridad de la monocapa durante el ensayo muestran que el medio libre de Cl^- aumenta significativamente la RET (50%) respecto al medio con Cl^- indicando una disminución del paso paracelular, lo que podría en cierta manera disminuir el transporte de fluoruro. Sin embargo ocurre todo lo contrario. El transporte de fluoruro muestran un aumento significativo del P_{app} en sentido A-B cuando en el medio no existen Cl^- [sin cloruros: $(5.47 \pm 0.50) \times 10^{-6}$ cm/s; con cloruros: $(3.81 \pm 0.60) \times 10^{-6}$ cm/s]. Adicionalmente, los ensayos de acumulación celular muestran una mayor retención de fluoruro en el medio sin cloruros (413 ± 18 ng/mg proteína) que en el medio con cloruros (282 ± 32 ng/mg proteína). Todos estos datos sugieren una competencia de ambos iones por mecanismos de transporte comunes.

7. Participación de un intercambiador F^-/OH^- en el transporte y acumulación de fluoruro

Para evaluar la influencia de un intercambiador F^-/OH^- en el transporte y en la acumulación celular de fluoruro, se ha creado un gradiente de OH^- previo al transporte de fluoruro, y durante el ensayo de transporte se ha llevado a cabo un tratamiento con DIDS, un potente inhibidor de la mayoría de intercambiadores de aniones. Los resultados obtenidos indican que el transporte de fluoruro no se ve afectado por el gradiente de grupos hidroxilo

(figura 10). Asimismo, la presencia de DIDS tampoco modifica significativamente el transporte de fluoruro tras la generación del gradiente de OH⁻ (figura 10).

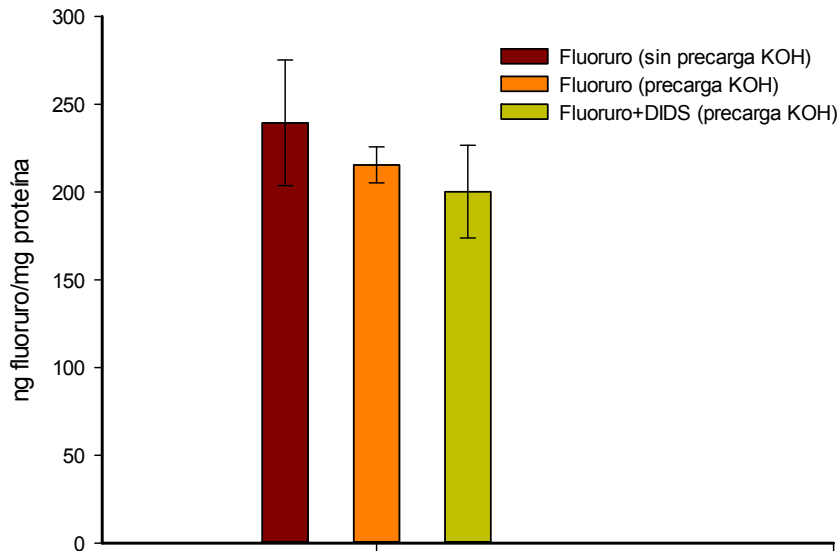


Figura 10. Transporte A-B de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 20 µg/mL durante 120 minutos en distintas condiciones: sin precarga de KOH; tratamiento previo con KOH; tratamiento previo con KOH y co-exposición DIDS/fluoruro. Valores expresados como ng/mg proteína (media ± desviación estándar, n=3).

Los ensayos de acumulación muestran resultados diferentes. La figura 11 indica los contenidos intracelulares de fluoruro (ng/mg proteína) obtenidos en los ensayos de acumulación en células Caco-2 con y sin precarga de KOH, y tras precarga de KOH y tratamiento con DIDS. La presencia de un gradiente de OH⁻ favorece la acumulación de fluoruro (sin KOH: 962±14 ng/mg proteína, con KOH: 1474±19 ng/mg proteína). Contrariamente a lo esperado, el tratamiento con DIDS tras generar un gradiente de OH⁻ también aumenta significativamente los contenidos intracelulares del elemento (1968±145 ng/mg proteína). Estos resultados indican que en el transporte de

fluoruro puede intervenir un intercambiador F^-/OH^- , el cual no sería sensible al DIDS.

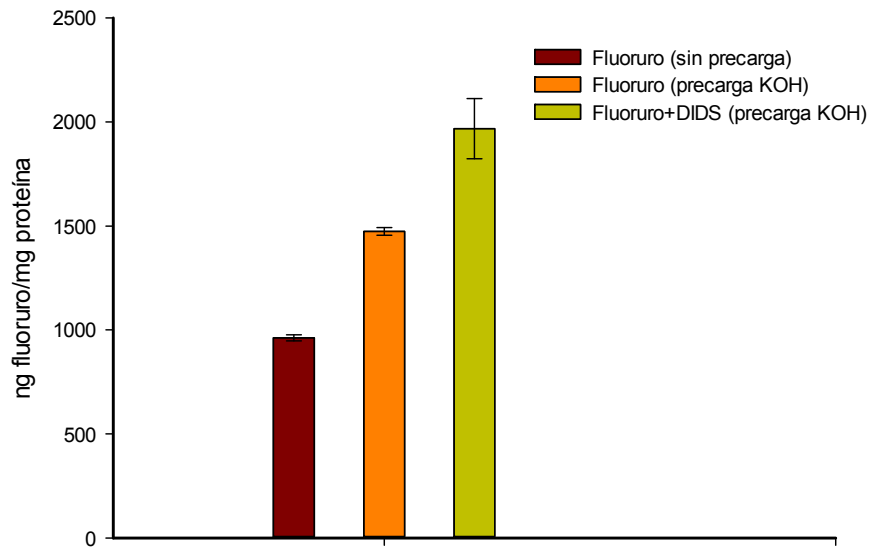


Figura 11. Contenido intracelular de fluoruro en células Caco-2 expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos en distintas condiciones: sin precarga con KOH; tratamiento previo con KOH; tratamiento previo con KOH y co-exposición DIDS/fluoruro. Valores expresados como ng/mg proteína (media \pm desviación estándar, $n=3$).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se han evaluado los posibles mecanismos implicados en el transporte intestinal de fluoruro empleando como modelo de epitelio intestinal humano la línea celular Caco-2. Los resultados muestran un valor medio de los coeficientes de permeabilidad en dirección absorbiva a pH 7.2 de 1×10^{-6} cm/s. Numerosos estudios ponen de manifiesto

que es posible correlacionar los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos en células Caco-2 con la magnitud de la absorción *in vivo* (Artursson y Karlsson, 1991; Yee, 1997), aunque la idoneidad de esta correlación depende de la naturaleza del transporte del compuesto (Artursson y col., 2001). En el presente estudio se ha tenido en cuenta el criterio de Yee (1997) para evaluar la absorción *in vivo*, según el cual un compuesto con un valor de $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s tiene una baja absorción *in vivo* (0-20%), con P_{app} entre $1-10 \times 10^{-6}$ cm/s, una absorción moderada (20-70%) y con $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s, presenta una absorción elevada (70-100%). Los valores de P_{app} obtenidos para el fluoruro permiten clasificarlo como un elemento de moderada absorción (<70%) en todas las condiciones ensayadas.

Los coeficientes de permeabilidad en dirección B-A (sentido secretorio) son mayores [$(3 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ cm/s], e indican que el transporte de fluoruro desde el compartimento seroso al lumen es moderado, aunque está favorecido frente a la absorción. Estos coeficientes de permeabilidad dan lugar a un ratio de eliminación celular (E_r) muy superior a 1.5, que según Hubatsch y col. (2007) sugiere la participación de sistemas de eliminación activos desde la cavidad serosa al lumen intestinal. Esta participación no se evidencia en las curvas de transporte frente a la concentración, que no muestran un componente saturable en dirección B-A. Esto puede deberse a que esta vía activa de transporte es minoritaria o a que no existe saturación en el rango de concentraciones ensayado.

El epitelio intestinal está formado principalmente por células absorptivas y secretoras de mucus, unidas por un conjunto de proteínas que forman las uniones intercelulares y que mantienen la integridad del epitelio. El transporte de solutos a través de estas uniones (vía paracelular), se realiza mediante difusión pasiva. Los ensayos realizados en el presente estudio

ponen de manifiesto un incremento significativo de la permeabilidad del fluoruro tras la apertura de las uniones intercelulares, lo que indica que este elemento se transporta a través de estas uniones. El aumento del transporte de fluoruro es equiparable al observado para el LY, compuesto que se mueve principalmente por esta vía, lo que sugiere que la difusión paracelular puede ser una de las principales vías de paso del fluoruro a través de la monocapa intestinal. Esto confirma lo propuesto en la bibliografía, que describe un transporte mayoritario por difusión pasiva para este elemento (Cerlewski, 1997). La alta participación de la ruta paracelular también explicaría que la absorción de fluoruro deducida a partir de los datos de P_{app} en Caco-2 sea inferior a la observada *in vivo*, donde se han evidenciado absorciones casi completas en ausencia de alimentos (Cerlewski, 1997; Wang y col., 2001a). La monocapa formada por esta línea celular presenta unas uniones intercelulares más estrechas que las existentes en el intestino delgado humano (Tavelin y col., 2003), es decir, presentan un paso paracelular más reducido. Por lo tanto no son el mejor modelo para evaluar la absorción de sustancias que se mueven a través de la vía paracelular (Artursson y col., 2001; Tavelin, 2003).

Por otro lado, el tratamiento con EDTA empleado para evaluar la participación de la vía paracelular, secuestra los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} presentes en el medio. El aumento de la permeabilidad de fluoruro observado, además de producirse por un aumento del paso paracelular, puede ser consecuencia de una menor formación de complejos de fluoruro con el Ca^{+2} o el Mg^{+2} , que presentan una baja solubilidad y que por tanto, podrían dificultar la absorción de fluoruro.

El pH es un factor que puede influir en el transporte de compuestos en el tracto gastrointestinal por distintos motivos. En primer lugar, la absorción por difusión pasiva depende de la fracción de compuesto que se encuentra en

forma no disociada al pH de interés (Kristl, 2009). Dependiendo del pKa de una sustancia, ésta puede variar su estado de ionización en el rango de pHs existente en el tracto digestivo, modificando por tanto su permeabilidad intestinal. Por otra parte, existen transportadores que dependen de la concentración de protones (Kristl, 2009). Una disminución del pH y por tanto, un aumento de la concentración de H^+ en el medio pueden aumentar la actividad de estos transportadores y facilitar el paso de sustancias que los utilicen en su absorción.

Los escasos estudios existentes sobre el transporte de fluoruro a nivel intestinal presentan resultados contradictorios en cuanto a la influencia del pH, si bien se han realizado en modelos muy distintos (Nopakun y Messer, 1990; He y col., 1998). El resultado obtenido en el presente trabajo en células Caco-2 pone de manifiesto que el pH 5.5 favorece el transporte en dirección A-B y B-A, y que también favorece la acumulación celular. En este sentido podemos destacar que el fluoruro ($pK_a=3.7$) está en forma ionizada a pH 7.2, sin embargo a pHs ácidos está principalmente en forma neutra como ácido fluorhídrico (HF). Por tanto, a pH 5.5 la fracción de fluoruro en forma no disociada es mayor que a pH 7.2, lo que podría favorecer su transporte por difusión pasiva paracelular. Por otro lado, no hay que descartar la participación de transportadores dependientes de pH. En este sentido, He y col. (1998) sugieren la participación de un co-transportador F^-/H^+ o un intercambiador F^-/OH^- en vesículas de la membrana intestinal de conejo. El mayor transporte a pHs ácidos confirma que la absorción de fluoruro, como apuntan otros autores, se produce principalmente a nivel de intestino delgado proximal, incluso a nivel gástrico donde los pHs son más ácidos (Nopankun y col., 1989; Cerklewski, 1997).

Los estudios realizados sobre la existencia de un transporte dependiente de energía demuestran que su participación no es significativa en dirección

absortiva (A-B). Los resultados en sentido secretorio muestran sin embargo, una dependencia de la temperatura, lo que puede ser un indicativo de la participación de un transporte activo en dirección basolateral-apical. Este hecho está en concordancia con el ratio de eliminación a 37 °C, que supera la unidad, indicativo de la posible participación de un transporte secretorio activo. La participación de un transporte de fluoruro dependiente de energía sólo se ha reportado en un estudio previo (Parkins y col., 1966). Son necesarias más investigaciones para confirmar su existencia en células intestinales, ya que los descensos de temperatura pueden afectar la estructura de la monocapa epitelial y a su vez otros mecanismos de transporte, como los procesos de difusión pasiva (Sugano y col., 2010), que tal y como se ha evidenciado son importantes para el transporte de fluoruro en células Caco-2.

Algunos estudios sugieren la posibilidad de que el fluoruro se transporte a través de las células empleando los mismos mecanismos que aniones como los cloruros o los sulfatos (Montrose y Kere, 2000). He y col. (1998) ponen de manifiesto que la presencia de Cl^- disminuye la acumulación de fluoruro en vesículas de membrana intestinal de conejo. En el presente estudio se pone de manifiesto que en ausencia de iones Cl^- se produce un aumento de los coeficientes de permeabilidad en dirección absortiva y una mayor retención celular, lo que indica la existencia de una competencia por un mismo mecanismo de transporte entre ambos elementos. Estudios previos muestran que el transporte de iones Cl^- en el tracto intestinal está mediado principalmente por procesos de intercambio electroneutro Cl^-/OH^- (Mahajan y col., 1996; Moseley y col., 1999). Por otro lado, la investigación realizada evidencia que una disminución del pH aumenta el transporte y la acumulación de fluoruro, que puede ser un indicativo de la participación de un intercambiador F^-/OH^- . Por este motivo, en la presente tesis se ha

estudiado de forma directa la participación de este tipo de transporte en el paso A-B del fluoruro creando un gradiente de iones OH^- . Los resultados obtenidos muestran que la generación del gradiente, aumenta la acumulación intracelular aunque no afecta significativamente al transporte al lado basolateral. Este hecho podría indicar que el fluoruro se transporta transcelularmente al menos del compartimento apical al interior celular por un mecanismo electroneutro F^-/OH^- .

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que el transporte de fluoruro se produce principalmente por difusión pasiva a través de las uniones intercelulares, siendo minoritaria la vía transcelular aunque no menos importante, ya que esta vía permite que el fluoruro se internalice en la célula intestinal donde puede ejercer un efecto beneficioso o tóxico. El pH ácido favorece el transporte en ambas direcciones (A-B y B-A), debido posiblemente a su estado no ionizado a este pH y a la participación de un co-transportador F^-/H^+ o de un intercambiador F^-/OH^- . Asimismo, los resultados también sugieren la participación transcelular de algunos mecanismos implicados en el transporte de Cl^- . Todas las características deducidas en el presente estudio sobre los mecanismos de transporte transcelular en dirección A-B apuntan al transportador regulado negativamente en el adenoma (DRA) como posible partícipe en la absorción de fluoruro. El DRA (SLC26A3) es una glicoproteína transmembrana que está localizada en la membrana apical de las células columnares y caliciformes del intestino delgado, especialmente en el duodeno y en el íleo distal. Se considera el mayor intercambiador de aniones del duodeno (Jacob y col., 2002). Media el intercambio electroneutro $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ o Cl^-/OH^- , e interviene en el transporte de sulfatos y de otros aniones (Melvin y col., 1999). El DRA se activa por una alcalinización intracelular, es decir, en presencia de un gradiente de grupos hidroxilo. Asimismo, este transportador no se inhibe en presencia de

DIDS, sin embargo reduce su actividad por acción de otros inhibidores de canales aniónicos tales como el tenidap y el ácido niflúmico (Alper y col., 2001).

Los resultados también permiten inferir algunas características del transporte en sentido secretorio, es decir del paso del fluoruro al lumen intestinal desde la cavidad serosa o desde el interior de la monocapa intestinal. En este estudio se ha puesto de manifiesto la importante participación en sentido secretorio de la ruta paracelular que a su vez coexiste con mecanismos transcelulares, algunos de los cuales podrían ser activos. En este sentido, cabe indicar que en la línea celular Caco-2 y en los enterocitos del duodeno humano se expresan proteínas pertenecientes a la familia de transportadores de casete de unión al ATP, que intervienen en los procesos de eliminación de xenobióticos del interior celular. Este es el caso de la P-glicoproteína (MDR1) y la proteína de resistencia a múltiples drogas 2 (MRP2). Ambas proteínas se localizan en la membrana en borde de cepillo de los enterocitos y ambas son dependientes de energía. Estos transportadores se consideran transportadores de aniones orgánicos (Gotoh y col., 2000; Shoji y col., 2004), aunque algunos estudios sugieren su participación en el transporte de aniones inorgánicos (Kala y col., 2000). La participación de los transportadores anteriormente citados, así como de otros que presenten algunas de las características deducidas en el presente capítulo, debe ser confirmada mediante técnicas como el silenciamiento génico o empleando oocitos de *Xenopus laevis* microinyectados.

Este capítulo ha aportado información novedosa sobre las características de los mecanismos de absorción intestinal de fluoruro en modelos de epitelio intestinal humano. Asimismo, ha permitido acotar los transportadores a estudiar y sentar las bases de futuras investigaciones encaminadas a identificar los transportadores implicados en el transporte transcelular de

fluoruro, los cuales permiten la internalización de este elemento en la mucosa intestinal y su posterior paso a la circulación sistémica.

La caracterización de los mecanismos de transporte llevado a cabo en este capítulo también ha permitido evaluar la idoneidad de la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal para el estudio de la biodisponibilidad *in vitro* del fluoruro. La importante participación de la ruta paracelular en la absorción de fluoruro indica que el empleo de esta línea celular para el estudio de su biodisponibilidad no es la aproximación más adecuada, debido al reducido paso paracelular que presenta. Este hecho no invalida, sin embargo, el modelo Caco-2 para el estudio de mecanismos de transporte. Estos resultados muestran la necesidad de estudiar otras aproximaciones *in vitro* para evaluar la biodisponibilidad de fluoruro, empleando sistemas celulares que produzcan monocapas epiteliales con un mayor paso paracelular. Este ha sido uno de los objetivos del siguiente capítulo de la presente tesis doctoral.

