



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Disposición de fluoruro inorgánico en la exposición concurrente con
arsénico en ratones expuestos a ambos contaminantes”**

T E S I S

Que presenta

YUMARA LILIANA MARTÍNEZ YLLESCAS

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
TOXICOLOGÍA**

Directora de tesis:

Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez

Ciudad de México

Marzo, 2023

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Toxicología, bajo la dirección de la doctora María de la Luz Del Razo Jiménez. Este trabajo fue apoyado con la beca de maestría con registro 1076881, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez por permitirme desarrollar este increíble trabajo, darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio, por su guía y consejos durante el desarrollo del trabajo y también en el ámbito personal, extrañare mucho sus platicas. Gracias por todo.

A mi comité tutor conformado por la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y el Dr. Olivier Christophe Barbier por sus valiosos consejos y orientarme en cada avance de este trabajo, gracias por su tiempo y dedicación.

Al colegio de profesores del departamento de Toxicología por su guía en mi formación en la maestría, por permitir desarrollar mis conocimientos y reconocer la importancia de la toxicología en todos los ámbitos que nos rodean, muchas gracias.

A la M. en C. Luz del Carmen Sánchez Peña por todo el apoyo y guía en el desarrollo de este trabajo, especialmente en el LISTO. Gracias por siempre estar al pendiente de mí y por todos los momentos compartidos.

Al técnico de laboratorio Ángel Barrera Hernández por compartir tus conocimientos en el manejo de animales y ser guía en el desarrollo de este trabajo. Gracias por la confianza y todas las experiencias compartidas.

A mis compañeros de laboratorio Moni y Jonatan por el apoyo y enseñanzas en el laboratorio. A Joel por todo su apoyo en el laboratorio en la parte final del proyecto. Muchas gracias por las pláticas y risas.

A mis compañeros de generación por todo el apoyo durante las clases en línea, las pláticas y momentos de estrés durante esta formación como toxicólogos. No los cambio por nada.

A Cris muchas gracias por todo el apoyo en el laboratorio, por las enseñanzas y todos los buenos momentos de risa que pasamos, te quiero mucho.

Al grupo secreto: Andy, Erick y Adri, gracias por su amistad, por todos los momentos, risas y desveladas, no saben lo valiosos que se han convertido en mi vida. Espero que la vida nos siga juntando. Los amo.

A Enrique por apoyarme en esta parte importante de mi vida, por seguir creciendo juntos y ser soporte en mi vida. Te amo.

A mi familia, especialmente a mi mamá y hermana gracias por creer en mi e impulsarme a seguir con mis sueños, siempre juntas las tres mosqueteras. A mi papá por su apoyo y guía. Los amo.

RESUMEN

El fluoruro (F^-) y el arsénico (As) son los dos contaminantes inorgánicos más distribuidos en la naturaleza y su exposición es principalmente mediante el agua de bebida. Estos contaminantes pueden ocasionar efectos tóxicos en la función hepática, renal y ósea. El principal modo de acción del F^- y del As es el estrés y daño oxidante. En la exposición concurrente a ambos contaminantes se ha identificado una interacción con efectos tanto sinérgicos como antagónicos, dependiendo de la concentración, el tiempo de exposición y el efecto evaluado. Sin embargo, no se ha evaluado si la dosimetría interna de F^- se modifica en presencia de arsénico inorgánico (As_i), por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la disposición de F^- en la exposición concurrente con As_i en ratones. Sesenta ratonas de la cepa C57BL/6 fueron expuestas a F^- y As_i a través del agua de bebida, durante 30 días, las cuales se dividieron en 5 grupos: 1) control, 2) F^- 50ppm, 3) F^- - As_i 50-1ppm, 4) F^- - As_i 50-10ppm y 5) F^- - As_i 50-20ppm. Al final del periodo de exposición se colectaron muestras de orina mediante jaulas metabólicas y se obtuvieron muestras de hígado, riñón y hueso (tibia) para la evaluación de la dosimetría interna de F^- mediante un electrodo selectivo de F^- previo pretratamiento con difusión isotérmica. En las muestras de orina se cuantificó la concentración de las especies arsenicales (As_i y sus metabolitos mono y dimetilados, MAs y $DMAs$) mediante espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros acoplado a una criotrampa (EAA-GH-CT). Además, se determinó el daño oxidante en lípidos a través de la cuantificación de malondihaldehído (MDA) en riñón e hígado. La concentración de F^- en orina y riñón en presencia de As_i se modificó de forma no lineal; mientras que la concentración de F^- en hueso disminuyó dependiente a la concentración de As_i . Se corroboró que la concentración urinaria de la suma de $As_i+MAs+DMAs$ disminuyó en presencia de F^- . Además, se determinó que existe una correlación positiva en las concentraciones de MDA y las concentraciones de F^- en tejido hepático. En resumen, se identificó que la dosimetría interna de F^- se altera en la exposición concurrente con As_i y se observó daño oxidante hepático en condiciones donde el As_i favorece el aumento de F^- en tejido hepático.

ABSTRACT

Fluoride (F^-) and arsenic are the two most abundant inorganic contaminants in nature, and exposure is primarily through drinking water. These contaminants can have toxic effects on liver, kidney and bone function. The main mode of action of F^- and arsenic is oxidative stress and damage. In concurrent exposure to both contaminants, an interaction with both synergistic and antagonistic effects has been identified, depending of level and time of exposure and effect evaluated. Nevertheless, it has not been evaluated whether the internal fluoride dosimetry is modified in the presence of inorganic arsenic (As_i), therefore the main of this work is to determine the F^- disposition in the concurrent exposure with As_i in mice. Sixty C57BL/6 female mice were exposed to F^- and As_i via drinking water for 30 days, which were divided into 5 groups: 1) control, 2) F^- 50ppm, 3) F^- - As_i 50-1ppm, 4) F^- - As_i 50-10ppm and 5) F^- - As_i 50-20ppm. At the end of the exposure period, urine samples were collected using metabolic cages and samples of liver, kidney, and bone (tibia) were obtained for evaluation of F^- internal dosimetry using a F^- selective electrode after pretreatment with isothermal diffusion. The concentration of urinary arsenic species (As_i and its mono- and dimethylated metabolites, MAs and DMAs) were also quantified by atomic absorption spectrophotometry using a hydride generator coupled to an automated cryo-trap (EAA-GH-CT). In addition, oxidative damage to lipids was determined through the quantification of malondialdehyde (MDA) in kidney and liver. The concentration of F^- in urine and kidney in the presence of As_i changed in a non-linear manner, while the concentration of F^- in bone decreased dependent the concentration of As_i . It was corroborated that urinary level of sum of As_i +MAs+DMAs) decreases in the presence of F^- . In addition, it was determined that there is a positive correlation between the concentrations of MDA and the concentrations of F^- in liver tissue. In summary, it was identified that the internal dosimetry of F^- is altered on concurrent exposure with As_i and liver oxidative damage was observed under conditions where As_i favors the increase of F^- in liver tissue.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Flúor.....	1
1.1.1. Fuentes de exposición a fluoruro	1
1.1.2 Toxicocinética del fluoruro	2
1.1.2. Toxicodinamia del fluoruro.....	3
1.1.2.1 Toxicodinamia del fluoruro en hueso	4
1.2. Arsénico.....	5
1.2.1. Fuentes de exposición a arsénico.....	5
1.2.2. Toxicocinética del arsénico.....	5
1.2.3. Toxicodinamia del arsénico	7
1.3. Co-exposición fluoruro-arsénico.....	8
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
4.1. Objetivo general.....	12
5. MÉTODOS	13
5.1. Diseño experimental	13
5.1.1. Modelo animal y tratamiento.....	13
5.2. Colecta de orina y tejidos.....	15
5.3. Pretratamiento de tejidos para la cuantificación de fluoruro	15
5.3.1. Reactivos.....	15
5.3.2. Principio.....	16
5.3.3. Preparación de la homogenización de tejidos.....	16
5.3.4. Procedimiento.....	16
5.4. Determinación de fluoruro en orina y muestras de tejido pretratadas	17
5.4.1. Reactivos.....	17
5.4.2. Principio.....	17
5.4.3. Procedimiento.....	17
5.5. Determinación de As _i y sus metabolitos en orina	18
5.5.1. Reactivos.....	18
5.5.2. Principio.....	19
5.5.3. Procedimiento.....	19
5.6. Evaluación de lipoperoxidación en tejidos.....	20
5.6.1. Principio.....	20