Capítulo 5

Evaluación de la influencia del modelo celular y de los factores presentes en el tracto intestinal sobre la absorción del fluoruro

El modelo celular Caco-2 es el más empleado para evaluar mecanismos de transporte intestinal, sin embargo, se ha puesto de manifiesto que dependiendo de las características del transporte de los compuestos puede no ser el más adecuado para estimar la biodisponibilidad oral (Tavelin y col., 1999). De hecho para compuestos con una importante vía paracelular, como es el caso del fluoruro (capítulo 4), si se emplea la monocapa formada por Caco-2 para la predicción podría infravalorarse hasta 100 veces la cantidad del compuesto que llega a la circulación sistémica (Artursson y col., 1993). Por ese motivo, se ha planteado dentro de los estudios de absorción intestinal del fluoruro utilizar modelos de epitelio donde este problema estuviese parcialmente solventado, al presentar un mayor paso paracelular. Los modelos seleccionados han sido los co-cultivos de Caco-2 con la línea HT29-MTX secretora de mucus (Caco-2/HT29-MTX). Asimismo, se han añadido al modelo otras variables (pH intraluminal, sales biliares o matrices alimentarias), algunas de las cuales afectan a la absorción de este elemento (capítulo 3 y 4; Whitford y col., 1977, Cerklewski, 1987; Trautner y Einwag, 1989).

RESULTADOS

Al igual que en los estudios de permeabilidad llevados a cabo con la línea celular Caco-2, a lo largo del ensayo de transporte se ha evaluado la integridad de la monocapa celular mediante la evaluación de la RET y del transporte del marcador paracelular LY. En todos los ensayos descritos a continuación, los valores de RET y la permeabilidad del LY se han mantenido dentro de los límites establecidos para considerar una monocapa íntegra (apartado 3.2.3 de metodología).

1. Resistencia eléctrica transepitelial y permeabilidad de LY en las monocapas celulares diferenciadas

La figura 1 muestra los valores de RET tras 10 días de diferenciación en Transwell® para las distintas proporciones Caco-2/HT29-MTX ensayadas. La monocapa formada sólo por células Caco-2 presenta valores de RET ($245 \pm 6 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$) muy superiores a los del monocultivo HT29-MTX ($143 \pm 3 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$). Por lo que respecta a los co-cultivos, el valor de la RET disminuye al aumentar la proporción de HT29-MTX, como ya han apuntado otros autores (Hilgendorf y col., 2000). En la proporción 70/30 esta diferencia no es estadísticamente significativa con respecto al monocultivo Caco-2, sin embargo, en el resto de monocapas las disminuciones de RET son muy importantes (13-35%).

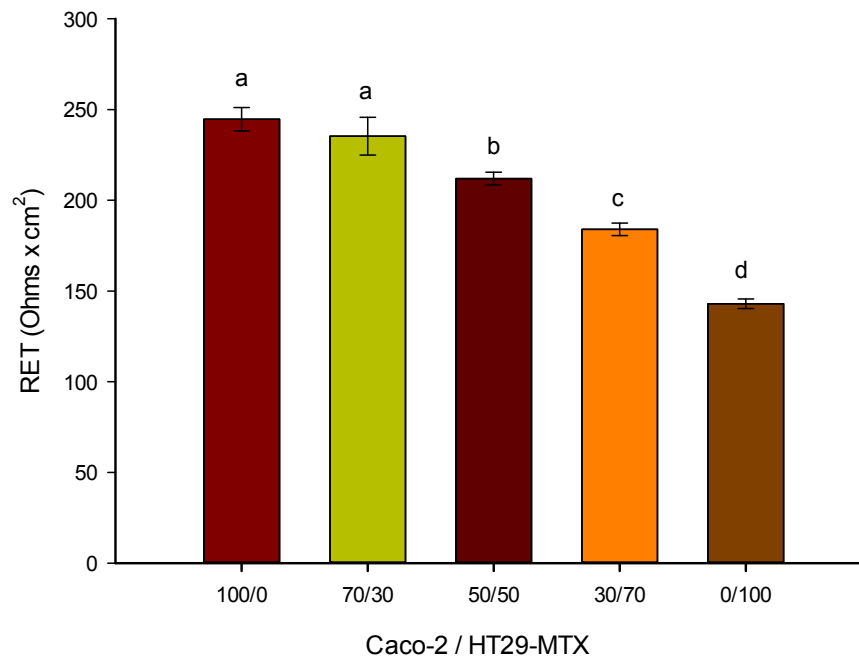


Figura 1. Valores de RET en las diferentes proporciones de Caco-2/HT29-MTX ensayadas. Valores expresados como Ohms \times cm² (media \pm desviación estándar; n=4). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre monocapas.

La figura 2 muestra la cantidad de LY transportada con el tiempo en las distintas monocapas durante 2 horas de tratamiento. Se observa un aumento del transporte de LY a medida que aumenta la proporción de HT29-MTX en la monocapa. Al igual que ocurre con la RET, las diferencias con respecto a la monocapa de células Caco-2 son estadísticamente significativas a partir de la proporción 50/50.

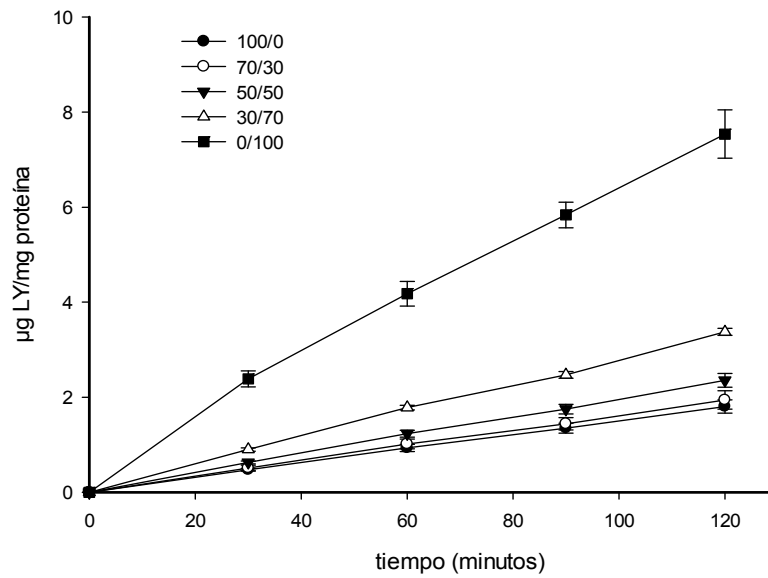


Figura 2. Transporte de LY (100 μ M) en las distintas monocapas Caco-2/HT29-MTX ensayadas. Valores expresados como μ g de LY/mg proteína (media \pm desviación estándar; n=4).

2. Transporte y coeficiente de permeabilidad aparente del fluoruro en los distintos modelos celulares

La tabla 1 muestra los valores de P_{app} del fluoruro a los 120 minutos de exposición para las distintas monocapas ensayadas. Los resultados muestran un aumento del P_{app} del fluoruro a medida que aumenta la proporción de HT29-MTX en el modelo celular. Este aumento es estadísticamente significativo a partir de la proporción 50/50, tal y como ocurría para el P_{app} del marcador paracelular LY y coincidiendo con la disminución significativa de la RET.

Caco-2/HT29-MTX	$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/s)
100/0	2.72 ± 0.14^a
70/30	2.80 ± 0.14^a
50/50	4.88 ± 0.70^b
30/70	8.33 ± 0.32^c
0/100	15.60 ± 0.24^d

Tabla 1. Coeficiente de permeabilidad aparente de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en las distintas proporciones de Caco-2/HT29-MTX ensayadas. Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, n=4). Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre monocapas.

La figura 3 muestra el transporte de fluoruro con el tiempo en las distintas monocapas ensayadas. Se observa un incremento lineal del transporte sin que se ponga de manifiesto un componente saturable hasta los 120 minutos de exposición en ninguna de las monocapas. La incorporación de las células secretoras de mucus al cultivo no parece modificar la cinética de transporte observada para el monocultivo Caco-2, aunque si aumenta la cantidad de fluoruro transportado al lado basolateral.

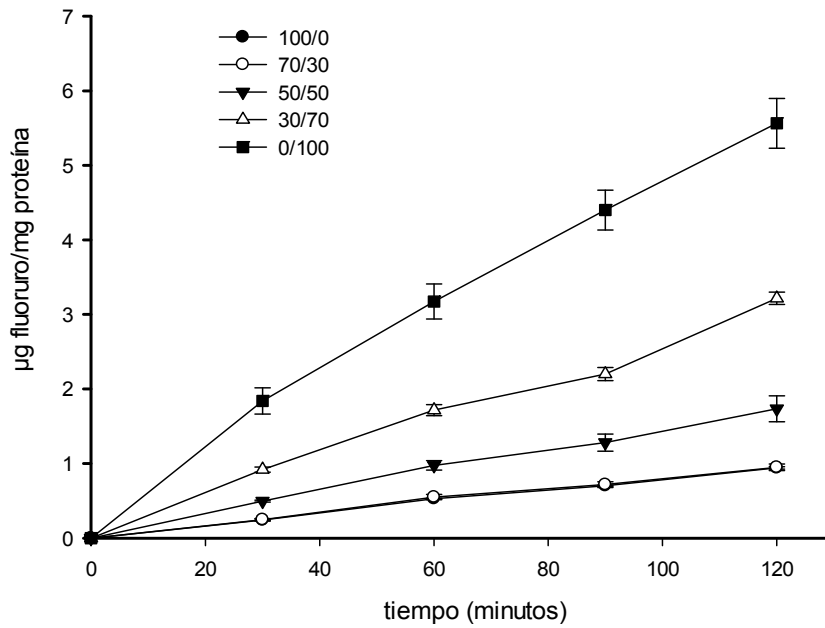


Figura 3. Transporte de fluoruro (20 µg/mL) en función del tiempo para las distintas monocapas celulares Caco-2/HT29-MTX ensayadas. Valores expresados como µg fluoruro/mg proteína (media ± desviación estándar, n=4).

3. Influencia del mucus secretado por la línea HT29-MTX en el transporte de fluoruro

Algunos estudios muestran que el mucus secretado por las células caliciformes interacciona con elementos traza como arsénico y aluminio, disminuyendo la internalización de estos elementos en la monocapa celular (Powell y col., 1994; Calatayud y col., 2012b). Esto puede actuar como un mecanismo de detoxificación de estos elementos traza. El estudio de la influencia del mucus sobre la permeabilidad aparente de fluoruro llevado a cabo en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (50/50) muestra que la eliminación

del mucus conlleva un aumento estadísticamente significativo de la permeabilidad (2-3 veces) respecto al co-cultivo con mucus (figura 4).

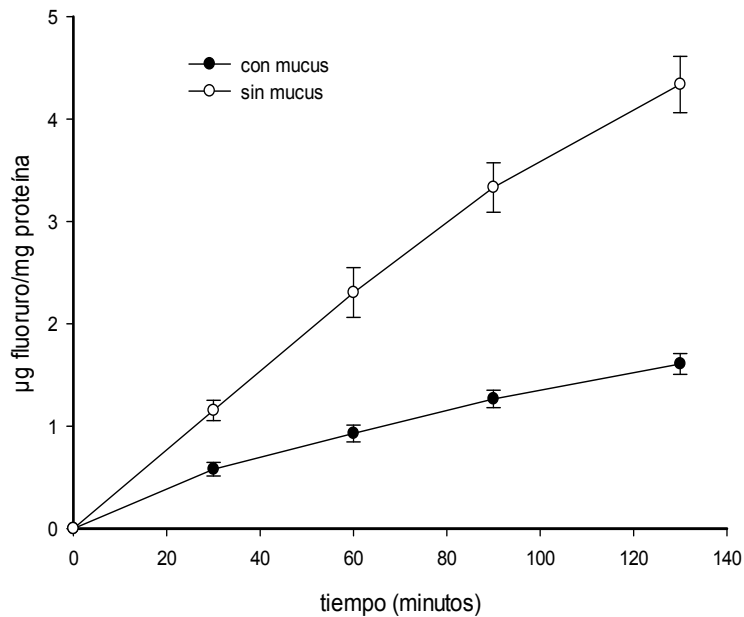


Figura 4. Transporte de fluoruro (20 µg/mL) en función del tiempo, en presencia o ausencia de mucus para la monocapa Caco-2/HT29-MTX (50/50). Valores expresados como µg fluoruro/mg proteína (media ± desviación estándar, n=4).

4. Influencia del pH en el transporte de fluoruro

Teniendo en cuenta que el pH es uno de los factores determinantes en el transporte de fluoruro en el monocultivo celular Caco-2 (capítulo 4), se ha evaluado si este efecto persiste en los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX. La figura 5 muestra el transporte, expresado en µg/mg de proteína, para las distintas condiciones de pH en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (50/50). Los resultados indican que el pH 5.5 en el lado apical aumenta significativamente el transporte de fluoruro en el co-cultivo, al igual que

ocurría en las monocapas formadas por células Caco-2 (capítulo 4). El aumento observado en co-cultivos es, sin embargo, menos acentuado.

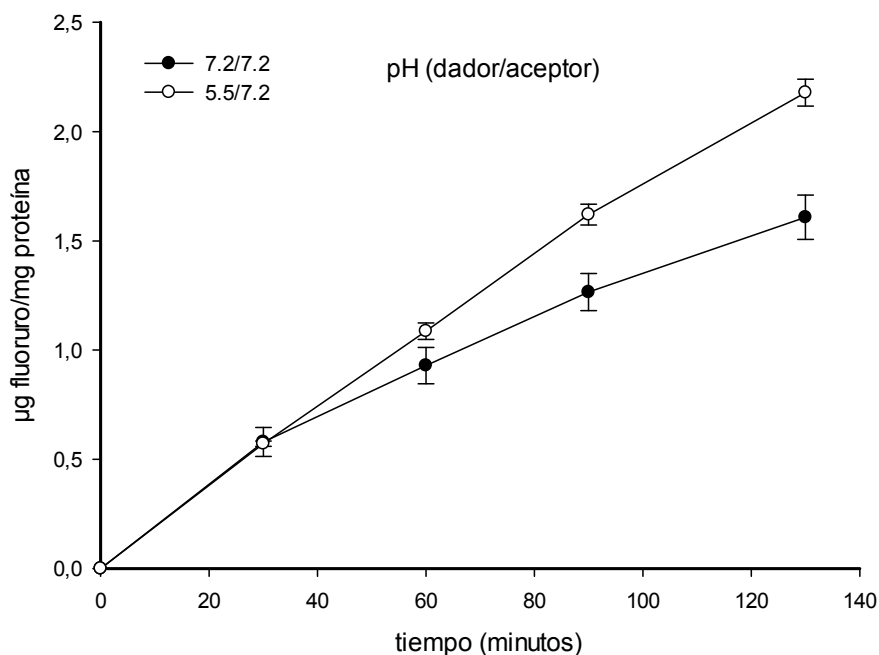


Figura 5. Transporte de fluoruro (20 µg/mL) en función del tiempo a diferentes pHs en la monocapa Caco-2/HT29-MTX (50/50). Valores expresados como µg fluoruro/mg proteína (media ± desviación estándar, n=4).

5. Influencia del ácido taucólico en el transporte de fluoruro

El ácido taucólico es un componente de las sales biliares que influye en la absorción de determinados compuestos. Se ha descrito que favorece la absorción de moléculas hidrofílicas modulando las uniones intercelulares (Meaney y O'Driscoll, 1999). En este trabajo se ha estudiado el efecto del ácido taucólico (20 mM) en el transporte de fluoruro en los monocultivos HT29-MTX y Caco-2, así como en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50). La presencia de ácido taucólico no modifica el valor de la RET en

HT29-MTX, mientras que si produce una disminución de este parámetro en Caco-2 (40%) y en el co-cultivo (20%) (tabla 2).

Tratamiento	Caco-2/HT29-MTX	RET (Ohms×cm ²)
Sin TC	100/0	280 ± 7
	50/50	177 ± 5
	0/100	140 ± 1
Con TC	100/0	169 ± 3
	50/50	139 ± 8
	0/100	136 ± 1

Tabla 2. Valores de RET al final del ensayo en las distintas monocapas celulares con o sin tratamiento con ácido taurocólico (TC, 20 mM). Valores expresados como Ohms×cm² (media ± desviación estándar, n=4).

Del mismo modo, el ácido taurocólico aumenta el transporte de LY significativamente en co-cultivos y en Caco-2, sin embargo, no afecta la permeabilidad del LY en el monocultivo HT29-MTX (figura 6).

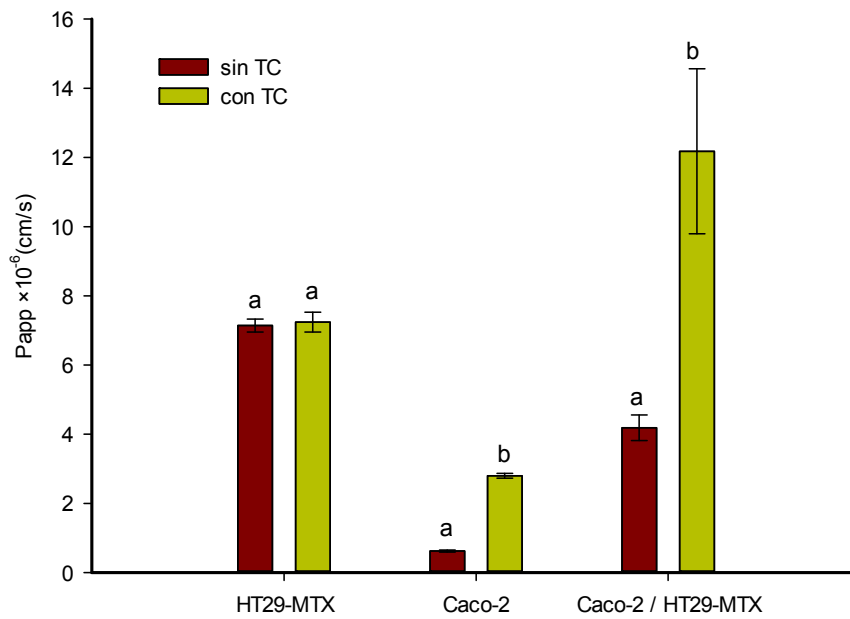


Figura 6. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY (100 μ M) en las diferentes monocapas ensayadas en presencia o ausencia de ácido taurocólico (TC 20 mM). Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, n=4). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las células tratadas con TC y las no tratadas.

La figura 7 muestra los valores del P_{app} del fluoruro para los distintos modelos celulares, con y sin ácido taurocólico. El efecto sobre el transporte de fluoruro es muy semejante al observado para LY, con incrementos del P_{app} para el monocultivo Caco-2 (6 veces) y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (3 veces), mientras que en HT29-MTX el incremento es mínimo (1.2 veces), aunque significativo.