5.6.2. Procedimiento.....	20
5.7. Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Peso corporal, consumo de agua, alimento y peso de órganos.	22
6.2 Concentraciones urinarias de creatinina.	26
6.3 Dosimetría interna de fluoruro.....	27
6.3.1 Concentración de fluoruro en hueso.	27
6.3.2 Concentración de fluoruro en riñón.	28
6.3.3 Concentración de fluoruro en hígado.	29
6.3.4 Concentración de fluoruro urinario.	30
6.3.4.1 Concentración de fluoruro urinario sin ajuste con creatinina urinaria. 30	
6.3.4.2 Concentración de fluoruro urinario con ajuste de creatinina.....	31
6.4 Dosimetría interna de arsénico	32
6.4.1 Concentración urinaria de arsénico sin ajuste de creatinina.	32
6.4.3 Concentración urinaria de arsénico ajustada por creatinina.....	34
6.4.4 Proporción relativa de especies arsenicales en orina.	37
6.5 Concentración de proteína total en hígado y riñón.	38
6.6 Evaluación de daño oxidante mediante TBARs.	39
6.6.1 Concentración de MDA en tejido renal sin ajustar por concentración de proteína.	39
6.6.2 Concentración de MDA en tejido hepático sin ajustar con la concentración de proteína.	40
6.6.3 Concentración de MDA en tejido renal ajustada por proteína renal.	41
6.6.4 Concentración de MDA en hígado ajustado por proteína hepática.	42
6.6.5 Correlación entre las concentraciones de MDA y fluoruro en hígado, riñón y orina y la concentración de MDA y arsénico total urinario.	43
7. DISCUSIÓN	45
7.1 Ratón hembra C57BL/6 como modelo experimental en la evaluación de la posible interacción biológica de fluoruro y arsénico inorgánico.....	48
7.2 Relación de las concentraciones de exposición a fluoruro y arsénico inorgánico.....	50
7.3 Evaluación general del estado de salud de los ratones.	50
7.4 Distribución de fluoruro en hueso en presencia de arsénico inorgánico... 51	
7.5 a Distribución de fluoruro en riñón e hígado en presencia de arsénico inorgánico.....	53
7.6 Concentración de fluoruro en orina en presencia de arsénico inorgánico. 55	

7.7 Concentración de arsenicales en orina en presencia de fluoruro.	56
7.8 Daño oxidante en riñón e hígado.	57
7.8 Interacción fluoruro y arsénico inorgánico.....	59
7.9 Fortalezas y limitaciones del estudio	62
8. CONCLUSIONES	63
9. PERSPECTIVAS	64
10. REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica del As_i	6
Figura 2. Estrategia experimental con ratones C57BL/6	14
Figura 3. Gráfico de calibración típico para fluoruro	18
Figura 4. Peso y ganancia de peso	22
Figura 5. Consumo de agua.....	23
Figura 6. Consumo de alimento	24
Figura 7. Peso promedio de órganos	25
Figura 8. Volumen de orina	26
Figura 9. Concentración urinaria promedio de creatinina	27
Figura 10. Concentración de fluoruro en tejido óseo	28
Figura 11. Concentración de fluoruro en tejido renal	29
Figura 12. Concentración de fluoruro en tejido hepático	30
Figura 13. Concentración de fluoruro en orina expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$	31
Figura 14. Concentración de fluoruro en orina expresada en mg/g de creatinina .	32
Figura 15. Concentración de especies arsenicales en orina	33
Figura 16. Concentración urinaria de $As_i+MAs+DMAs$ expresada en ng/mL	34
Figura 17. Concentración de especies arsenicales en orina	35
Figura 18. Concentración urinaria de $As_i+MAs+ DMAs$	36
Figura 19. Porcentaje urinario de especies $As_i+MAs+DMAs$	37
Figura 20. Concentración de proteína en hígado	38
Figura 21. Concentración de proteína en riñón.	39
Figura 22. Concentración de malondihaldeo (MDA) en riñón	40
Figura 23. Concentración de MDA en hígado	41
Figura 24. Concentración de MDA en riñón expresado en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína	42
Figura 25. Concentración de MDA en hígado presentado por $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína	43
Figura 26. Correlación entre las concentraciones de MDA y F- en hígado.	44
Figura 27. Correlación entre las concentraciones de MDA (hígado y riñón), F- (riñón y orina) y As_T (orina).....	45
Figura 28. Estrés y daño oxidante en la exposición concurrente del fluoruro y el arsénico inorgánico	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios <i>in vitro</i> de exposición concurrente de F ⁻ y As	9
Tabla 2. Principales estudios <i>in vivo</i> de co-exposición de F ⁻ y As.	10
Tabla 3. Grupos experimentales	15

ABREVIATURAS

As	Arsénico
As _i	Arsénico inorgánico
AsV	Arseniato
AsIII	Arsenito
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
CH ₃ COOH	Ácido acético
DMAs	Acido dimetil arsénico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
F ⁻	Fluoruro
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HClO ₄	Ácido perclórico
HF	Fluoruro de hidrógeno o ácido fluorhídrico
HMDS	Hexametildisilazano
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
LISTO	Laboratorio de Investigación y Servicio en Toxicología
MAs	Acido monometil arsénico
MDA	Malondihaldehído
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
SOD	Superóxido dismutasa
TBARs	Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico
TISAB	Total Ionic Strenght Adjustment Buffer
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Flúor

El flúor (F) es un elemento químico que pertenece al grupo VII de la tabla periódica, el cual se caracteriza por tener la mayor electronegatividad y la segunda mayor afinidad electrónica, por lo tanto, es altamente reactivo formando complejos con gases nobles y puede reaccionar con muchos otros elementos. Debido a su baja estabilidad, el F nunca se encuentra aislado en la naturaleza, se encuentra como un complejo o en su forma ionizada, como fluoruro (F⁻).

El F⁻ también se encuentra en ambientes ácidos en su forma protonada (HF), el cual comúnmente es liberado por algunas industrias y/o por la actividad volcánica. Esta forma protonada es la más tóxica, afectando a los sistemas biológicos que residen en áreas cercanas (Holloway, 1966; Johnston y Strobel, 2020).

1.1.1. Fuentes de exposición a fluoruro

El F⁻ es un contaminante ubicuo que se encuentra generalmente en forma inorgánica distribuido sobre la superficie de la tierra, aguas subterráneas y la atmósfera debido a procesos naturales y antropogénicos, entre los cuales se encuentran la erosión, la lixiviación hidráulica, la actividad volcánica, la quema de carbón, la minería y procesos de fabricación de fertilizantes, cerámica y vidrio (Jagtap y cols., 2012).

La principal fuente de exposición al F⁻ es mediante el consumo de agua, cuya presencia se debe a la degradación natural de los minerales a través del desgaste y la erosión de las paredes que cubren los mantos acuíferos y desprenden su contenido al agua subterránea. El contenido de F⁻ en algunos alimentos y productos dentales también contribuyen a aumentar su ingestión. En el caso de los alimentos esta concentración dependerá principalmente del contenido de F⁻ en el suelo cultivado, en el agua de riego y el uso de plaguicidas fluorados (Rizzu y cols., 2020; Guerrero-Arroyo y Del Razo, 2022).

Existen compuestos orgánicos fluorados que son preparados sintéticamente y que tienen efectos tóxicos no diferenciados de los efectos causados por compuestos fluorados inorgánicos.

1.1.2 Toxicocinética del fluoruro

1.1.2.1. Absorción

El aporte del F^- al organismo principalmente es por vía oral a través del agua o alimentos de consumo. Principalmente el F^- proveniente del agua se absorbe prácticamente en su totalidad, mientras que el proveniente de los alimentos se absorbe entre el 50 y 80%. Cuando el F^- ingresa al tracto gastrointestinal se absorbe del 20 al 25% en el estómago como HF y el resto se absorbe en el intestino delgado a través de las uniones estrechas y transportadores (Barbería y cols., 2005; Buzalaf y Whitford, 2011).

1.1.2.2. Distribución y metabolismo

El F^- se distribuye rápidamente por todo el organismo y los niveles en plasma comienzan a aumentar, donde aproximadamente el 99% del F^- retenido se une a tejidos ricos en calcio como el hueso y los dientes y el resto se distribuye en otros órganos y tejidos. Su velocidad de distribución está determinada por la tasa de flujo sanguíneo en dichos tejidos, además se concentra a niveles altos dentro de los túbulos renales, por lo que este órgano generalmente tiene una concentración más alta a la del plasma. El F^- se incorpora al hueso reemplazando el ion hidroxilo de la hidroxiapatita para formar hidroxifluoapatita. Esta asociación no es permanente en el compartimento óseo, por lo cual, con el tiempo puede mobilizarse a través del continuo proceso de remodelado y reabsorción ósea, teniendo como resultado una liberación al plasma cuando descienden las concentraciones óseas de F^- (Chouhan y Flora, 2010; Buzalaf y Whitford, 2011).

1.1.2.3. Eliminación

Los riñones son la principal ruta de eliminación del F^- , donde en condiciones normales el 60% de su absorción diaria en adultos se excreta por la orina, mientras que en niños fluctúa entre el 30 y 50%. Como consecuencia refleja un equilibrio fisiológico determinado por la ingesta previa de F^- , su tasa de absorción y la eficacia con la que se elimina. Además, sólo una pequeña cantidad del F^- absorbido se excreta por el sudor y las heces (Buzalaf y Whitford, 2011; Liu y cols., 2011).

1.1.2. Toxicodinamia del fluoruro

El F^- se une a los iones de calcio provocando hipocalcemia y con ello conduce a la formación de osteoides. Inhibe la ATPasa Na^+/K^+ , provocando hiperpotasemia por liberación extracelular de potasio. Interrumpe la fosforilación oxidativa, la glucólisis, la coagulación y la neurotransmisión (Chouhan y Flora, 2010). También se ha asociado a desordenes en el metabolismo energético, de aminoácidos y ácidos grasos (Zaho y cols., 2022).

Se ha demostrado que el exceso de F^- altera el equilibrio red-ox favoreciendo el estrés oxidante en los organismos, debido a su gran capacidad de inhibir enzimas antioxidantes, teniendo como resultado un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hígado, riñón y corazón, además de mostrar acumulación de productos de peroxidación lipídica como el metabolito malondihaldeído (MDA), el cual es un excelente biomarcador del daño en lípidos por el estrés oxidante. El estrés y daño oxidante puede favorecer las alteraciones metabólicas, hidrólisis de ATP, inhibición de proteínas y daño al ADN (Boonstra y Post, 2004; Ayala y cols., 2014).