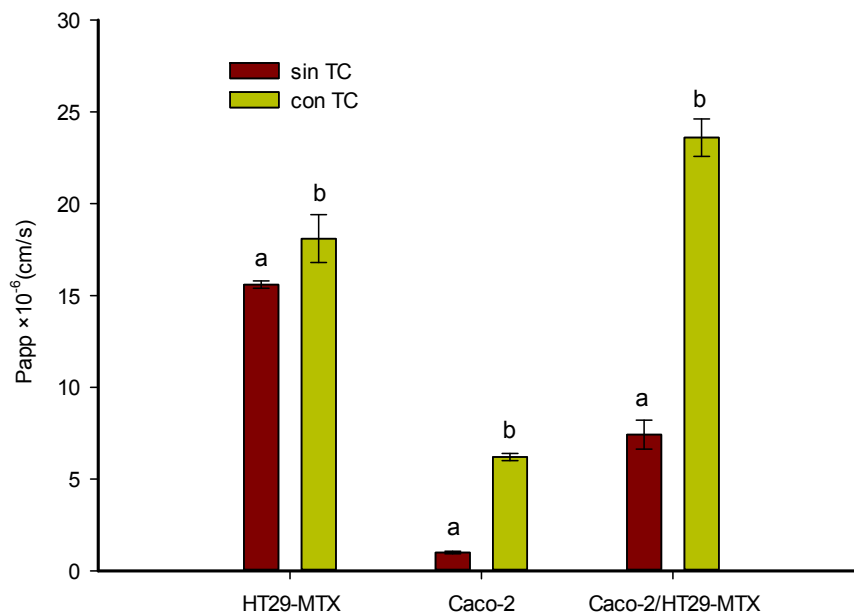


Figura 7. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en presencia o ausencia de ácido taurocólico (TC 20 mM). Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, $n=4$). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre las células tratadas con TC y las no tratadas.

El hecho de que el incremento del transporte de fluoruro en presencia de taurocólico sea menor en HT29-MTX y en el co-cultivo que en el monocultivo Caco-2, podría indicar que la capa de mucus contrarresta o impide la acción del ácido taurocólico, tal y como han descrito otros autores (Meaney y O'Driscoll, 1999). Por ello se ha evaluado el efecto del ácido taurocólico sobre el transporte de fluoruro tras eliminar la capa de mucus del monocultivo HT29-MTX y del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50).

La figura 8 muestra las permeabilidades del fluoruro en las monocapas HT29-MTX y Caco-2/HT29-MTX (50/50), con o sin mucus, tratadas con

ácido taurocólico o sin este tratamiento. Los resultados indican que tras la eliminación del mucus, el ácido taurocólico también aumenta el P_{app} del fluoruro. Sin embargo, los aumentos son iguales (HT29-MTX) o inferiores (Caco-2/HT29-MTX 50/50) a los que presentaban las monocapas con el mucus, por tanto la capa de mucus no afecta la acción del taurocolato sobre el transporte del fluoruro.

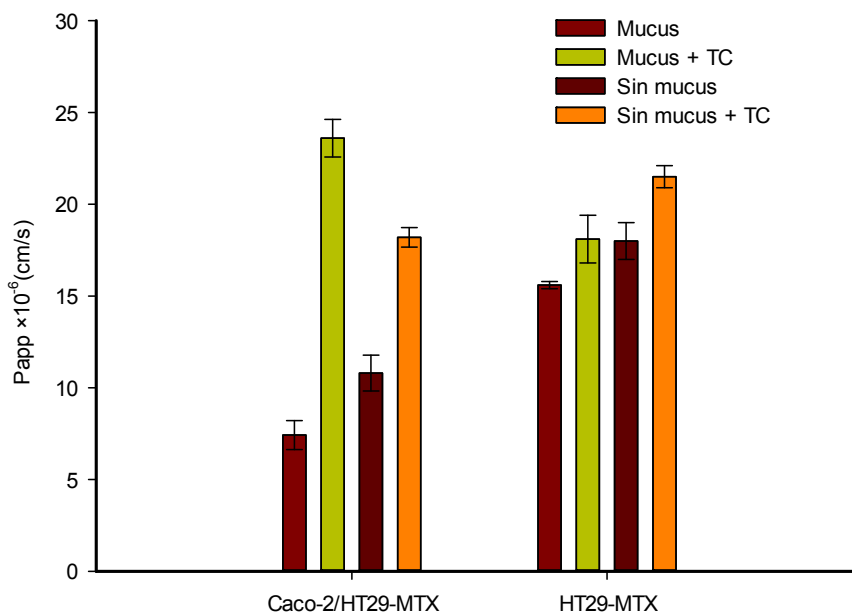


Figura 8. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) en células con o sin mucus tras la adición de ácido taurocólico (TC 20 mM) o sin tratamiento con TC. Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, $n=4$).

6. Efecto de la matriz alimentaria en el transporte de fluoruro

La figura 9 muestra el transporte en Caco-2 y en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (50/50) del fluoruro presente en la fracción bioaccesible de

una muestra de arroz cocinada con agua con fluoruro. Los resultados se han comparado con el transporte de un patrón de fluoruro de igual concentración (3 mg/L) que la fracción bioaccesible del arroz.

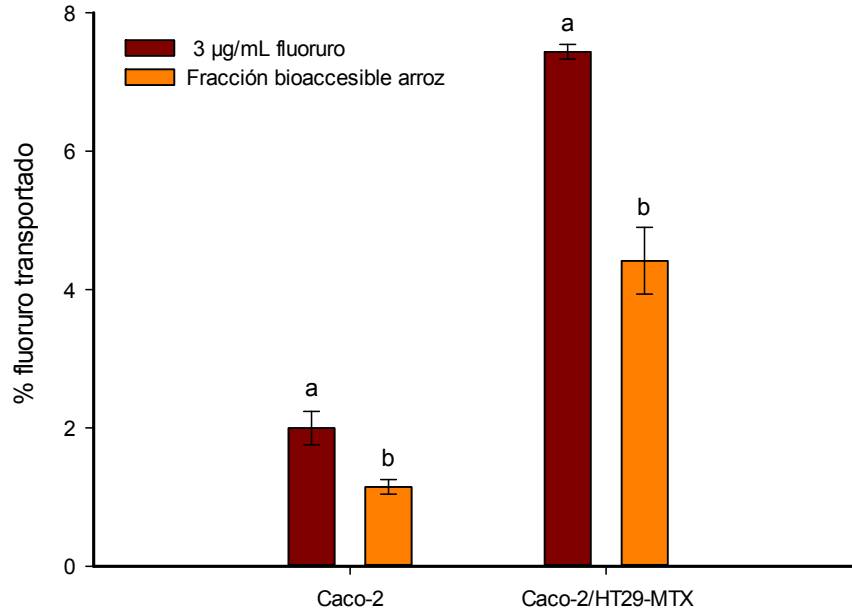


Figura 9. Porcentaje de fluoruro transportado en Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX (50/50) tras 2 horas de exposición a un patrón de fluoruro (3 µg/mL) y a la fracción bioaccesible del arroz cocinado. Resultados expresados como media ± desviación estándar (n=4). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el patrón y el bioaccesible en cada una de las monocapas.

El transporte de fluoruro tras 2 horas de contacto con el bioaccesible del arroz cocinado es superior en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (4.4%) que en el monocultivo Caco-2 (1%). El patrón de fluoruro muestra la misma tendencia que el arroz, es decir se transporta más a través del co-cultivo, si bien con porcentajes de transporte superiores (8% en co-cultivo, 2% en Caco-2). Existe pues un efecto de la matriz alimentaria sobre el transporte de

fluoruro, que quizás sea consecuencia del incremento de la RET que se produce tras dos horas de exposición a la muestra de arroz (13% en Caco-2, 36% en co-cultivo) frente a la ausencia de cambios significativos o incluso de disminuciones en el valor de la RET con el patrón de fluoruro (tabla 3).

Monocapa	Muestra	RET (Ohms×cm ²)	
		Tiempo inicial	120 minutos
Caco-2/HT29-MTX (50/50)	Patrón	199 ± 3	194 ± 10
	Arroz	206 ± 3	281 ± 3
Caco-2	Patrón	322 ± 5	281 ± 13
	Arroz	337 ± 9	392 ± 2

Tabla 3. Valores de RET al inicio y final del ensayo tras 2 horas de exposición a un patrón de fluoruro (3 µg/mL) y a la fracción bioaccesible del arroz cocinado. Valores expresados como Ohms×cm² (media ± desviación estándar, n=4).

DISCUSIÓN

Los estudios *in vivo* sobre la absorción intestinal de fluoruro indican que es un elemento que se absorbe rápidamente tras su ingesta y que lo hace en porcentajes elevados (70-90%) en ausencia de alimentos (Fawell y col., 2006). Los resultados obtenidos en el capítulo 4, que muestran una moderada absorción del fluoruro en disolución acuosa, indicarían que no existe una adecuada correlación entre la predicción empleando el modelo *in vitro* Caco-2 y lo observado *in vivo*. Este inconveniente ya ha sido reportado para otros compuestos y por ello en ocasiones las células Caco-2 se utilizan para

evaluar los mecanismos implicados en la absorción intestinal, pero no para obtener datos cuantitativos de absorción. Le Ferrec y col. (2001) apuntan a que las predicciones dadas por distintos laboratorios sobre la absorción en humanos basadas en los estudios de permeabilidad en Caco-2 no son satisfactorias. Por otro lado, los criterios para correlacionar permeabilidad *in vitro* Caco-2/absorción *in vivo* varían según el estudio considerado. Así, Artursson y Karlsson (1991) concluyen que una sustancia es altamente absorbida *in vivo* cuando el P_{app} *in vitro* es mayor o igual a 10^{-6} cm/s. Yee (1997) en cambio habla de alta absorción a $P_{app} > 10^{-5}$ cm/s, mientras que Rubas y col. (1993) consideran que son absorbidos completamente los compuestos con una $P_{app} > 7 \times 10^{-5}$ cm/s.

Una de las limitaciones del modelo Caco-2 es el hecho de que las uniones intercelulares son más estrechas que las que presenta el intestino delgado. El radio del poro de las uniones intercelulares oscila entre 8 y 13 Å en el intestino delgado humano, mientras que en la monocapa formada por la línea Caco-2 es de aproximadamente 5 Å (Tavelin, 2003). Este hecho afecta a los compuestos cuyo transporte a través del epitelio intestinal presenta un importante componente paracelular, como es el caso del fluoruro (capítulo 4). En el presente estudio se observa que la incorporación de la línea celular HT29-MTX al cultivo Caco-2 disminuye la resistencia eléctrica transepitelial y aumenta el transporte del LY, compuesto que se transporta principalmente a través de las uniones intercelulares. Es decir, la incorporación de la línea secretora de mucus aumenta el radio del poro entre células. Esto a su vez, se traduce en una permeabilidad más alta para el fluoruro, que siguiendo los criterios de Yee (1997) pasa de considerarse un compuesto de moderada absorción en Caco-2 ($10^{-6} < P_{app} < 10^{-5}$ cm/s) a un compuesto de alta absorción en monocultivos HT29-MTX ($P_{app} > 10^{-5}$ cm/s). Además de la apertura de las uniones intercelulares, la presencia de las

células secretoras de mucus podría favorecer el paso de fluoruro por otros motivos relacionados con la estructura de estas uniones en este tipo celular. De hecho, Madara y Trier (1982) muestran que en el intestino delgado de ratas, las uniones intercelulares de las células caliciformes son más permeables a los iones que las presentes en las células absortivas.

Por otro lado, la introducción de la línea HT29-MTX permite la evaluación del transporte teniendo en cuenta un componente presente en condiciones normales en el intestino humano, la capa de mucus. Se considera que el gel formado por el mucus actúa como barrera a la difusión de pequeñas moléculas como los iones (Wikman y col., 1993). De hecho, la evaluación de la permeabilidad del fluoruro en co-cultivos tras la eliminación del mucus, proceso que no afecta la RET, muestra un aumento significativo del transporte de este elemento. Por tanto, en condiciones normales, esta capa de glicoproteínas disminuiría la absorción de fluoruro, sobre todo si la unión del elemento al mucus tiene lugar en la capa más externa del mismo, la cual no está firmemente unida al epitelio y se elimina continuamente por las heces. Por otro lado, cualquier situación que suponga una disminución de la capa de mucus, como son los procesos inflamatorios o el tratamiento con antibióticos, podría conllevar un aumento de la absorción del elemento.

Otro factor importante en la absorción de compuestos hidrofílicos, y en concreto del fluoruro, es el pH intraluminal, tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo 4. En el presente estudio se observa que en co-cultivos a pH 5.5 también se favorece el transporte de fluoruro. Sin embargo, las diferencias en la permeabilidad del fluoruro al variar el pH en el lado apical no son tan acentuadas como las observadas en Caco-2 (capítulo 4). Esto podría ser consecuencia de la presencia de la capa de mucus, característica diferencial entre ambos modelos celulares. En este sentido,

Sababi y col. (1995) muestran que la exposición de la mucosa intestinal a pH ácidos conlleva un aumento de la secreción de mucus (44%). Teniendo en cuenta que el mucus disminuye el transporte de fluoruro, el posible incremento de la capa de mucus en co-cultivos por el medio ácido podría disminuir el efecto del pH sobre el transporte de este elemento.

Otro factor que también tiene una influencia demostrada sobre la absorción intestinal de compuestos hidrofílicos son las sales biliares (Meaney y O'Driscoll, 1999). En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que la presencia de ácido taurocólico aumenta el transporte de fluoruro. La permeabilidad en presencia de taurocolato en la monocapa formada por Caco-2/HT29-MTX (50/50) es de 2×10^{-5} cm/s. Atendiendo a los criterios de distintos autores (Artursson y Karlsson, 1991; Yee, 1997), se podría considerar que en presencia de sales biliares el fluoruro en disolución acuosa tiene una alta absorción, y por lo tanto un comportamiento similar al observado en animales de experimentación y humanos. El ácido taurocólico disminuye la RET y aumenta el paso de LY, por tanto produce una apertura de las uniones intercelulares tal y como ya han puesto de manifiesto otros autores (Meaney y O'Driscoll, 1999). Baruch y col. (1991) demuestran que los monómeros o las micelas de ácido taurocólico unen iones Ca^{+2} . Esto supondría la eliminación del medio de cultivo de iones necesarios para mantener la integridad de las uniones intercelulares. Por otro lado, si este componente de las sales biliares elimina iones Ca^{+2} , el transporte de fluoruro podría verse favorecido al eliminar del medio un elemento con el que forma complejos insolubles.

Además de factores propios del tracto intestinal como la capa de mucus, el pH intraluminal o la presencia de sales biliares, hay otros factores externos que pueden afectar igualmente la permeabilidad intestinal de un compuesto. Se ha puesto de manifiesto que determinados componentes de la

dieta pueden afectar la absorción intestinal por la formación de complejos con el compuesto de interés, por la modulación de las uniones intercelulares o por competición por un mismo transportador. En este estudio se ha comparado el transporte apical-basolateral del fluoruro bioaccesible del arroz con el de una disolución acuosa que presentaba la misma cantidad del elemento. Los resultados obtenidos muestran que el transporte de fluoruro a través de la monocapa intestinal es menor cuando está formando parte de la matriz alimentaria.

Esta diferencia puede ser consecuencia de varios factores. En primer lugar, en este estudio se ha evidenciado que el arroz aumenta la resistencia transepitelial (36% en Caco-2/HT29-MTX y 13% en Caco-2), lo que puede suponer una reducción del transporte paracelular del fluoruro respecto al patrón acuoso. El aumento de la RET podría deberse a cambios en el ratio de expresión de las proteínas de las uniones intercelulares. Existen componentes dietéticos que modulan la expresión de proteínas integrantes de las uniones intercelulares, como el Zn^{+2} , la glutamina, polifenoles y ácidos poliinsaturados (Amasheh y col., 2009). En este sentido el arroz presenta concentraciones importantes de Zn^{+2} que oscilan entre 5.9-12.6 mg/kg (Rivero Huguet y col., 2006).

En segundo lugar, el fluoruro forma complejos insolubles con distintos elementos presentes en los alimentos, como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , disminuyendo su absorción intestinal (Cerklewski, 1987, 1997). El arroz presenta un importante contenido mineral, siendo el K^{+} el mineral más abundante, seguido del Mg^{+2} y el Ca^{+2} . Los contenidos medios de Mg^{+2} y el Ca^{+2} en arroz pueden oscilar entre 9-30 y 45-121 mg/100 g, respectivamente (Rivero Huguet y col., 2006). Cabe esperar que este alto contenido de Mg^{+2} y Ca^{+2} influya negativamente en la bioaccesibilidad, tal y como se ha evidenciado en el capítulo 3, y por lo tanto en la biodisponibilidad del fluoruro. De

hecho, concentraciones similares de Mg^{+2} en la dieta (>200 mg/kg) conllevan una reducción de la absorción de fluoruro en ratas (Cerklewski, 1987).

El presente capítulo pone de manifiesto que la evaluación de la permeabilidad del fluoruro varía significativamente según el modelo celular empleado, y que a su vez está condicionada por factores propios del tracto digestivo (pH intraluminal, presencia de sales biliares) o por factores externos (componentes dietéticos). La modificación de la resistencia eléctrica transepitelial afecta de forma muy acentuada el transporte de este elemento en co-cultivos, lo que indica que al igual que ocurre en monocultivos Caco-2 (capítulo 4), la difusión a través de las uniones intercelulares es muy importante en su transporte intestinal. Las distintas condiciones de ensayo modifican la clasificación del elemento, que dependiendo del modelo celular y los factores considerados puede clasificarse como un compuesto de baja, moderada, incluso de alta absorción intestinal atendiendo a los criterios existentes. La aproximación más cercana a la situación existente en el intestino delgado proximal (co-cultivo células absorptivas/células caliciformes, pH 5.5 y presencia de sales biliares) permite clasificar al fluoruro como un elemento de elevada absorción, más acorde con los resultados observados *in vivo*. Por tanto, posiblemente un modelo que contemple todos estos factores sería más idóneo para evaluar *in vitro* la biodisponibilidad del fluoruro desde los alimentos.