También se ha informado que el F^- al dañar el DNA cambia a proteínas reguladoras del ciclo celular, induciendo apoptosis. Sin embargo, en diversos trabajos se concluye que se induce la apoptosis por el aumento de peroxidación lipídica, resultando en alteración mitocondrial e intervención en la regulación y expresión de genes pro y anti apoptóticos en modelos *in vivo* e *in vitro*. A pesar de contar con información, aún no se tienen claras las vías de señalización involucradas en la

inducción de la apoptosis por F^- (Barbier y cols., 2010; Ribeiro y cols., 2017; Zhan y cols., 2006).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado al F^- en el grupo B, como posible carcinógeno ya que existen estudios limitados para considerar al F^- como un carcinógeno en seres humanos (ATSDR, 2005).

1.1.2.1 Toxicodinamia del fluoruro en hueso

Mención especial merece el hueso que es el principal tejido blanco de la exposición a F^- , está compuesto principalmente de un 5-10 % de agua, 50-70% de hidroxiapatita y del 20-40% de compuestos orgánicos donde se incluye el colágeno de tipo 1 (Osterhoff y cols., 2016). El hueso para mantenerse en equilibrio sufre una constante remodelación alternando la reabsorción y acumulación del F^- . Además, su crecimiento y metabolismo está modulado por elementos como el calcio, fósforo y zinc (Ciosek y cols., 2021).

Se ha descrito que el F^- en concentraciones bajas (nano y micromolar) favorece el correcto desarrollo de los huesos y dientes, ya que, estimula la proliferación de osteoblastos y por el contrario inhibe la actividad de los osteoclastos teniendo como resultado un aumento de masa ósea (Liu y cols., 2019). Sin embargo, a concentraciones altas causa fluorosis dental y esquelética, su cantidad acumulada en hueso está relacionada con la cantidad de F^- ingerido a través del agua potable contaminada con este elemento-(Dhar y cols., 2009).

El F^- en el proceso de intercambio iónico se incorpora a los cristales de hidroxiapatita formando fluorapatita, provocando cambios en las propiedades mecánicas del hueso. Al ser menos soluble a ácidos la fluorapatita puede resultar en una mayor resistencia a la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos. Además, el F^- también puede alterar a las proteínas de la matriz ósea, principalmente al colágeno, donde se ha observado que la ingesta excesiva de F^- puede inhibir la síntesis y disminuir el grado de entrecruzamiento del colágeno de tipo 1 (Miao y cols., 2002). Recientemente, en estudios de metabolómica se identificó en ratas expuestas a F^- un aumento de las concentraciones séricas de prolina quien es el principal aminoácido que conforma el colágeno. La alteración del metabolismo de prolina

puede afectar la síntesis de colágeno y en consecuencia la fortaleza y estructura del tejido conectivo (Zaho y cols., 2022).

1.2. Arsénico

El arsénico (As) es un metaloide que se distribuye ampliamente en la naturaleza y es un componente de más de 200 minerales en su forma inorgánica (As_i). En el ambiente existe principalmente en dos estados de oxidación, trivalente (As^{III}) y pentavalente (As^V), donde las formas trivalentes más comunes son el trióxido de arsénico y el arsenito de sodio, mientras que los compuestos pentavalentes son el arsenato de sodio, el pentóxido de arsénico y el ácido arsénico. Además, son reconocidos mundialmente como compuestos tóxicos para la salud humana (Navas-Acien y cols., 2008, Tokar y cols., 2013).

1.2.1. Fuentes de exposición a arsénico

El As_i se encuentra mayormente en la corteza terrestre y está asociado a rocas sedimentarias e ígneas. Además, sus compuestos se encuentran en el aire, suelo, plantas, animales y agua (IARC, 2004).

La principal fuente de exposición ambiental al As_i es a través del agua potable contaminada y está dependerá de la geología del subsuelo. Las formas As^{III} y As^V inorgánicas son los principales especies de As en el agua, mientras que cantidades trazas de ácido monometil arsénico (MAs) y ácido dimetil arsénico (DMAs) también pueden estar presentes (IARC, 2011).

Los alimentos, como el arroz y principalmente los mariscos, pueden contribuir significativamente a la ingesta diaria de As; en el caso del arroz como As_i y en los alimentos marinos en su forma orgánica (As_o) como la arsenobetaína, arsenocolina y arsenolípidos que son organoarsenicales considerados no tóxicos (ATSDR, 2005).

1.2.2. Toxicocinética del arsénico

1.2.2.1. Absorción

Las principales vías de absorción del As_i son el contacto con la piel, la ingestión y la inhalación (Tokar y cols., 2013). El As^{III} se absorbe del 80 al 90% en el tracto gastrointestinal, esto a través de transportadores como el de glucosa dependiente de sodio, acuaporinas 3 y 10, y polipéptidos transportadores de

aniones orgánicos, mientras que el AsV se absorbe a través de transportadores de fosfato (Calatayud y cols., 2012).

1.2.2.2. Distribución y metabolismo

El As posteriormente de ser absorbido se distribuye a los diferentes órganos, vía torrente sanguíneo (Mondal y Chattopadhyay, 2020). La vida media del As ingerido en el cuerpo humano, evaluada en sangre, es de aproximadamente 10 horas. Sin embargo, la vida media de arsenicales metilados está en un rango de 30 horas (Tokar y cols., 2013).

Respecto a la vía metabólica del As_i, el AsV debe primero reducirse a AsIII a través de un proceso mediado por reductores endógenos como el glutatión reducido (GSH). El arsenito se metila a MAs y luego a DMAs, principalmente en el hígado, a través de la enzima arsénico 3 metiltransferasa (AS3MT) con S -adenosil-metionina como cofactor donante de metilos (Hall y Gamble, 2012) (figura 1).

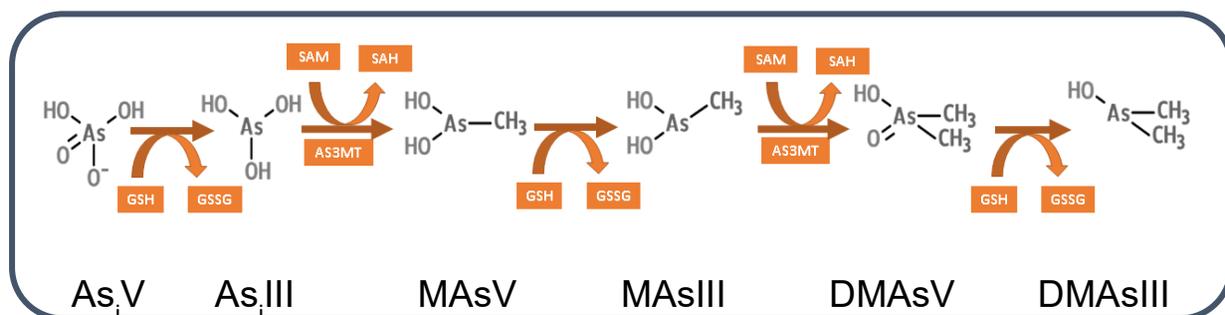


Figura 1. Ruta metabólica del As_i. Se muestra la reducción del arsenito (As_iV) así como la metilación de las especies trivalentes. GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; AS3MT: arsénico 3-metil transferasa; MAs: monometil arsénico; DMAs: dimetil arsénico. Figura tomada de Faita y cols., 2013.

1.2.2.3. Eliminación

La principal forma de eliminación de las especies de As es a través de la orina, no obstante, también se puede excretar en menor proporción por las heces, la descamación de la piel y el sudor (Tokar y cols., 2013). En los seres humanos, los arsenicales urinarios están compuestos del 10 al 30% de As_i, del 10 al 20% de MAs y 55 al 76% de DMAs (IARC, 2011). Mientras que en roedores como los ratones

la proporción relativa de MAs es menor (1-3%) y la de As_i es mayor (de 30-40%) comparativamente a la de los seres humanos (Kenyon y cols., 2005).

Cabe resaltar que la concentración del As urinario es un buen indicador de la exposición reciente y el perfil urinario de metilación es empleado como un factor de susceptibilidad a la presencia de sus efectos tóxicos. (Tokar y cols., 2013).

1.2.3. Toxicodinamia del arsénico

Los compuestos trivalentes de As (As_iIII y MAsIII) son reactivos con los grupos tiol (-SH), por lo cual inhiben enzimas o alteran proteínas. El AsV es un desacoplador de la fosforilación oxidativa mitocondrial por un mecanismo probable de sustitución del arseniato por fosfato inorgánico en la formación de trifosfato de adenosina (ATP) (Tokar y cols., 2013). Los arsenicales trivalentes pueden transportarse al interior de la célula a través de acuaporinas (acuagliceroporinas) y los arsenicales pentavalentes por transportadores de fosfato (ATSDR, 2005). Los arsenicales trivalentes se pueden acumular en hígado, riñón, pulmón, vejiga y bazo y su afinidad por SH favorece su concentración alta en uñas, cabello y piel.