Otra posibilidad, teniendo en cuenta la naturaleza del fluoruro y sus características de transporte, puede ser el empleo de otro modelo con un paso paracelular más cercano al existente en el intestino delgado que el que presentan los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX. En este sentido, Tavelin y col. (2003) han descrito que la línea celular intestinal 2/4/A1 procedente de ratón presenta uniones intercelulares similares a las presentes en el intestino

humano. Tavelin y col. (1999) muestran que el transporte de drogas con baja permeabilidad a través de las monocapas formadas por la línea celular 2/4/A1 es comparable a la observada en el intestino humano y 300 veces mayor que el transporte obtenido con la línea celular Caco-2, mientras que el transporte de drogas con elevada permeabilidad es comparable entre ambos modelos celulares.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo evidencian la necesidad de estudiar los mecanismos y los factores que afectan al transporte de un compuesto a través de la monocapa intestinal para poder elegir el modelo *in vitro* mas óptimo en los estudios de biodisponibilidad a partir de alimentos.

Capítulo 6

Estudios sobre los efectos *in vitro* de la exposición a fluoruro en la monocapa epitelial del intestino

La exposición crónica a concentraciones elevadas de fluoruro está vinculada al desarrollo de determinadas patologías relacionadas principalmente con los tejidos calcificados. También se han descrito desórdenes en tejidos no calcificados que presentan una importante perfusión como el riñón, hígado y sistema reproductor (NCR, 2006). Sin embargo, son escasos los trabajos que estudian su efecto sobre el sistema digestivo y en concreto sobre la mucosa intestinal, responsable de las principales funciones del intestino, absorción y digestión. En el presente capítulo se han evaluado los efectos que puede tener la exposición a fluoruro sobre determinados aspectos relacionados con el adecuado funcionamiento del epitelio intestinal. Se ha analizado el efecto de exposiciones repetidas en el tiempo sobre la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular y la estructura y permeabilidad de la monocapa epitelial. En estos estudios también se han evaluado posibles alteraciones de la resistencia eléctrica transepitelial y la permeabilidad paracelular. Adicionalmente se ha comprobado si el fluoruro es capaz de generar una respuesta inflamatoria analizando la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias en exposiciones a corto plazo y en exposiciones repetidas en el tiempo.

RESULTADOS

Todos los ensayos se han llevado a cabo en condiciones subletales, con una viabilidad celular superior al 85%. Se ha evaluado la integridad del RNAm obtenido tras la extracción, y exceptuando los tratamientos de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ llevados a cabo para los estudios de inflamación a tiempos cortos (figura 1), en todos los demás casos se confirma la integridad del RNAm. Por ese motivo, en el estudio de inflamación a 24 y 48 horas, sólo se presentan los resultados obtenidos con la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adicionalmente, el gen ARN ribosómico 18S (*RN18S*) empleado como referencia, no muestra cambios de expresión significativos al comparar células control con células tratadas con fluoruro, indicando su idoneidad como gen de referencia en este estudio.

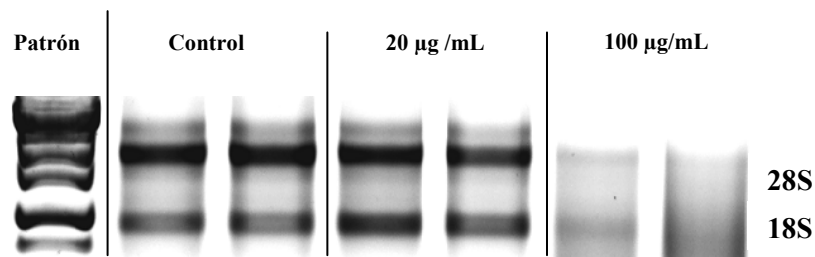


Figura 1. Análisis de la integridad del RNA total extraído de células Caco-2 control y células Caco-2 expuestas a 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluoruro durante 24 horas. Electroforesis con gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio (1/20000). 28S: RNA ribosómico unidad grande; 18S: RNA ribosómico unidad pequeña.

1. Efecto de la exposición sobre la diferenciación de las células Caco-2

El uso de soportes permeables en cultivos de células epiteliales permite el desarrollo de células polarizadas en condiciones más cercanas a la realidad. Por otro lado, la diferenciación celular alcanza niveles más elevados dando lugar a monocapas celulares que se asemejan morfológica y funcionalmente en mayor medida al patrón *in vivo*. Por este motivo, los ensayos sobre el efecto del fluoruro en la diferenciación celular de Caco-2 se han llevado a cabo en los sistemas Transwell[®] descritos en el apartado 3.2.2 de metodología. Tras la siembra las células se expusieron inmediatamente a tres concentraciones de fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y la exposición se mantuvo durante 18 días. El seguimiento de la diferenciación se realizó mediante el estudio de la expresión génica de dos enzimas presentes en el borde de cepillo y cuya expresión se incrementa durante la diferenciación, la fosfatasa alcalina intestinal (ALPI) y la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP4).

Las figuras 2 y 3 muestran, respectivamente, la expresión diferencial de las enzimas ALPI y DPP4 a los 14 y 18 días. La expresión a estos tiempos se ha comparado con la expresión observada a los 7 días post-siembra para cada una de las condiciones de ensayo (control, 2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados muestran que la expresión de ambas enzimas aumenta con el tiempo de siembra para las células control y las células tratadas con la concentración más baja de fluoruro (2.5 $\mu\text{g/mL}$). El comportamiento de las células tratadas con las mayores concentraciones de fluoruro es diferente. En estas monocapas la expresión de *ALPI* y *DDP4* no aumenta con el tiempo, incluso se observa en algunos casos una disminución de la expresión.

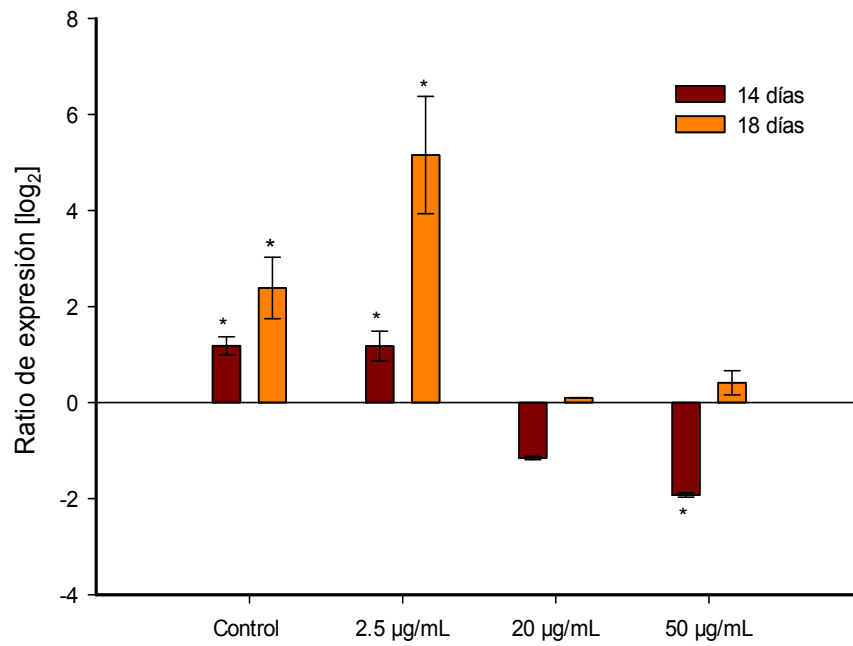


Figura 2. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de la fosfata alcalina intestinal (*ALPI*) en células Caco-2 control y tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 µg/mL) a los 14 y 18 días post-siembra (media ± desviación estándar, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a las células con los mismos tratamientos a los 7 días post-siembra ($p < 0.05$).

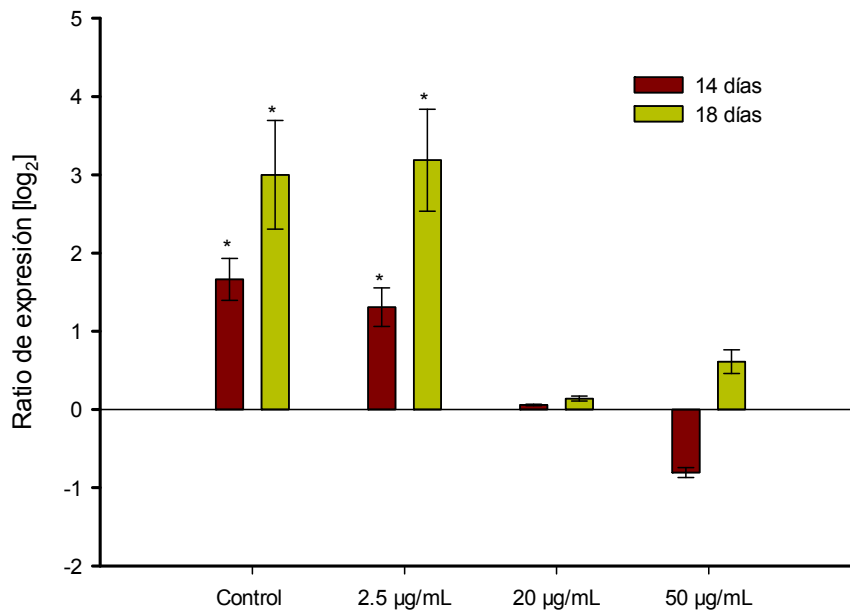


Figura 3. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de dipeptidilpeptidasa 4 (*DPP4*) en células Caco-2 control y tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 µg/mL) a los 14 y 18 días post-siembra (media ± desviación estándar, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a las células con los mismos tratamientos a los 7 días post-siembra ($p < 0.05$).

2. Efecto de la exposición a fluoruro sobre la permeabilidad de las monocapas Caco-2

Los estudios de permeabilidad se llevaron a cabo en las mismas células empleadas en los estudios de diferenciación. La permeabilidad se evaluó mediante la medida de la RET y del transporte del LY, y mediante la evaluación de la expresión diferencial de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares (claudina 1, ocludina, ZO-1, JAM-1 y E-cadherina) en células tratadas con fluoruro frente a células control.

La figura 4 muestra la evolución de la RET con el tiempo para las células expuestas a las distintas concentraciones de fluoruro y para las células control. En todos los casos la curva de la RET es similar, aumenta inicialmente hasta el noveno día de siembra y a partir de este momento hay una ligera disminución de los valores, más acentuada para las células tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (15-20%). Los valores de la RET para las células control y las células tratadas con 2.5 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son similares a todos los tiempos. Para la concentración más elevada, sin embargo, a partir del quinto día se observa un aumento de la resistencia transepitelial (34%) con respecto a las otras condiciones, aumento que se mantiene hasta el final del ensayo.

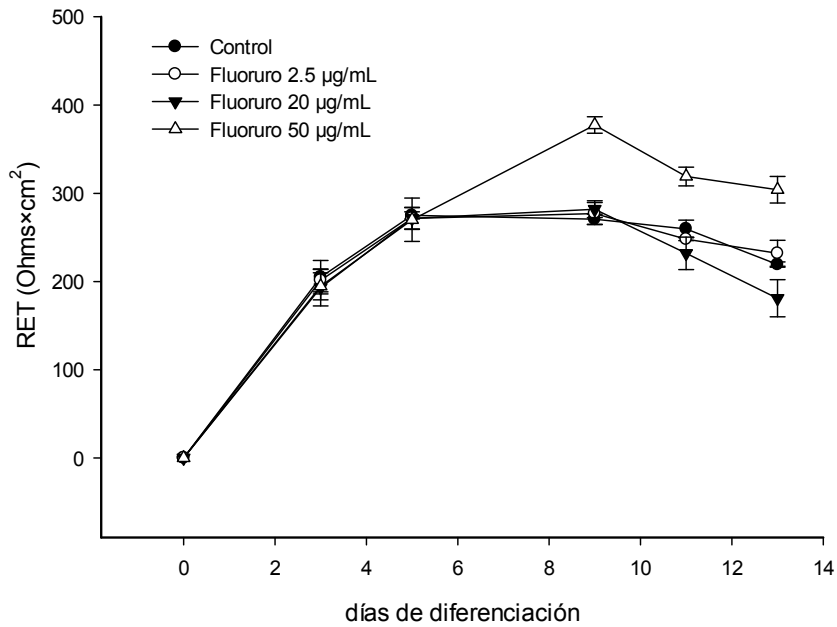


Figura 4. Variación de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de las células control y las células tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con el tiempo. Valores expresados como $\text{Ohms}\times\text{cm}^2$ (media \pm desviación estándar, $n=3$).

El coeficiente de permeabilidad aparente del LY, cuyo transporte es principalmente a través de la vía paracelular, se muestra en la figura 5. A los 7 días post-siembra, el valor del P_{app} del LY en las células expuestas a fluoruro es similar al observado para las células control. Sin embargo, tras 14 días de exposición el P_{app} del LY disminuye a medida que aumenta la concentración de fluoruro en el medio, siendo 2.3 veces inferior en las células tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$ que en las monocapas sin tratamiento.

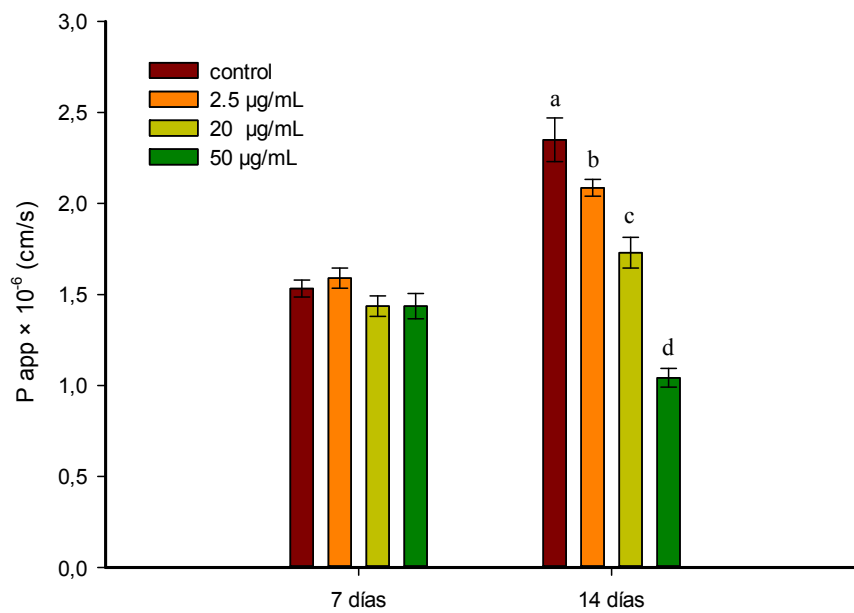


Figura 5. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY en células control y células tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 7 y 14 días. Valores expresados como cm/s (media \pm desviación estándar, $n=3$). Las diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre tratamientos.

Los ensayos llevados a cabo para evaluar la expresión de los genes que codifican las proteínas de las uniones intercelulares muestran que tras 7 días de exposición en sistemas Transwell[®] a las concentraciones de 20 y 50

$\mu\text{g/mL}$, hay una inducción de la expresión de la mayoría de genes ensayados (figura 6). Este aumento es dependiente de la concentración, ya que para todos los genes inducidos es más acentuado en las células tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$. Las células tratadas con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ muestran sin embargo, una expresión similar al control no tratado. A los 14 días de tratamiento no existen cambios significativos en la expresión génica de ninguna las proteínas analizadas con respecto a las células no tratadas (datos no mostrados). Sin embargo, a los 18 días empiezan a observarse regulaciones a la baja en las células tratadas con las concentraciones más elevadas, estadísticamente significativas para *ZO-1* y *JAM-1* (datos no mostrados).

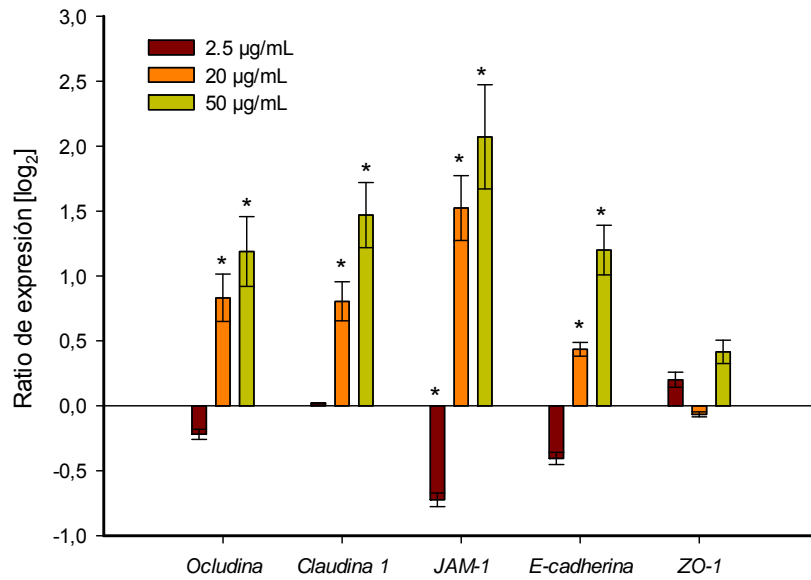


Figura 6. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de proteínas de las uniones intercelulares en células Caco-2 tratadas con fluoruro (2.5, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 7 días (media \pm desviación estándar, $n=4$). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado ($p<0.05$).

3. Respuesta inflamatoria de células Caco-2 expuestas a fluoruro

La figura 7 muestra la expresión génica diferencial de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 e IL-8) y antiinflamatorias (IL-10 e IL-13) en células Caco-2 expuestas a 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoruro durante 24 y 48 horas. Los resultados muestran un aumento de la expresión del factor de necrosis tumoral y de las citoquinas IL-6 e IL-8 a todos los tiempos de exposición. En cuanto a las citoquinas antiinflamatorias, se observa un aumento de la expresión de IL-10 a las 24 horas, mientras que a tiempos superiores se pone de manifiesto un descenso de la expresión, especialmente de la citoquina IL-13, sin que se observen diferencias significativas respecto al control.