Los arsenicales pentavalentes pueden acumularse en el tejido óseo al competir con el fósforo, el As reemplaza al fosforo en la molécula de hidroxilapatito de fosfato de calcio en la matriz mineral ósea generando arseniato hidroxilapatito de calcio. Por lo tanto, el tejido óseo es un reservorio de As en el cuerpo y lo acumula constantemente durante largos periodos de exposición (ATSDR, 2005). Se ha demostrado que las especies trivalentes de As (As_i (III), MAs (III) y DMAs (III)) producen daño oxidante al ADN, alteración del estado de metilación y reparación del ADN e inestabilidad genómica. Sin embargo, la metilación del As_i es necesaria para que se lleve a cabo este daño oxidante (NRC, 2001). Por otra parte, las especies pentavalentes MAs(V) y DMAs(V) son comparativamente menos tóxicas que el As_i. (Styblo y cols. 2010).

1.3. Co-exposición fluoruro-arsénico

La contaminación ambiental es el resultado de la explotación antropogénica de la naturaleza y los recursos naturales. Las actividades naturales y antropogénicas son la principal causa de exposición al F⁻ y al As_i. La exposición a concentraciones elevadas y/o crónicas de estos dos contaminantes da como resultado un gran número de afecciones celulares y genéticas, en varios órganos y sistemas como el neuroconductual, cardiovascular, renal, hepático, reproductivo, entre otros (Mondal y Chattopadhyay, 2020).

Existen muchas áreas geográficas que están expuestas de manera independiente a estos contaminantes y a la coexistencia de F⁻ y As_i en muchas áreas del mundo (Mondal y Chattopadhyay, 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) ha establecido los límites máximos permisibles en el agua de consumo para F⁻ y As de 1.5 mg/L y 10 µg/L respectivamente. En México, el 40% de las localidades con niveles de As mayores a 10 µg/L también presentan una exposición concurrente de F⁻ superior a 1.5 mg/L (Limón-Pacheco y cols. 2018).

La información relacionada con los efectos de la exposición combinada del F⁻ y As_i es controversial, esta ha sido evaluada en diferentes órganos, y sistemas *in vitro* e *in vivo*. En la tabla 1 se resumen los estudios realizados *in vitro* y en la tabla 2 se muestran los principales estudios realizados en animales de laboratorio y humanos.

Tabla 1. Estudios *in vitro* de exposición concurrente de F⁻ y As_i

Modelo de Estudio	Concentración de F ⁻ y de As _i		Observaciones	Referencia
Células madre neuronales de ratón, C17.2, expuestas 24h	5 mg/L	0.1, 0.5 o 1 mg/L	En presencia de F ⁻ aumentó la citotoxicidad de las células expuestas a las tres concentraciones empleados de As.	Rocha y cols., 2011
Células endoteliales de cordón umbilical de humanos, HUVEC expuestas 24h	1mM (19 mg/L)	5 µM (0.375 mg/L)	En la coexposición F ⁻ y As se observaron menores efectos tóxicos proinflamatorios y proapoptóticos que de manera independiente para cada contaminante	Ma y cols., 2017
Células de miocardio de rata, H9c2, expuestas 24 h	10 o 35 mg/L (0.53 o 1.84mM)	10 o 25 µM (0.75 o 1.875 mg/L)	Se observó un efecto antagónico en la inducción de las proteínas de estrés del retículo endoplásmico y de la apoptosis. Se observó un efecto antagónico en el grado de apoptosis temprana en la relación F ₃₅ :As ₁₀ mientras que en F ₃₅ :As ₂₅ un efecto sinérgico .	Li y cols., 2022
Células de Leydig TM3 y de Sertoli TM4, de ratón expuestas 24, 48 o 72 h	0.4 mM (7.6 mg/L)	7.7 µM (0.57 mg/L)	Se observó el aumento del daño oxidante y la apoptosis comparativamente a la exposición a un solo contaminante.	Aydin y Orta-Yilmaz, 2022

Tabla 2. Principales estudios *in vivo* de co-exposición de F⁻ y As_i.

Modelo de Estudio	Concentración de F ⁻ y de As _i		Observaciones	Referencia
Ratas Wistar expuestas durante 24 semanas a través del agua de bebida	150 mg/L	75 mg/L	Se observó una disminución en las actividades de la superóxido dismutasa (SOD) y GSH; aumento de MDA tanto en hígado como en riñón y se mostró un efecto menos tóxico que por separado de los contaminantes.	Liu y cols. 1999
Ratones macho albinos suizos expuestos durante 7 días, vía intraperitoneal	8 mg/kg/d	4 mg/kg/d	Se reportó un aumento en la cantidad de MDA y daño al ADN en células de la médula ósea extraídas de los ratones expuestos, concluyendo que se encontró un efecto más tóxico que por separado de los contaminantes.	Roy y cols. 2006
Ratas Wistar macho expuestas durante 9 meses a través del agua de bebida	50 mg/L	50 mg/L	Se describió un aumento en las concentraciones de ROS y una disminución en los niveles de GSH en sangre, sin efecto en la co-exposición de ambos contaminantes.	Mittal y cols., 2018
Pez cebra hembra expuestas durante 15, 30 y 60 días en el agua del acuario	15 mg/L	50 µg/L	Se observó un nivel basal de GSH, menor contenido de MDA y de la actividad de la CAT en tejido cerebral, mostrando un efecto menos tóxico que por separado de los contaminantes.	Mondal y cols. 2021
Ratones C57BL/6 hembra, expuestas durante 9 días mediante el agua de bebida	50 mg/L	1mg/L	Se observaron concentraciones menores de As _i , MAs y DMAs, en órganos como riñón, hígado y pulmón, así como disminución de la capacidad de metilación del As, en presencia de F ⁻ .	Sánchez-Peña y cols. (en preparación)
Población adulta mexicana expuesta a través del agua de consumo	Mediana de agua (min-max) 1.5 mg/L (0.1-5.1)	Mediana de agua (min-max) 8.8 µg/L (.01-54.3)	Se informa que la exposición a F ⁻ disminuye la capacidad de metilación del As _i .	Jiménez-Córdova y cols. 2019