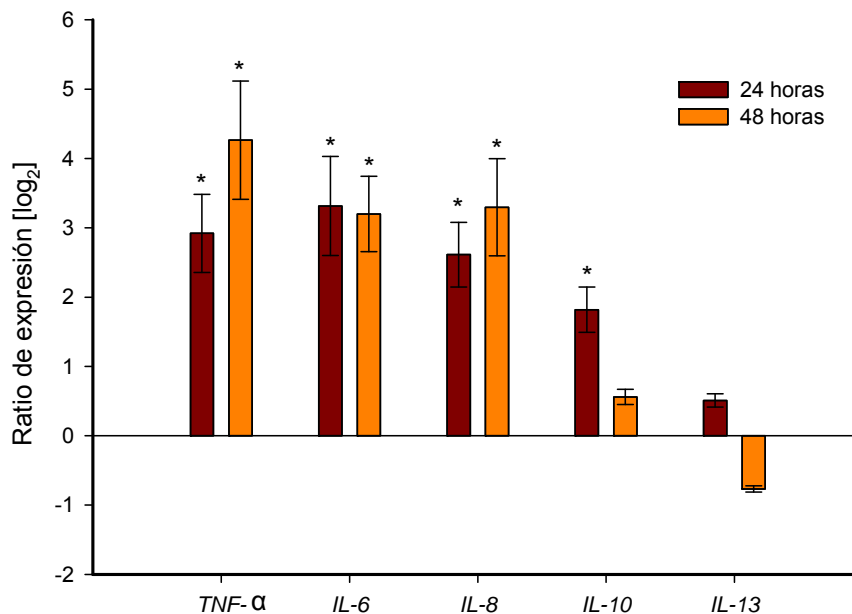


Figura 7. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de citoquinas en células Caco-2 tratadas con fluoruro (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 y 48 horas (media \pm desviación estándar, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado ($p < 0.05$).

La figura 8 muestra la expresión génica diferencial de citoquinas tras la exposición de células Caco-2 durante 14 días a 20 µg/mL de fluoruro. La comparación de la expresión de las células tratadas respecto a las células control mantenidas en cultivo el mismo tiempo, pone de manifiesto un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) y una regulación a la baja de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-13). Se mantiene por lo tanto, la respuesta proinflamatoria puesta de manifiesto a tiempos cortos, y se confirma con esta exposición la bajada del nivel de expresión de las citoquinas antiinflamatorias en las monocapas tratadas con fluoruro.

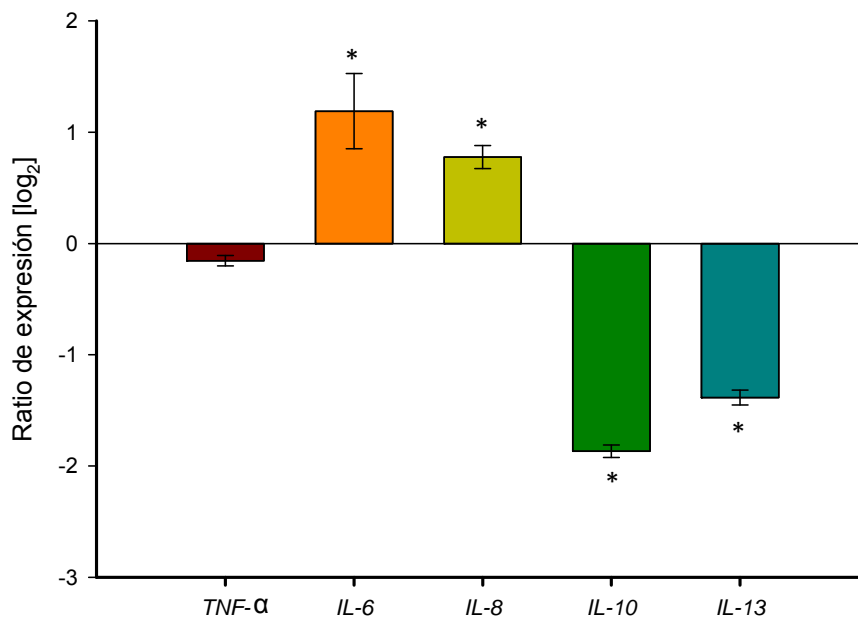


Figura 8. Ratio de expresión relativa (en escala logarítmica en base 2) de citoquinas en células Caco-2 tratadas con fluoruro (20 µg/mL) durante 14 días (media ± desviación estándar, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado (p<0.05).

DISCUSIÓN

La revisión realizada por la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (NRC, 2006) indica que a medida que aumenta la concentración de fluoruro en el agua de bebida hay un aumento de los problemas gastrointestinales. Según este informe, concentraciones de fluoruro en el agua de 4 mg/L conllevan un aumento de la población con síntomas gastrointestinales en aproximadamente un 1%. Sin embargo, las evaluaciones llevadas a cabo en Estados Unidos y Reino Unido en poblaciones expuestas a concentraciones mayores a 4 mg/L de fluoruro en el agua no reportan problemas gastrointestinales (NRC, 2006). En contraste a estas observaciones, en poblaciones de la India donde existe fluorosis endémica, se han evidenciado desórdenes gastrointestinales severos (Gupta y col. 1992; Susheela y col. 1993; Dasarathy y col. 1996). Susheela y col. (1988) ponen de manifiesto mediante endoscopias del tracto gastrointestinal que los enterocitos presentan una pérdida de las microvellosidades y que la mucosa muestra una superficie dañada y con ausencia de la capa de mucus común en una mucosa gastrointestinal sana. La presencia de estos efectos a nivel gastrointestinal en las poblaciones de la India puede ser consecuencia de la malnutrición de los individuos estudiados o simplemente que los autores han llevado a cabo un estudio a nivel gastrointestinal más detallado que el realizado en Estados Unidos y Reino Unido.

En el informe de la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense citado anteriormente (NRC, 2006) se indica la necesidad de entender los mecanismos que desencadenan los efectos del fluoruro en el sistema gastrointestinal y las consecuencias de estos desórdenes. La mayoría de estudios *in vivo* al respecto se han llevado a cabo en roedores y se han centrado en los efectos a nivel gástrico, donde se ha observado un aumento

de la secreción de ácidos (Shayiq y col., 1984) y de la permeabilidad del epitelio gástrico principalmente a moléculas de pequeño tamaño (Pashley y col., 1984).

En la presente tesis se ha llevado a cabo un estudio para evaluar los efectos de la exposición a fluoruro sobre el epitelio intestinal empleando como modelo la línea celular Caco-2. Esta línea se diferencia dando lugar a una monocapa epitelial con características morfológicas similares a las células columnares presentes en el epitelio intestinal humano (Hidalgo et al., 1989). Los datos bibliográficos muestran que las células Caco-2 expresan muchos de los enzimas y transportadores del intestino humano (Maubon y col., 2007) y que su proceso de diferenciación es semejante al del enterocito. Por todas estas características se consideran de potencial interés para estudios relacionados con la polarización y diferenciación celular, la biogénesis de enzimas y la evaluación del transporte intestinal (Simon-Assmann y col., 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que son células procedentes de un adenocarcinoma con mutaciones en ciertas enzimas (p53, APC, β -catenin y Smad4) (Gayet y col., 2001) y por tanto, es necesario corroborar los datos relacionados con mecanismos de toxicidad en Caco-2 mediante ensayos con líneas intestinales normales, cultivos primarios o estudios *in vivo*.

El epitelio intestinal de los adultos sufre un continuo proceso de renovación. Este proceso conlleva la pérdida de células cuando éstas alcanzan la zona distal de las vellosidades intestinales, mientras que células nuevas migran desde las criptas a estas regiones distales. A lo largo del proceso de migración las células se diferencian dando lugar a los distintos tipos celulares del epitelio, entre ellos a las células absortivas, que son las mayoritarias. Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que la exposición a fluoruro conlleva cambios en la expresión de dos marcadores

de diferenciación (ALPI y DPP4) respecto a las células no tratadas. Estos dos marcadores se emplean de forma rutinaria para verificar el proceso de diferenciación de enterocitos. La bibliografía ponen de manifiesto que la expresión de estas enzimas aumenta tras alcanzar la confluencia durante el proceso de diferenciación de la monocapa celular (Darmoul y col., 1991; Vachon y Beaulieu, 1992; Wang y Evers, 1999; Wu y col., 2004). En este estudio, la confluencia se alcanza aproximadamente el quinto día tras la siembra. A partir de ese momento se observa en las células control y en las células tratadas con la concentración más baja de fluoruro (2.5 µg/mL) un aumento de la expresión de ALPI y DPP4. Sin embargo a concentraciones mayores o iguales a 20 µg/mL se produce el fenómeno contrario, una disminución de la expresión de estas enzimas tras los 7 días de siembra. Este resultado indica que la presencia de fluoruro afecta a la diferenciación de la línea celular intestinal empleada como modelo de epitelio. La exposición continuada a fluoruro podría, por tanto, alterar el proceso de renovación de la mucosa intestinal, necesario para la regeneración y reparación del tejido dañado.

Las uniones estrechas y las adherentes regulan el flujo paracelular y mantienen la polarización apical-basolateral, al evitar la difusión lateral de proteínas de la membrana celular. Estas uniones forman la barrera que define el compartimento interior y exterior de la monocapa epitelial y que evita el paso de sustancias no deseables y microorganismos patógenos desde el lumen. Los elementos constitutivos de estas uniones se pueden clasificar en proteínas que atraviesan la membrana citoplasmática (por ejemplo, ocludina, claudinas, JAM-1 o JAM-A, E-cadherina) y las proteínas citoplasmáticas, que conectan estas proteínas de membrana con el citoesqueleto (por ejemplo, ZO-1) (figura 9). La cantidad y distribución de estas proteínas determinan la eficacia de estas uniones intercelulares.

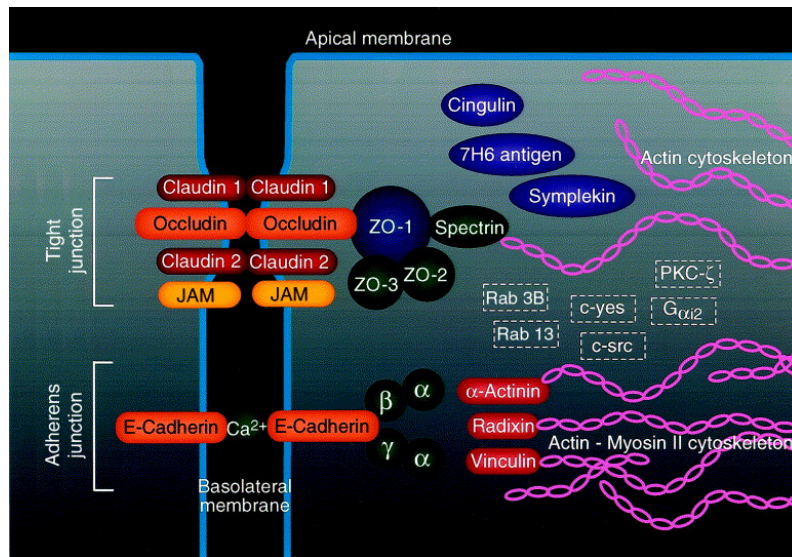


Figura 9. Estructura de las uniones intercelulares (Daugherty y Mrsny, 1999).

La permeabilidad de las uniones está modulada por agentes tan diversos como el éster de forbol, citoquinas proinflamatorias, Ca⁺², ATP, y toxinas bacterianas (Weiler y col., 2005). Wang y col. (2001b) muestran que el fluoruro modula la permeabilidad de monocapas endoteliales de arteria pulmonar bovina, sin embargo, no existen datos sobre los efectos de este elemento sobre la mucosa intestinal. Los ensayos llevados a cabo en este capítulo muestran que las células Caco-2 tratadas con las concentraciones más elevadas de fluoruro (20 y 50 µg/mL) en exposiciones repetidas en el tiempo, forman uniones intercelulares más estrechas, indicando que el fluoruro disminuye la permeabilidad de la monocapa de epitelio intestinal. Esta disminución va acompañada de un aumento de la expresión de proteínas constituyentes de estas uniones, en concreto de la ocludina, la claudina-1, JAM-1 y la E-cadherina. Se ha evidenciado en el intestino que una mayor expresión de claudina-1 y JAM-1 disminuye la permeabilidad paracelular

(Ulluwishewa y col., 2011). Así mismo, Al-Sadi y col. (2011) muestran que la depleción de ocludina *in vitro* en Caco-2 o *in vivo* en ratones conlleva un aumento de la ruta paracelular.

La disminución de la permeabilidad de la monocapa intestinal tras la exposición a fluoruro, difiere de lo observado en otros tipos celulares como las células endoteliales de arteria pulmonar bovina (Wang y col., 2001b) o modelos *in vitro* de barrera hematocefálica (datos no publicados), en los que se observa un aumento de la permeabilidad tras exposición a concentraciones similares de fluoruro. La reducción de la permeabilidad puede resultar beneficiosa en situaciones donde existen problemas intestinales relacionados con un aumento del paso paracelular (inflamaciones crónicas), aunque en condiciones normales una disminución acentuada del paso paracelular puede afectar la permeabilidad de agua e iones que emplean esta vía a través de la pared intestinal.

El tracto gastrointestinal tiene la notable capacidad de permanecer intacto a pesar de estar constantemente expuestos a ácidos, enzimas proteolíticas, compuestos endógenos procedentes de la dieta y microorganismos patógenos. Esta característica depende en parte de los mecanismos de defensa y reparación que posee. Un componente clave de estos mecanismos de defensa es la respuesta inflamatoria (Martin y Wallace, 2006). Aunque la inflamación intestinal es un proceso continuo y de protección, una desregulación de uno de sus componentes puede producir graves trastornos intestinales, que conlleven defectos en la función barrera de las células epiteliales y una actividad inmunitaria exagerada (van de Walle y col., 2010).

La mucosa intestinal es un participante activo en la respuesta inflamatoria. Las células epiteliales del intestino establecen con las células

del sistema inmune interacciones bidireccionales (van de Walle y col., 2010). Su propiedad de modular selectivamente la permeabilidad, así como su capacidad para sintetizar y secretar mediadores inflamatorios, les permite activar las células inmunes e iniciar el proceso inflamatorio. Por otro lado, las células epiteliales del intestino también responden a diversos mediadores inflamatorios secretados por las células del sistema inmune, mediante la modulación de la permeabilidad y secreción de la monocapa epitelial, lo que puede a su vez amplificar o atenuar el proceso inflamatorio. Por tanto, las células del epitelio intestinal son piezas clave en la iniciación y propagación de la inflamación intestinal (Shen y Turner, 2006). Aunque se sabe que el fluoruro puede desencadenar respuesta inflamatoria en algunos tipos celulares (Barbier y col., 2010), no existen datos sobre los efectos de este elemento sobre las células epiteliales del intestino.

En el presente estudio se ha observado que la exposición a fluoruro conlleva una disminución de la expresión de las citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y IL-3) y un aumento de las proinflamatorias (TNF α , IL-8 y IL-6), indicando que el fluoruro produce una respuesta proinflamatoria en las células Caco-2. Esta respuesta se mantiene en el tiempo, ya que se observa a todos los tiempos ensayados (24, 48 horas y 14 días). Estos procesos inflamatorios mantenidos en el intestino podrían ser en parte la causa de los desórdenes gastrointestinales descritos en poblaciones expuestas crónicamente a fluoruro a través del agua de bebida (Gupta y col., 1992; Susheela y col., 1993; Dasarathy y col., 1996). Hay que destacar que los cambios en la diferenciación, permeabilidad y respuesta proinflamatoria se produce principalmente a concentraciones elevadas, superiores a las observadas en agua y en la mayoría de alimentos, si bien si que existen datos sobre algunos productos pesqueros e infusiones de té que alcanzan concentraciones de 20 mg/L o incluso superiores.

Los datos obtenidos en los ensayos de diferenciación y respuesta inflamatoria no concuerdan con una menor permeabilidad de la monocapa, ya que se esperaría que la presencia de citoquinas proinflamatorias y los cambios en el proceso de diferenciación supusieran un aumento de la permeabilidad, como indican los estudios *in vivo* (Rogler y Andus, 1998; Ramage y col., 1988). Sin embargo, cabe destacar que los cambios observados *in vivo* pueden deberse a la respuesta conjunta del sistema inmune y las células epiteliales, la cual no puede ponerse de manifiesto en el modelo empleado en la presente tesis constituido únicamente por células epiteliales del intestino. Por otro lado, el presente estudio evalúa los cambios ocurridos a nivel transcripcional que no necesariamente tienen que traducirse en cambios a nivel proteico. Es necesario realizar un estudio más detallado sobre la secreción de las citoquinas al medio, la actividad de los enzimas de diferenciación y la distribución de las proteínas de las uniones intercelulares para poder constatar que lo evidenciado a nivel transcripcional se refleja a otros niveles.

Este estudio indica que podrían existir cambios importantes en procesos que afectan al funcionamiento del epitelio intestinal. Esta primera aproximación abre la puerta a futuras investigaciones que confirmen y amplíen los datos obtenidos con vistas a aportar información sobre los efectos del fluoruro a nivel intestinal, cuyo estudio hasta el momento no se ha abordado en profundidad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones para cada uno de los objetivos parciales planteados.

1. Determinación de fluoruro en alimentos

- La metodología desarrollada basada en una digestión ácida asistida por microondas y detección mediante electrodo selectivo de fluoruro supone una ventaja frente a la digestión por fusión alcalina, uno de los métodos más utilizados para el análisis de fluoruro en alimentos. Es una técnica más rápida y con una menor manipulación de las muestras.
- Los contenidos de fluoruro en alimentos procedentes de una zona no contaminada indican que los productos pesqueros y el arroz presentan las concentraciones más elevadas de este elemento (0.304-13.3 mg/kg peso fresco).
- En zonas de Argentina con fluorosis endémica, las comidas preparadas a base de pastas, cereales o legumbres, aportan cantidades de fluoruro en muchos casos similares a las encontradas en los productos pesqueros y muy superiores a las halladas para este tipo de producto en zonas no contaminadas.
- La cocción con agua contaminada con fluoruro aumenta ostensiblemente los contenidos existentes en los productos crudos (22 veces más en pasta y arroz; 48 veces más en alubias), siendo ésta la principal causa de los elevados contenidos de fluoruro encontrados en alimentos cocinados procedentes de Argentina.
- La ingesta de fluoruro para la población adulta española debida al consumo de productos de la pesca y arroz se estima en 0.12 mg/día. Arroz, gamba, sardina y boquerón son los productos que contribuyen en mayor medida a esta ingesta.

- La población infantil argentina residente en áreas con alto contenido de fluoruro en el agua de consumo, puede ingerir hasta 1.3 mg/día de fluoruro a través de los alimentos sólidos. Esta ingesta se incrementaría de forma notable al considerar el aporte de agua y otras bebidas, por lo que la población podría estar expuesta a concentraciones de fluoruro asociados con la aparición de fluorosis.

2. Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de fluoruro desde los alimentos

- La bioaccesibilidad en los alimentos analizados es elevada (mediana 74-76%), indicando que una parte importante del fluoruro presente en el alimento se solubiliza y puede ser absorbido por el epitelio intestinal.

- La bioaccesibilidad está muy influenciada por aquellas condiciones en las que se favorece la formación de complejos insolubles de los fluoruros con otros elementos presentes en la matriz. Los factores que más disminuyen la bioaccesibilidad son el aumento del pH en la etapa gástrica, la presencia de cationes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3}), especialmente en la etapa intestinal y una baja concentración de sales biliares en la etapa intestinal.

- Los cambios que la solubilización de fluoruro experimenta ante la variación de los parámetros anteriormente citados, indica que el empleo de métodos estáticos, donde estos parámetros permanecen fijos, puede no ser la aproximación más adecuada para evaluar la bioaccesibilidad del fluoruro desde los alimentos.

3. Estudios *in vitro* sobre la absorción intestinal de fluoruro

- La absorción de fluoruro se produce principalmente por difusión pasiva a través de las uniones intercelulares, siendo minoritaria la vía transcelular. El pH ácido favorece el transporte debido posiblemente a su estado no ionizado a este pH y a la participación de un co-transportador F^-/H^+ o de un intercambiador F^-/OH^- . Asimismo, los resultados sugieren la participación transcelular de algunos mecanismos implicados en el transporte de Cl^- . Todas estas características apuntan al DRA como un posible transportador de fluoruro a través del epitelio intestinal.
- La eliminación del fluoruro al lumen intestinal presenta una importante participación de la ruta paracelular. Existen también mecanismos transcelulares de transporte, algunos de los cuales podrían ser activos (posiblemente transportadores como el MDR1 o MRP2).
- La elevada participación de la ruta paracelular en el transporte de fluoruro indica que el empleo de células Caco-2 para los estudios de biodisponibilidad puede no ser la aproximación más idónea.
- La evaluación de la permeabilidad del fluoruro varía significativamente según el modelo celular empleado, y a su vez está condicionada por factores propios del tracto (pH intraluminal, presencia de sales biliares) o factores externos (componentes dietéticos).
- La aproximación más cercana a la situación existente en el intestino delgado proximal (co-cultivo células absortivas/células caliciformes, pH 5.5 y presencia de sales biliares) permite clasificar al fluoruro como un elemento de elevada absorción, coincidiendo con los datos

existentes *in vivo*. Posiblemente esta aproximación sea más adecuada para los estudios de biodisponibilidad *in vitro* del fluoruro que el empleo de Caco-2 a pHs neutros.

4. Estudios *in vitro* de los efectos tóxicos de la exposición a fluoruro sobre el epitelio intestinal empleando células Caco-2 como modelo

- La exposición de fluoruro repetida en el tiempo durante 18 días afecta negativamente el proceso de diferenciación celular de Caco-2, especialmente a concentraciones superiores o iguales a 20 µg/mL.
- La permeabilidad paracelular se reduce en células expuestas a fluoruro durante 18 días. Esta reducción va acompañada de un aumento en la expresión génica de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares, estructuras responsables de la permeabilidad de la monocapa epitelial.
- La exposición a concentraciones de fluoruro iguales o superiores a 20 µg/mL conlleva una respuesta proinflamatoria mantenida en el tiempo, con un aumento de la expresión de TNF α , IL-6 e IL-8 y una disminución de las citoquinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-13).
- Los cambios observados en las monocapas formadas por las células Caco-2 pueden ser indicativo de que la exposición a fluoruro afecta a la estructura y funcionalidad de la mucosa epitelial del intestino.

BIBLIOGRAFÍA

- Adson, A., Raub, T. J., Burton, P. S., Barsuhn, C. L., Hilgers, A. R., Audus, K. L., & Ho, N. F. (1994). Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci*, 83(11), 1529-1536.
- Agalakova, N.I., & Gusev, G.P. (2012). Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. ISRN Cell Biol. volumen 2012. article ID 403835. doi: 10.5402/2012/403835.
- Alarcón-Herrera, M. T., Martín-Domínguez, I. R., Trejo-Vázquez, R., & Rodríguez-Dozal, S. (2001). Well water fluoride, dental fluorosis, and bone fractures in the Guadiana Valley of Mexico. *Fluoride*, 34(2), 139-149.
- Amasheh, M., Andres, S., Amasheh, S., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2009). Barrier effects of nutritional factors. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 267-273.
- Alper, S. L., Chernova, M. N., & Stewart, A. K. (2001). Regulation of Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers by pH. *JOP*, 2(4 Suppl), 171-175.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., & Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(6), G1054-1064.
- APVMA (2007). Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Sulfuryl fluoride residues evaluation report.
- Arnold, P., Wermeille, M., Chapuy, M. C., Biollaz, J., Grandjean, E. M., Schelling, J. L., & Meunier, P. J. (1989). Influence of food and antacid administration on fluoride bioavailability from enteric-coated sodium fluoride tablets. *Bone*, 10(6), 401-407.
- Artursson, P., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 175(3), 880-885.
- Artursson, P., Ungell, A. L., & Lofroth, J. E. (1993). Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res*, 10(8), 1123-1129.
- Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 27-43.
- ATSDR (2003). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

- Avendaño, C., Franchi, A., Jones, E., & Oehninger, S. (2009). Pregnancy-specific (beta) -1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod*, 24(2), 270-277.
- Avila Carreras, Natalia M., Farias, Silvia S., Bianco, Gladys, Bovi Mitre, María G. (2008). Determinación de fluoruro en aguas de Rinconadillas (provincia de Jujuy). *Acta Toxicol Argent*. 16(1), 14-20.
- Ayoob, S., & Gupta, A. K. (2006). Fluoride in drinking water: A review on the status and stress effects. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 36(6), 433-487.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., & Del Razo, L. M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*, 188(2), 319-333.
- Baruch, E., Lichtenberg, D., Barak, P., & Nir, S. (1991). Calcium binding to bile salts. *Chem Phys Lipids*, 57(1), 17-27.
- Basha, M. P., & Sujitha, N. S. (2011). Chronic fluoride toxicity and myocardial damage: antioxidant offered protection in second generation rats. *Toxicol Int*, 18(2), 99-104.
- Bharti, V. K., & Srivastava, R. S. (2009). Fluoride-induced oxidative stress in rat's brain and its amelioration by buffalo (*Bubalus bubalis*) pineal proteins and melatonin. *Biol Trace Elem Res*, 130(2), 131-140.
- BEDCA (2012). Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <http://www.bedca.net> (acceso en noviembre 2012).
- Berger, V., Larondelle, Y., Trouet, A., & Schneider, Y. J. (2000). Transport mechanisms of the large neutral amino acid L-phenylalanine in the human intestinal epithelial caco-2 cell line. *J Nutr*, 130(11), 2780-2788.
- BIS (1991). Bureau of Indian Standard. Indian standard specification for drinking water. Páginas 2-4. Delhi: BIS, IS 10500.
- Bratovčić, A., Odošević, A., & Čatić, S. (2009). The advantages of the use of ion-selective potentiometry in relation to UV/VIS spectroscopy (Conference Paper). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74(3), 139-142.
- Brown, J. W., & McKnight, C. J. (2010). Molecular model of the microvillar cytoskeleton and organization of the brush border. *PLoS ONE*, 5(2), e9406.
- Bruce, S., Noller, B., Matanitobua, V., & Ng, J. (2007). In vitro physiologically based extraction test (PBET) and bioaccessibility of arsenic and lead from various mine waste materials. *J Toxicol Environ Health A*, 70(19), 1700-1711.

- Buldini, P. L., Cavalli, S., & Trifiro, A. (1997). State-of-the-art ion chromatographic determination of inorganic ions in food. *J Chromatogr A*, 789(1-2), 529-548.
- Burt, B. A. (1992). The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res*, 71(5), 1228-1237.
- Buzalaf, M. A., de Almeida, B. S., Cardoso, V. E., Olympio, K. P., & Furlani T de, A. (2004). Total and acid-soluble fluoride content of infant cereals, beverages and biscuits from Brazil. *Food Addit Contam*, 21(3), 210-215.
- CAA (2012). Código Alimentario Argentino. Capítulo XII, Bebidas analcohólicas, bebidas hídricas, agua y agua gasificada.
- Calatayud, M., Devesa, V., Virseda, J. R., Barbera, R., Montoro, R., & Velez, D. (2012a). Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*, 50(8), 2696-2702.
- Calatayud, M., Vázquez, M., Devesa, V., & Vélez D.(2012b). In Vitro Study of Intestinal Transport of Inorganic and Methylated Arsenic Species by Caco-2/HT29-MTXCocultures. *Chem Res Toxicol*. En prensa (dx.doi.org/10.1021/tx300295n).
- Cámara, F., Amaro, M. A., Barberá, R., & Clemente, G. (2005). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem*, 92(3), 481-489.
- Camargo, J.A. (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, 50, 251-264.
- Campbell A.D. (1987). Determination of fluoride in various matrices. *Pure Appl. Chem*, 59(5), 695-702.
- Casarin, R. C., Fernandes, D. R., Lima-Arsati, Y. B., & Cury, J. A. (2007). Fluoride concentrations in typical Brazilian foods and in infant foods. *Rev Saude Publica*, 41(4), 549-556
- Cerklewski, F. L. (1987). Influence of dietary magnesium on fluoride bioavailability in the rat. *J Nutr*, 117(3), 496-500.
- Cerklewski, F. L. (1997). Fluoride bioavailability - Nutritional and clinical aspects. *Nutr Res*, 17(5), 907-929.
- Charman, W. N., Porter, C. J., Mithani, S., & Dressman, J. B. (1997). Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *J Pharm Sci*, 86(3), 269-282.

- Chen, Y. X., Lin, M. Q., Xiao, Y. D., Gan, W. M., Min, D., & Chen, C. (1997). Nutrition survey in dental fluorosis-afflicted areas. *Fluoride*, 30(2), 77-80.
- Citi, S. (1992). Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 117(1), 169-178.
- Codex (1981). Norma Codex para las aguas minerales naturales. Codex STAN 108-1981.
- Codex (2008). Joint FAO/WHO food standards programme Codex Alimentarius commission 31st Session, Geneva, Switzerland, 30 June - 4 July 2008.
- Conceição, A. C., dos Santos, M. M., & Goncalves, M. L. (2008). Adaptation of a commercial ion selective fluoride electrode to a tubular configuration for analysis by flow methodologies. *Talanta*, 76(1), 107-110.
- Cornelius, F., Mahmmoud, Y. A., & Toyoshima, C. (2011). Metal fluoride complexes of Na,K-ATPase: characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotoxic steroids. *J Biol Chem*, 286(34), 29882-29892.
- Correa Rodrigues, M.H., de Magalhães Bastos, J.R., & Rabelo Buzalaf, M.A. (2004). Fingernails and toenails as biomarkers of subchronic exposure to fluoride from dentifrice in 2- to 3-year-old children. *Caries Res*, 38(2), 109-114.
- Cronin, S. J., Manoharan, V., Hedley, M. J., & Loganathan, P. (2000). Fluoride: A review of its fate, bioavailability, and risks of fluorosis in grazed-pasture systems in New Zealand. *N Z J Agric Res*, 43(3), 295-321.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 7(5), 349-359.
- Crutzen, P. J. (2006). Introduction to "Fluorine and the Environment". In T. Alain (Ed.), *Adv Fluorine Sci*, vol. Volume 1 (pp. xv-xvii): Elsevier.
- Cui, W., Li, L. X., Sun, C. M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y. L., & Liu, P. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res*, 43(4), 330-337.
- Czamowski, W., & Krechniak, J. (1990). Fluoride in the urine, hair, and nails of phosphate fertiliser workers. *Br J Ind Med*, 47, 349-351.
- D'Alessandro, W. (2006). Human fluorosis related to volcanic activity: A review. *WIT Trans Biomed Health*, 10, 21-30.

- Dalmark, M. (1976). Effects of halides and bicarbonate on chloride transport in human red blood cells. *J Gen Physiol*, 67(2), 223-234.
- Da Motta, M.V., Souza, D.N., & Nicolau, J. (1999). Effects of subtoxic doses of fluoride on some enzymes of the glucose metabolism in submandibular salivary glands of fed and overnight-fasted rats. *Fluoride*, 23, 20-26.
- Darmoul, D., Baricault, L., Sapin, C., Chantret, I., Trugnan, G., & Rousset, M. (1991). Decrease of mRNA levels and biosynthesis of sucrase-isomaltase but not dipeptidylpeptidase IV in forskolin or monensin-treated Caco-2 cells. *Experientia*, 47(11-12), 1211-1215.
- Dasarathy, S., Das, T. K., Gupta, I. P., Susheela, A. K., & Tandon, R. K. (1996). Gastrointestinal manifestations in patients with skeletal fluorosis. *J Gastroenterol*, 31(3), 333-337.
- Daugherty, A. L., & Mrsny, R. J. (1999). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm Sci Technolo Today*, 2(7), 281-287.
- De Almeida, B. S., Da Silva Cardoso, V. E., & Buzalaf, M. A. R. (2007). Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1- to 3-year-old Brazilian children. *Community Dent Oral Epidemiol*, 35(1), 53-63.
- Dean, J.R., & Ma, R. (2007). Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere*, 68(8), 1399-1407.
- Decreto 49/1988. (1988). Del 1 de Marzo, sobre fluoración de aguas potables de consumo público. Boletín oficial del país vasco (BOPV nº 53). 16 de Marzo de 1988.
- Decreto 30/1989 (1989). Del 11 de abril, sobre fluoración de aguas potables de consumo público. Diario Oficial de Extremadura nº 30. 2 de mayo de 1989.
- Decreto 86/1990 (1990) Del 31 de octubre, por el que se establece la obligación de fluorar las aguas potables de consumo público de la Región de Murcia. BORM nº 262. 14 de noviembre de 1990.
- Decreto 57/1991 (1991). Del 7 de mayo, de fluoración de aguas de consumo público. Diario Oficial de Castilla-La Mancha, nº 39. 17 de mayo de 1991.
- Decreto 70/2009 (2009). Del 31 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de Vigilancia Sanitaria y Calidad del Agua de Consumo Humano de Andalucía. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía, nº 73. 17 de abril de 2009.

- Decreto 134/2012 (2012). Del 31 de mayo, por el que se deroga el Decreto 350/1990, de 22 de junio, sobre fluoración de las aguas potables de consumo público. Diario Oficial de Galicia de 19 de junio de 2012.
- Diouf, M., Cisse, D., Lo, C. M. M., Ly, M., Faye, D., & Ndiaye, O. (2012). Pregnant women living in areas of endemic fluorosis in Senegal and low birthweight newborns: Case-control study. *Rev Epidemiol Sante Publique* 60(2), 103-108.
- Dobaradaran, S., Abadi, D.R.V., Mahvi, A.H., & Javid, A. (2011). Fluoride in skin and muscle of two commercial species of fish harvested off the bushehr shores of the persian gulf. *Fluoride* 44(3), 143-146.
- Dousset, J. C., Rioufol, C., Feliste, R., Lévy, P., & Bourbon, P. (1984). Effects of inhaled HF on lipid metabolism in Guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol*, 4(4), 618-623.
- Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., & Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res*, 7(7), 756-761.
- Du, L., Wan, C., Cao, X., & Liu, J. (2008). The effect of fluorine on the developing human brain. *Fluoride* 41(4), 327-33.
- EFSA (2005). European food safety authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Fluoride. *The EFSA Journal* 192, 1-65.
- EFSA (2008). European food safety authority. Sodium monofluorophosphate as a source of fluoride added for nutritional purposes to food supplements. *The EFSA Journal*, 886, 1-18.
- EFSA (2010). European food safety authority. Statement of EFSA on the possible risks for public and animal health from the contamination of the feed and food chain due to possible ash-fall following the eruption of the Eyjafjallajökull volcano in Iceland – urgent advice. *The EFSA Journal* 8(4):1593.
- Ekstrand, J., Spak, C. J., & Ehrnebo, M. (1982). Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 50(5), 321-325.
- Ekstrand, J., Fomon, S. J., Ziegler, E. E., & Nelson, S. E. (1994). Fluoride pharmacokinetics in infancy. *Pediatr Res*, 35(2), 157-163.

- Emekli-Alturfan, E., Yarat, A., & Akyuz, S. (2009). Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. *Food Chem Toxicol*, 47(7), 1495-1498.
- ENIDE (2011). Encuesta Nacional de Ingesta Dietética. Fuente. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). http://www.aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/dato_s_consumo/ENIDE.pdf. (Acceso: noviembre 2012).
- Erdemoğlu, S. B., Türkdemir, H., & Güçer, S. (2000). Determination of total and fluoride bound aluminium in tea infusions by ion selective electrode and flame atomic absorption spectrometry. *Anal Lett*, 33(8), 1513-1529.
- El-Sikaily, A., & El-Said, G.F. (2010). Fluoride, some selected elements, lipids, and protein in the muscle and liver tissues of five fish species along the Egyptian Mediterranean Sea coast. *Hum Ecol Risk Assess*, 16(6), 1278-1294.
- FAO (2005). Pesticide residues in food. Report of the Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group on pesticide residues. Geneva, Switzerland, 20-29 September 2005.
- Fawell, J., Bailey, K., Chilton, J., Dahi, E., Fewtrell, L., & Magara Y. (2006). Fluoride in drinking water. World Health Organization. ISBN: 1900222965.
- FDA (2012). U.S. Food and Drug Administration. Title 21: Food and drugs. Chapter I: Food and drug administration department of health and human services. Subchapter B: Food for human consumption. Part 165: Beverages. Subpart B: Requirements for specific standardized beverages. Sec. 165.110 Bottled water.
- Fogh J. Trempe G: (1975). New human cell line. In human tumour cells in vitro. Editor Fogh J. Plenum Press, New York, 115-119.
- Fredriksson, R., Nordstrom, K. J., Stephansson, O., Hagglund, M. G., & Schioth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett*, 582(27), 3811-3816.
- Fung, K. F., Zhang, Z. Q., Wong, J. W. C., & Wong, M. H. (1999). Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion. *Environ Pollut*, 104(2), 197-205.
- Garcia, C., Lapa, R. A. S., Lima, J. L. F. C., & Perez-Olmos, R. (1992). Determination of fluoride in Spanish vinegars. *Food Chem*, 45(5), 365-367.

- Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland, Hoang, J.M., Cottu, P., & Hamelin, R. (2001). Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*, 20(36), 5025-5032.
- Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., & Caris-Veyrat, C. (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chem*, 124(4), 1603-1611.
- Gómez Ordoñez, E., Alonso, E., & Ruperez, P. (2010). A simple ion chromatography method for inorganic anion analysis in edible seaweeds. *Talanta*, 82(4), 1313-1317.
- Gómez Santos G. (2000). II Estudio Epidemiológico de la Salud Bucodental Infantil en Canarias. 1998. Santa Cruz de Tenerife: Dirección General de Salud Pública, Servicio Canario de Salud, Consejería de Sanidad y Consumo.
- Gonzalez, M. H., Souza, G. B., Oliveira, R. V., Forato, L. A., Nobrega, J. A., & Nogueira, A. R. (2009). Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products. *Talanta*, 79(2), 396-401.
- Gotoh, Y., Suzuki, H., Kinoshita, S., Hirohashi, T., Kato, Y., & Sugiyama, Y. (2000). Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(1), 433-439.
- Grandjean, P., & Thomsen, G. (1983). Reversibility of skeletal fluorosis. *Br J Ind Med*, 40(4), 456-461.
- Grimaldo, M., Borja-Aburto, V. H., Ramirez, A. L., Ponce, M., Rosas, M., & Diaz-Barriga, F. (1995). Endemic fluorosis in San Luis Potosi, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environ Res*, 68(1), 25-30.
- Grobler, S. R., & Louw, A. J. (1998). A New Microwave Acid Digestion Bomb Method for the Determination of Total Fluorine. *Caries Res*, 32(5), 378-384.
- Gupta, I. P., Das, T. K., Susheela, A. K., Dasarathy, S., & Tandon, R. K. (1992). Fluoride as a possible aetiological factor in non-ulcer dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol*, 7(4), 355-359.
- Gutknecht, J., & Walter, A. (1981). Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, 644(1), 153-156.

- Hattab, F. N. (1988). Pharmacokinetics of fluoride absorbed from dried seafoods by healthy adults. *Eur J Clin Pharmacol*, 34(5), 489-493.
- He, H., Ganapathy, V., Isales, C. M., & Whitford, G. M. (1998). pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1372(2), 244-254.
- He, L., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics*, 3(2), 195-206.
- He, M., & Wang, W. X. (2011). Factors affecting the bioaccessibility of methylmercury in several marine fish species. *J Agric Food Chem*, 59(13), 7155-7162.
- Health Canada (2010). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document. Fluoride. http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/2011-fluoride-fluorure/2011-fluoride-fluorure-eng.pdf (Acceso diciembre 2012).
- Heaton, K. W. (1985). Functional diarrhoea: the acid test. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290(6478), 1298-1299.
- Hem, J. D. (1985). Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water. *US Geol Surv Water-Supply Pap*, 2254.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3), 736-749.
- Hidalgo de Cisneros, J.L., & Pastor Sanchez, M. (1984). Determination of fluoride in sherry-type wines. *Anales de Bromatologia* 35(1), 67-77.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regardh, C. G., Lipka, E., Amidon, G. L., & Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci*, 89(1), 63-75.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*, 2(9), 2111-2119.
- Husain, A., Hussain, J., & Kumar, S. (2012). Fluoride distribution in groundwater and survey of dental fluorosis in villages of Didwana tehsil of Nagaur district of central Rajasthan, India. India Water Week 2012 – Water, Energy and Food Security: Call for Solutions, 10-14 April 2012.

- IOM (1997). Institute of Medicine of National Academies. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. National Academy Press, Washington, D.C., 1-20.
- IPCS (1984). International Programme on Chemical Safety. Fluorine and fluorides. Environmental Health Criteria 36. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 133 pp. ISBN 92 4 154096 6.
- Isildak, O. (2009). Determination of inorganic anions in mushrooms by ion chromatography with potentiometric detection. *J Anal Chem*, 64(12), 1242-1246.
- Itai, K., & Tsunoda, H. (2001). Highly sensitive and rapid method for determination of fluoride ion concentrations in serum and urine using flow injection analysis with a fluoride ion-selective electrode. *Clin Chim Acta*, 308(1-2), 163-171.
- Jackson, P. E., Thomas, D. H., Donovan, B., Pohl, C. A., & Kiser, R. E. (2001). New block-grafted anion exchanger for environmental water analysis by ion chromatography. *J Chromatogr A*, 920(1-2), 51-60.
- Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., Neff, C., Lin-Wu, E., Gregor, M., Groneberg, D. A., Kere, J., & Seidler, U. (2002). Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*, 122(3), 709-724.
- Jeandel, C., Lapicque, F., Netter, P., Bannwarth, B., Monot, C., Gillet, P., Payan, E., Guillaume, M., & Cuny, G. (1992). Effect of age on the disposition of sodium fluoride. *Eur J Clin Pharmacol*, 43(3), 295-297.
- Jin, C., Yan, Z., Jianwei, L., Ruodeng, X., & Sangbu, D. (2000). Environmental fluoride content in Tibet. *Environ Res*, 83(3), 333-337.
- Jodral-Segado, A. M., Navarro-Alarcon, M., Lopez-Ga de la Serrana, H., & Lopez-Martinez, M. C. (2003). Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *Sci Total Environ*, 312(1-3), 47-58.
- Kaarteenaho, R., Merikallio, H., Lehtonen, S., Harju, T., & Soini, Y. (2010). Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir Res*, 11, 59.
- Kala, S. V., Neely, M. W., Kala, G., Prater, C. I., Atwood, D. W., Rice, J. S., & Lieberman, M. W. (2000). The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem*, 275(43), 33404-33408.

- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., & Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res*, 23(1), 165-176.
- Kaniansky, D., Masár, M., Marák, J., & Bodor, R. (1999). Capillary electrophoresis of inorganic anions. *J Chromatogr A*, 834(1-2), 133-178.
- Keerthisinghe, G.; McLaughlin, M.J.; & Randall, P.J. (1991). Improved recovery of fluoride in plant material using a low temperature sealed chamber digestion technique in conjunction with a fluoride ion specific electrode. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 22, 1831-1846.
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*, 12(5), 319-330.
- Kjellevald Malde, M., Bjorvatn, K., & Julshamn, K. (2001). Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode. *Food Chem*, 73(3), 373-379.
- Koblar, A., Tavčar, G., & Ponikvar-Svet, M. (2012). Fluoride in teas of different types and forms and the exposure of humans to fluoride with tea and diet. *Food Chem*, 130(2), 286-290.
- Kokot, Z., & Drzewiecki, D. (2000). Fluoride levels in hair of exposed and unexposed populations in Poland. *Fluoride*, 33(4), 196-204.
- Kono, K., Yoshida, Y., Watanabe, M., Orita, Y., Dote, T., & Bessho, Y. (1993). Urine, serum and hair monitoring of hydrofluoric acid workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 65(1), S95-98.
- Koslowski, M. J., Beisner, J., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2010). Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol*, 300(1), 34-40.
- Kristl, A. (2009). Membrane permeability in the gastrointestinal tract: the interplay between microclimate pH and transporters. *Chem Biodivers*, 6(11), 1923-1932.
- Laparra, J. M., Velez, D., Montoro, R., Barbera, R., & Farre, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J Agric Food Chem*, 51(20), 6080-6085.

- Lee, J. H., Jung, J. Y., Jeong, Y. J., Park, J. H., Yang, K. H., Choi, N. K., Kim, S. H., & Kim, W. J. (2008). Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology*, *243*(3), 340-347.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., & Scarino, M. L. (2001). In vitro models of the intestinal barrier: The report and recommendations of ECVAM workshop 46 1,2. *ATLA Altern Lab Anim*, *29*(6), 649-668.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*, *50*(19), 6334-6343.
- Levy, F. M., Bastos, J. R., & Buzalaf, M. A. (2004). Nails as biomarkers of fluoride in children of fluoridated communities. *J Dent Child (Chic)*, *71*(2), 121-125.
- Li, H. B., & Xu, X. R. (1999). Separation and determination of fluoride in plant samples. *Talanta*, *48*(1), 57-62.
- Liu, S., Lu, Y., Sun, Z., Wu, L., Lu, W., Wang, X., & Yans, S. (2008). Report on the intellectual ability of children living in high-fluoride water areas. *Fluoride*, *41*(2), 144-147.
- Liu, X. L., Bai, G. L., Fan, Z. X., Li, Y., Li, X. Q., Li, P. A., & Bai, A. M. (2010). Investigation and analysis on endemic fluorosis associated with drinking water in Shaanxi in 2008. *Chin J Endemiol*, *29*(2), 171-175.
- López-Ruiz, B. (2000). Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. *J Chromatogr A*, *881*(1-2), 607-627.
- Louis, D., Wilkes, A. J., & Talbot, J. M. (1996). Optimisation of total fluoride analysis by capillary gas chromatography. Part I: Silica based dental creams. *Pharm Acta Helv*, *71*(4), 273-277.
- Lu, Y., Sun, Z. R., Wu, L. N., Wang, X., Lu, W., & Liu, S. S. (2000). Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride*, *33*(2), 74-78.
- Madara, J. L., & Trier, J. S. (1982). Structure and permeability of goblet cell tight junctions in rat small intestine. *J Membr Biol*, *66*(2), 145-157.

- Maguire, A., Zohouri, F. V., Hindmarch, P. N., Hatts, J., & Moynihan, P. J. (2007). Fluoride intake and urinary excretion in 6- to 7-year-old children living in optimally, sub-optimally and non-fluoridated areas. *Community Dent Oral Epidemiol*, 35(6), 479-488.
- Mahajan, R. J., Baldwin, M. L., Harig, J. M., Ramaswamy, K., & Dudeja, P. K. (1996). Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1280(1), 12-18.
- Maher, W. A. (1983). An investigation of trace element losses during lyophilization of marine biological samples. *Sci Total Environ*, 26(2), 173-181.
- Malde, M. K., Maage, A., MacHa, E., Julshamn, K., & Bjorvatn, K. (1997). Fluoride Content in Selected Food Items from Five Areas in East Africa. *J Food Compos Anal*, 10(3), 233-245.
- Mandinic, Z., Curcic, M., Antonijevic, B., Nedeljkovic, M., & Carevic, M. (2007). Fluoride levels in hair samples-biomarker of exposure. *Toxicol Lett*, S119.
- Mandinic, Z., Curcic, M., Antonijevic, B., Carevic, M., Mandic, J., Djukic-Cosic, D., & Lekic, C. P. (2010). Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Sci Total Environ*, 408(17), 3507-3512.
- Marques, M. (2004). Dissolution media simulating fasted and fed states. *Dissolution Technologies*. Mayo 2004.
- Martin, G. R., & Wallace, J. L. (2006). Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(2), 130-137.
- Martínez, D. E., Londoño, O. M. Q., Massone, H. E., Buitrago, P. P., & Lima, L. (2012). Hydrogeochemistry of fluoride in the Quequen river basin: Natural pollutants distribution in the argentine pampa. *Environmental Earth Sciences*, 65(2), 411-420.
- Martín Delgado, M.M., Hardisson de la Torre, A., Alvarez Marante, R. (1992). Concentration of fluoride in beers and soft drinks consumed in the Autonomous Community of the Canary Islands, Spain. *J Food Comp Anal* 5, 172-180.
- Martín Delgado M. M., Hardisson de la Torre, A., & Alvarez Marante, R. (1993). Direct potentiometric determination of fluoride in beverages. Comparative study of different buffering solutions. *Food Chem*, 46(1), 85-88.

- Martínez-Mier, E. A., Soto-Rojas, A. E., Ureña-Cirett, J. L., Stookey, G. K., & Dunipace, A. J. (2003). Fluoride intake from foods, beverages and dentifrice by children in Mexico. *Community Dent Oral Epidemiol*, 31(3), 221-230.
- Martínez-Mier, E. A., Kelly, S. A., Eckert, G. J., & Jackson, R. D. (2009). Comparison of a dietary survey and the duplicate plate method for determining dietary fluoride ingested by young children: a pilot study. *Int J Paediatr Dent*, 19(2), 99-107.
- Martínez, O. B., Díaz, C., Borges, T. M., Díaz, E., & Pérez, J. P. (1998). Concentrations of fluoride in wines from the Canary Islands. *Food Addit Contam*, 15(8), 893-897.
- Masten, S. (2001). Toxicological summary for sodium hexafluorosilicate [16893-85-9] and fluorosilicic acid [16961-83-4]: USA National Toxicology Program.
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., & Fardel, O. (2007). Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam Clin Pharmacol*, 21(6), 659-663.
- Meaney, C., & O'Driscoll, C. (1999). Mucus as a barrier to the permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in the absence and presence of sodium taurocholate micellar systems using cell culture models. *Eur J Pharm Sci*, 8(3), 167-175.
- Melvin, J. E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P. J., & Shull, G. E. (1999). Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J Biol Chem*, 274(32), 22855-22861.
- Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Marquez, B., Barbier, O., Del Razo, L. M., & Mendoza-Garrido, M. E. (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett*, 190(2), 179-186.
- Ménez, C., Buyse, M., Dugave, C., Farinotti, R., & Barratt, G. (2007). Intestinal absorption of miltefosine: contribution of passive paracellular transport. *Pharm Res*, 24(3), 546-554.
- Messer, H. H., Armstrong, W. D., & Singer, L. (1973). Influence of fluoride intake on reproduction in mice. *J Nutr*, 103(9), 1319-1326.
- Messer, H. H., & Ophaug, R. H. (1993). Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. *J Dent Research*, 72(3), 619-622.

- Miziara, A. P., Philippi, S. T., Levy, F. M., & Buzalaf, M. A. (2009). Fluoride ingestion from food items and dentifrice in 2-6-year-old Brazilian children living in a fluoridated area using a semiquantitative food frequency questionnaire. *Community Dent Oral Epidemiol*, 37(4), 305-315.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., De Smet, I., & Verstraete, W. (1994). Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microb Ecol Health Dis*, 7(4), 191-200.
- Montes Bayón, M., Rodríguez García, A., García Alonso, J.I., & Sanz-Medel, A. (1999). Indirect determination of trace amounts of fluoride in natural waters by ion chromatography: A comparison of on-line post-column fluorimetry and ICP-MS detectors. *Analyst* 124(1), 27-31
- Montrose, M. H., & Kere, J. (2000). Capítulo 8. Anion absorption in the intestine: Anion transporters, short-chain fatty acids, and role of the DRA gene product. Editores M. D. Kim y E. Barrett. *Current Topics in Membranes*, vol. Volume 50, 301-328. Academic Press.
- Moreda Piñeiro, J., Moreda Piñeiro, A., Romarís Hortas, V., Moscoso Pérez, C., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Bermejo Barrera, P., & Prada Rodríguez, D. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC – Trends Analyt Chem*, 30(2), 324-345.
- Moreda Piñeiro, J., Moreda Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez González, R., Alonso Rodríguez, E., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D., & Bermejo Barrera, P. (2012). Trace metals in marine foodstuff: Bioavailability estimation and effect of major food constituents. *Food Chem*, 134(1), 339-345.
- Moretó, M., & Jaso-Margarit, M. J. (1993). Fluoride content in formulated milk. *An Esp Pediatr*, 38(1), 95.
- Moseley, R. H., Høglund, P., Wu, G. D., Silberg, D. G., Haila, S., de la Chapelle, A., Holmberg, C., & Kere, J. (1999). Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), G185-192.
- Moturi, W. K., Tole, M. P., & Davies, T. C. (2002). The contribution of drinking water towards dental fluorosis: A case study of Njoro division, Nakuru district, Kenya. *Environ Geochem Health*, 24(2), 123-130.
- Murphy, A. J., & Hoover, J. C. (1992). Inhibition of the Na,K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase. *J Biol Chem*, 267(24), 16995-17000.

- Murray, F. (1986). Fluoride Transport in Terrestrial Ecosystems Around Industrial Areas. In T. Humio & Y. Ming-Ho (Eds.), *Studies in Environmental Science*, vol. Volume 27 (pp. 91-97): Elsevier.
- Nagendra Rao, C.R. (2003). Fluoride and environment- a review. *Proceedings of the third international conference on environment and health, University of Madras and Faculty of environmental studies, York University*, 386 -399.
- Nedeljković, M., Antonijević, B., & Matović, V. (1991). Simplified sample preparation for fluoride determination in biological material. *Analyst*, 116(5), 477-478.
- Neuhoff, S., Ungell, A. L., Zamora, I., & Artursson, P. (2005). pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*, 25(2-3), 211-220.
- Ng, J. C, Juhasz, A. L., Smith, E. & Naidu, R. (2009). Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 2: Guidance for industry. CRC for contamination Assessment and Remediation of the Environment. *Technical Reports* n° 14.
- Nopakun, J., Messer, H. H., & Voller, V. (1989). Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. *J Nutr*, 119(10), 1411-1417.
- Nopakun, J., & Messer, H. H. (1990). Mechanism of fluoride absorption from the rat small intestine. *Nutr Res*, 10(7), 771-779.
- Northfield, T. C., & McColl, I. (1973). Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*, 14(7), 513-518.
- NRC (2003). National Research Council. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications. National Academies Press: Washington, DC. <http://www.nap.edu/openbook/0309086256/html> (Acceso diciembre 2012).
- NRC (2006). National Research Council Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards. National Academies Press, Washington D.C. p 258.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17), 5421-5426.
- O'Dell, B. L., Moroni, R. I., & Regan, W. O. (1973). Interaction of dietary fluoride and magnesium in guinea pigs. *J Nutr*, 103(6), 841-850.
- Oganessian, E., Ivancakova, R., Lencova, E., & Broukal, Z. (2011). Alimentary fluoride intake in preschool children. *BMC Public Health*, 11, 768-773.

- Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R. T., Ikeda, U., & Shimada, K. (2002). Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens*, 20(4), 685-691.
- OMS (1994). Organización Mundial de la Salud. Fluoride and oral health. Technical Report Series No. 846. Geneva.
- OMS (2006). Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable, tercera edición. Volumen 1: Recomendaciones. Organización Mundial de la Salud 2006. ISBN 92 4 92 41546964. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/index.html (Acceso diciembre 2012).
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C. J., Sips, A. J., & Van Wijnen, J. H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ Sci Technol*, 36(15), 3326-3334.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J., Van de Kamp, E., Pereboom, D. P., De Zwart, L. L., & Sips, A. J. (2004). Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an in vitro digestion model. *Arch Environ Contam Toxicol*, 46(2), 183-188.
- Opydo-Szymaczek, J., & Opydo, J. (2011a). Fluoride content of selected infant foods containing poultry or fish marketed in Poland. *Fluoride*, 44(4), 232-237.
- Opydo-Szymaczek, J., & Opydo, J. (2011b). Dietary fluoride intake from infant and toddler formulas in Poland. *Food Chem Toxicol*, 49(8), 1759-1763.
- Orban, E., Szabo, E., Lotz, G., Kupcsulik, P., Paska, C., Schaff, Z., & Kiss, A. (2008). Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol Oncol Res*, 14(3), 299-306.
- Ozsvath, D. L. (2009). Fluoride and environmental health: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8(1), 59-79.
- Parkins, F. M., Hollifield, J. W., McCaslin, A. J., Wu, S. M., & Faust, R. G. (1966). Active transport of fluoride by the rat intestine in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 126(3), 513-524.
- Pashley, D. H., Allison, N. B., Easman, R. P., McKinney, R. V., Horner, J. A., & Whitford, G. M. (1984). The effects of fluoride on the gastric mucosa of the rat. *J Oral Pathol*, 13(5), 535-545.

- Patten, J. R., Whitford, G. M., Stringer, G. I., & Pashley, D. H. (1978). Oral absorption of radioactive fluoride and iodide in rats. *Arch Oral Biol*, 23(3), 215-217.
- Pessan, J. P., & Buzalaf, M. R. (2011). Historical and recent biological markers of exposure to fluoride. *Monogr Oral Sci*, 22, 52-65.
- Pinkse, M. W., Merckx, M., & Averill, B. A. (1999). Fluoride inhibition of bovine spleen purple acid phosphatase: characterization of a ternary enzyme-phosphate-fluoride complex as a model for the active enzyme-substrate-hydroxide complex. *Biochemistry*, 38(31), 9926-9936.
- Piper, D. W., & Fenton, B. H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*, 6(5), 506-508.
- Ponikvar, M., Stibilj, V., & Žemva, B. (2007). Daily dietary intake of fluoride by Slovenian Military based on analysis of total fluorine in total diet samples using fluoride ion selective electrode. *Food Chem*, 103(2), 369-374.
- Powell, J.J., Ainley C. C., Evans R., & Thompson R. P.(1994). Intestinal perfusion of dietary levels of aluminium: association with the mucosa. *Gut*.35(8): 1053-1057.
- Ramage, J. K., Hunt, R. H., & Perdue, M. H. (1988). Changes in intestinal permeability and epithelial differentiation during inflammation in the rat. *Gut*, 29(1), 57-61.
- Rao, R. J. (1971). Fluoride content of sea salt and dental health. *Am J Clin Nutr*, 24(8), 895-896.
- Rao, G. S. (1984). Dietary intake and bioavailability of fluoride. *Annu Rev Nutr*, 4, 115-136.
- Rao, S. M., Sherlin, H. J., Anuja, N., Pratibha, R., Priya, P., & Chandrasekar, T. (2011). Morphometry of buccal mucosal cells in fluorosis--a new paradigm. *Hum Exp Toxicol*, 30(11), 1761-1768.
- Real Decreto 1424/1983 (1983). Del 27 de Abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la obtención, circulación y venta de la Sal y Salmueras Comestibles. Boletín oficial del estado (B.O.E. nº 130). 01 de Junio de 1983.
- Real Decreto 140/2003 (2003). Del 7 de Febrero de 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado (B.O.E. nº45). 21 de febrero de 2003.

- Real Decreto 1798/2010 (2010). Del 30 de diciembre de 2010, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. Boletín Oficial del Estado (B.O.E. nº 16). 19 de enero de 2011.
- Real Decreto 1799/2010 (2010). Del 30 de diciembre de 2010, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. Boletín Oficial del Estado (B.O.E. nº 17). 20 de enero de 2011.
- Reddy, K. P., Sailaja, G., & Krishnaiah, C. (2009). Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. *J Environ Biol*, 30(5), 859-864.
- Rieux, A. D., Ragnarsson, E. G. E., Gullberg, E., Pr at, V., Schneider, Y. J., & Artursson, P. (2005). Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci*, 25(4-5), 455-465.
- Rivero Huguet, M., Huertas, R., Francini, L., Vila, L., & Darr , E. (2006). Concentrations of As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, and Zn in Uruguayan rice determined by atomic absorption spectrometry. *At Spectros*, 27(2), 48-55.
- Rogler, G., & Andus, T. (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Surgery*, 22(4), 382-389.
- Rubas, W., Jezyk, N., & Grass, G. M. (1993). Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm Res*, 10(1), 113-118.
- Sababi, M., Nilsson, E., & Holm, L. (1995). Mucus and alkali secretion in the rat duodenum: effects of indomethacin, N omega-nitro-L-arginine, and luminal acid. *Gastroenterology*, 109(5), 1526-1534.
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), 763-770.
- Serra-Majem, L., & Aranceta, J. (2001). Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutr*, 4(6 A), 1409-1413.
- Shalina, T. I., & Vasil'eva, L. S. (2010). Femoral bone morphogenesis in human fetuses in the area of environmental fluoride pollution. *Morfologiya*, 137(1), 54-57.

- Shen, L., & Turner, J. R. (2006). Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: Tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(4), G577-G582.
- Sherer, T. R., & Suttie, J. W. (1970). Effect of fluoride on glycolytic and citric acid cycle metabolites in rat liver. *J Nutr*, 100(7), 749-756.
- Shivaprakash, P. K., Ohri, K., & Noorani, H. (2011). Relation between dental fluorosis and intelligence quotient in school children of Bagalkot district. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 29(2), 117-120.
- Shoji, T., Suzuki, H., Kusuvara, H., Watanabe, Y., Sakamoto, S., & Sugiyama, Y. (2004). ATP-dependent transport of organic anions into isolated basolateral membrane vesicles from rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(4), G749-756.
- Shqiyiq, R. M., Raza, H., & Kidwai, A. M. (1984). Alteration in gastric secretion of rats administered NaF. *Fluoride - Quarterly Reports*, 17(3), 178-182.
- Shuhua, X., Ziyou, L., Ling, Y., Fei, W., & Sun, G. (2012). A role of fluoride on free radical generation and oxidative stress in BV-2 microglia cells. *Mediators Inflamm*, 2012, 102954.
- Shulman, E. R., & Vallejo, M. (1990). Effect of gastric contents on the bioavailability of fluoride in humans. *Pediatr Dent*, 12(4), 237-240.
- Simchowit, L. (1988). Interactions of bromide, iodide, and fluoride with the pathways of chloride transport and diffusion in human neutrophils. *J Gen Physiol*, 91(6), 835-860.
- Simon-Assmann, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G., & Keding, M. (2007). In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol*, 23(4), 241-256.
- Smedley, P. L., Nicolli, H. B., Macdonald, D. M. J., Barros, A. J., & Tullio, J. O. (2002). Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwaters from La Pampa, Argentina. *Appl Geochem*, 17(3), 259-284.
- Smith, F. E., & Arsenault, E. A. (1996). Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta*, 43(8), 1207-1268.
- Spencer, H., Kramer, L., Gatz, C., Norris, C., Wiatrowski, E., & Gandhi, V. C. (1980a). Fluoride metabolism in patients with chronic renal failure. *Arch Intern Med*, 140(10), 1331-1335.
- Spencer, H., Kramer, L., Norris, C., & Wiatrowski, E. (1980b). Effect of aluminum hydroxide on fluoride metabolism. *Clin Pharmacol Ther*, 28(4), 529-535.

- Strunecká, A., Patočka, J., & Connett., P. (2004). Fluorine in medicine. *J Appl Biomed*, 2(3), 141-150.
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., & Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*, 9(8), 597-614.
- Susheela, A. K., & Das, T. K. (1988). Chronic fluoride toxicity: a scanning electron microscopic study of duodenal mucosa. *J Toxicol Clin Toxicol*, 26(7), 467-476.
- Susheela, A.K., (1993). *Prevention and control of fluorosis. Vol. I : Health aspects*. New Delhi, India: Rajiv Gandhi National Drinking Water Mission.
- Susheela, A. K., Kumar, A., Bhatnagar, M., & Bahadur, R. (1993). Prevalence of endemic fluorosis with gastrointestinal manifestations in people living in some North-Indian villages. *Fluoride - Quarterly Reports*, 26(2), 97-104.
- Takatsu, A., Chiba, K., Ozaki, M., Fuwa, K., & Haraguchi, H. (1984). Direct determination of trace fluorine in milk by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry utilizing an electrothermal graphite furnace. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 39(2-3), 365-370.
- Tavelin, S., Milovic, V., Ocklind, G., Olsson, S., & Artursson, P. (1999). A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drug transport. *J Pharmacol Exp Ther*, 290(3), 1212-1221.
- Tavelin, S. (2003). New approaches to studies of paracellular drug transport in intestinal epithelial cell monolayers. Tesis Doctoral, Departamento de Farmacia, División de Farmacia Universidad de Uppsala (Suecia).
- Tavelin, S., Taipalensuu, J., Soderberg, L., Morrison, R., Chong, S., & Artursson, P. (2003). Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharm Res*, 20(3), 397-405.
- Taves, D. R. (1983). Dietary intake of fluoride ashed (total fluoride) v. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. *Br J Nutr*, 49(3), 295-301.
- Tekle-Haimanot, R., Melaku, Z., Kloos, H., Reimann, C., Fantaye, W., Zerihun, L., & Bjorvatn, K. (2006). The geographic distribution of fluoride in surface and groundwater in Ethiopia with an emphasis on the Rift Valley. *Sci Total Environ*, 367(1), 182-190.
- Thaweboon, S., Thaweboon, B., Chunhabundit, P., & Suppukpatana, P. (2003). Effect of fluoride on human dental pulp cells in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34(4), 915-918.

- Torra, M., Rodamilans, M., & Corbella, J. (1998). Serum and urine fluoride concentration: relationships to age, sex and renal function in a non-fluoridated population. *Sci Total Environ*, 220(1), 81-85.
- Torres Escribano, S., Vélez, D., & Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(3), 327-337.
- Trautner, K., & Siebert, G. (1986). An experimental study of bio-availability of fluoride from dietary sources in man. *Arch Oral Biol*, 31(4), 223-228.
- Trautner, K., & Einwag, J. (1989). Influence of milk and food on fluoride bioavailability from NaF and Na₂FPO₃ in man. *J Dent Res*, 68(1), 72-77.
- Tsuchida, M., Horiuchi, T., & Mineshita, S. (1992). Metabolic effects of fluoride with and without calcium deprivation. *Trace Elem Med*, 9(4), 176-182.
- Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 285-293.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr*, 141(5), 769-776.
- UNICEF (1999). United Nations Children's Fund. Fluoride in water: An overview. WATERfront. A UNICEF publication on water, environment, sanitation and hygiene. Issue 13, December 1999, pag 11–13.
- Uray, I. P., Connelly, J. H., Thomazy, V., Shipley, G. L., Vaughn, W. K., Frazier, O. H., Taegtmeier, H., & Davies, P. J. (2002). Left ventricular unloading alters receptor tyrosine kinase expression in the failing human heart. *J Heart Lung Transplant*, 21(7), 771-782.
- USDA (2004). National Fluoride Database of Selected Beverages and Foods. U.S. Department of Agriculture and Agriculture Research Service. Beltsville Human Nutrition Research Center.
- U.S. EPA. (2007a). United States Environmental Protection Agency. Guidance for evaluating the oral bioavailability of metals in soils for use in human health risk assessment. OSWER 9285.7–80.
- U.S. EPA. (2007b). United States Environmental Protection Agency. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. OSWER 9285, 7–77.
- U.S. EPA. (2007c). United States Environmental Protection Agency. Standard operating procedure for an in vitro bioaccessibility assay for lead in soil. OSWER 9200.1-86.

- U.S. EPA (2009) United States Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations. EPA 816-F-09-004. Mayo 2009. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl.pdf> (Acceso diciembre 2012).
- U.S. EPA (2010). United States Environmental Protection Agency. Fluoride. Exposure and relative source contribution analysis. Health and ecological criteria division office of water. December 2010.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Kandarska, J., Adamczyk, M., Malesa-Cieciewicz, M., & Ruczynska, W. (2008). Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. *Food Chem*, *111*(3), 556-563.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Komar, K., Adamczyk, M., Malesa-Cieciewicz, M., & Ruczynska, W. (2009). Fish products available in Polish market--assessment of the nutritive value and human exposure to dioxins and other contaminants. *Chemosphere*, *74*(11), 1420-1428.
- Vachon, P. H., & Beaulieu, J. F. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*, *103*(2), 414-423.
- Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., & Schneider, Y. J. (2010). Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol In Vitro*, *24*(5), 1441-1449.
- Vani, M. L., & Reddy, K. P. (2000). Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, *33*(1), 17-26.
- Varona, A., Blanco, L., Perez, I., Gil, J., Irazusta, J., López, J. I., Cadenas, M. L., Pinto, F. M., & Larrinaga, G. (2010). Expression and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer*, *10*.
- Velasco-Reynold, C., Navarro-Alarcon, M., De La Serrana, H. L. G., Perez-Valero, V., Ahmad, A., & Lopez-Martinez, M. C. (2010). Dialysability of magnesium and calcium from hospital duplicate meals: Influence exerted by other elements. *Biol Trace Elem Res*, *133*(3), 313-324.
- Venema, K., van Nuenen, H.M.C., Smeets-Peeters, M., Minekus, M., & Havenaar, R. (2000). TNO's in vitro large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Nutrition*, *24*, 558-564.

- Villa, A., Rosenkranz, C., & Garrido, A. (1993). Fluoride absorption from disodium and calcium monofluorophosphates from the gastrointestinal tract of rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 81(1), 53-67.
- Villa, A., Anabalón, M., & Cabezas, L. (2000). The fractional urinary fluoride excretion in young children under stable fluoride intake conditions. *Community Dent Oral Epidemiol*, 28(5), 344-355.
- Villa, A., Anabalón, M., Cabezas, L., & Rugg-Gunn, A. (2008). Fractional urinary fluoride excretion of young female adults during the diurnal and nocturnal periods. *Caries Res*, 42(4), 275-281.
- Villa, A., Anabalón, M., Zohouri, V., Maguire, A., Franco, A. M., & Rugg-Gunn, A. (2010). Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res*, 44(1), 60-68.
- Viswanathan, G., Gopalakrishnan, S., & Siva Ilango, S. (2010). Assessment of water contribution on total fluoride intake of various age groups of people in fluoride endemic and non-endemic areas of Dindigul District, Tamil Nadu, South India. *Water Res*, 44(20), 6186-6200.
- Wambu, E.W., & Muthakia, G.K. (2011). High fluoride water in the Gilgil area of Nakuru County, Kenya. *Fluoride* 44(1), 37-41.
- Wang, S., & Evers, B. M. (1999). Caco-2 cell differentiation is associated with a decrease in stat protein levels and binding. *J Gastrointest Surg*, 3(2), 200-207.
- Wang, W., Bian, J., & Cao, C. (2001a). A study on the bioavailability of fluoride added into milk. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 36(2), 116-118.
- Wang, P., Verin, A. D., Birukova, A., Gilbert-McClain, L. I., Jacobs, K., & Garcia, J. G. (2001b). Mechanisms of sodium fluoride-induced endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(6), L1472-1483.
- Wang, A., Xia, T., Ru, R., Yuan, J., Chen, X., & Yang, K. (2004). Antagonistic effect of selenium on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis induced by fluoride in human hepatocytes. *Fluoride*, 37(2), 107-116.
- Wang, S. X., Wang, Z. H., Cheng, X. T., Li, J., Sang, Z. P., Zhang, X. D., Han, L. L., Qiao, X. Y., Wu, Z. M., & Wang, Z. Q. (2007). Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. *Environ Health Perspect*, 115(4), 643-647.

- Wang, S., Zhang, H., Fan, W., Fang, S., Kang, P., Chen, X., & Yu, M. (2008). The effects of endemic fluoride poisoning caused by coal burning on the physical development and intelligence of children. *Fluoride*, 41(4), 344-348.
- Weiler, F., Marbe, T., Scheppach, W., & Schaubert, J. (2005). Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin. *J Cell Physiol*, 204(1), 83-86.
- Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Stringer, G. I. (1976). Fluoride renal clearance: a pH-dependent event. *Am J Physiol*, 230(2), 527-532.
- Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Reynolds, K. E. (1977). Fluoride absorption from the rat urinary bladder: a pH-dependent event. *Am J Physiol*, 232(1), F10-15.
- Whitford, G. M., & Pashley, D. H. (1984). Fluoride absorption: the influence of gastric acidity. *Calcif Tissue Int*, 36(3), 302-307.
- Whitford, G. M., & Williams, J. L. (1986). Fluoride absorption: independence from plasma fluoride levels. *Proc Soc Exp Biol Med*, 181(4), 550-554.
- Whitford, G. M. (1999). Fluoride metabolism and excretion in children. *J Public Health Dent*, 59(4), 224-228.
- Whitford, G. M., Sampaio, F. C., Arneberg, P., & Von Der Fehr, F. R. (1999). Fingernail fluoride: A method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res*, 33(6), 462-467.
- Whitford, G. M. (2005). Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 115(8), 685-689.
- Wikman, A., Karlsson, J., Carlstedt, I., & Artursson, P. (1993). A drug absorption model based on the mucus layer producing human intestinal goblet cell line HT29-H. *Pharm Res*, 10(6), 843-852.
- Williamson, B. W. A., & Percy-Robb, I. W. (1980). Contribution of biliary lipids to calcium binding in bile. *Gastroenterology*, 78(4), 696-702.
- Wood, R.; Anders, W.; & Harriet, W. (1998). Quality in The Food Analysis Laboratory. The Royal Society of Chemistry. Information Services. 68-86. ISBN:978-1-84755-178-8.
<http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/9781847551788-00036/978-0-85404-566-2/unauth> (Acceso diciembre 2012).

- Wu, J., Cheng, Y., Nilsson, A., & Duan, R. D. (2004). Identification of one exon deletion of intestinal alkaline sphingomyelinase in colon cancer HT-29 cells and a differentiation-related expression of the wild-type enzyme in Caco-2 cells. *Carcinogenesis*, 25(8), 1327-1333.
- Yan, Q., Zhang, Y., Li, W., & Denbesten, P. K. (2007). Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells in vitro. *J Dent Res*, 86(4), 336-340.
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res*, 14(6), 763-766.
- Yi, J., & Cao, J. (2008). Tea and fluorosis. *J Fluor Chem*, 129(2), 76-81.
- Yiping, H., & Caiyun, W. (2010). Ion chromatography for rapid and sensitive determination of fluoride in milk after headspace single-drop microextraction with in situ generation of volatile hydrogen fluoride. *Anal Chim Acta*, 661(2), 161-166.
- Yu, Y. X., Li, J. L., Zhang, X. Y., Yu, Z. Q., Van de Wiele, T., Han, S. Y., Wu, M. H., Sheng, G. Y., & Fu, J. M. (2010). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *J Agric Food Chem*, 58(1), 301-308.
- Zhang, M., Wang, A., Xia, T., & He, P. (2008). Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*, 179(1), 1-5.