2. JUSTIFICACIÓN

El F⁻ y el As_i son los dos contaminantes inorgánicos más distribuidos en la naturaleza, principalmente en aguas subterráneas. El agua subterránea es una fuente importante de agua potable para el consumo humano y se estima que al menos 300 millones de personas de diversas áreas geográficas del mundo incluido México están expuestas concomitantemente a concentraciones altas de estos dos elementos.

La magnitud de la exposición y los efectos causados por la exposición a As y más recientemente a F⁻ han sido muy documentados. Los efectos cardiovasculares, hepáticos, renales y neurológicas son los más reconocidos en la exposición a F⁻ y As_i. El principal modo de acción para ambos contaminantes es el aumento de ROS y el daño oxidante. Sin embargo, los efectos causados en la exposición concomitante a ambos contaminantes son controversiales ya que pueden tener un efecto potenciado o antagónico.

En la co-exposición de As_i con F⁻, existe una disminución de la capacidad de metilación del As evaluada a través de la orina en una población adulta expuesta a concentraciones moderadas de As y relativamente altas de F⁻. La evaluación del patrón de metilación de As_i está relacionada con la susceptibilidad de los efectos tóxicos causados por la exposición a As_i.

Tampoco se conoce, si la dosis interna de F⁻ y As se modifica cuando ambos elementos concurren. Sin embargo, se ha sugerido que la absorción de As disminuye en presencia de F⁻ reduciendo la dosis interna de As.

3. HIPÓTESIS

Las concentraciones de F^- en orina y órganos blanco, así como el daño oxidante, disminuirán en presencia de la coexposición de As_i .

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la disposición de F^- en la exposición concurrente con As_i en ratones.

4.1.1. Objetivos particulares

- Determinar la concentración de F^- en la orina y el tejido de órganos blanco como el hígado, riñón y hueso de ratones expuestos concomitantemente a F^- y As_i .
- Evaluar la concentración urinaria de arsenicales que contempla el patrón de metilación de As en ratones co-expuestos a F^- y As_i .
- Evaluar el daño oxidante en lípidos a través de la evaluación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en riñón e hígado de ratones expuestos concomitantemente a F^- y a As_i .

5. MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

5.1.1. Modelo animal y tratamiento

Se utilizaron 60 ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad con un rango de peso entre 12 y 17 g, las cuales fueron proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Todos los procedimientos fueron aprobados en el protocolo experimental número 0277-18 por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV. Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato (4 por caja), en condiciones convencionales del bioterio bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de experimentación cada uno con 12 animales (figura 2).

Los grupos fueron expuestos a través del agua de bebida, donde el grupo control recibió solo agua desionizada, el siguiente grupo solo F^- en forma de fluoruro de sodio (NaF) con una concentración de 50 ppm (mg/L), y los tres grupos restantes de coexposición una mezcla de F^- con una concentración de 50 ppm y As_i en forma de arsenito de sodio ($NaAsO_2$) con concentraciones de 1, 10 y 20 ppm por un periodo de 30 días, permitiéndoles a los animales aclimatarse durante 7 días antes de la primera exposición que se realizó a través del agua de bebida (Tabla 1). Para el caso de la exposición a F^- la concentración empleada intenta simular una concentración alta (10 ppm) a la que pueden estar expuestas poblaciones endémicas (Dunipace y cols., 1995; Dionizio y cols., 2018). Para el caso de las concentraciones de As_i intenta simular las concentraciones de poblaciones endémicas de 0.25, 2.5 y 5 ppm, al considerar que los roedores son de 4-5 veces más resistentes que los seres humanos (ATSDR, 2005).

Se registró la ingesta de alimento y el peso de cada animal cada 5 días, mientras que el consumo de agua se midió diariamente durante los 30 días de exposición.

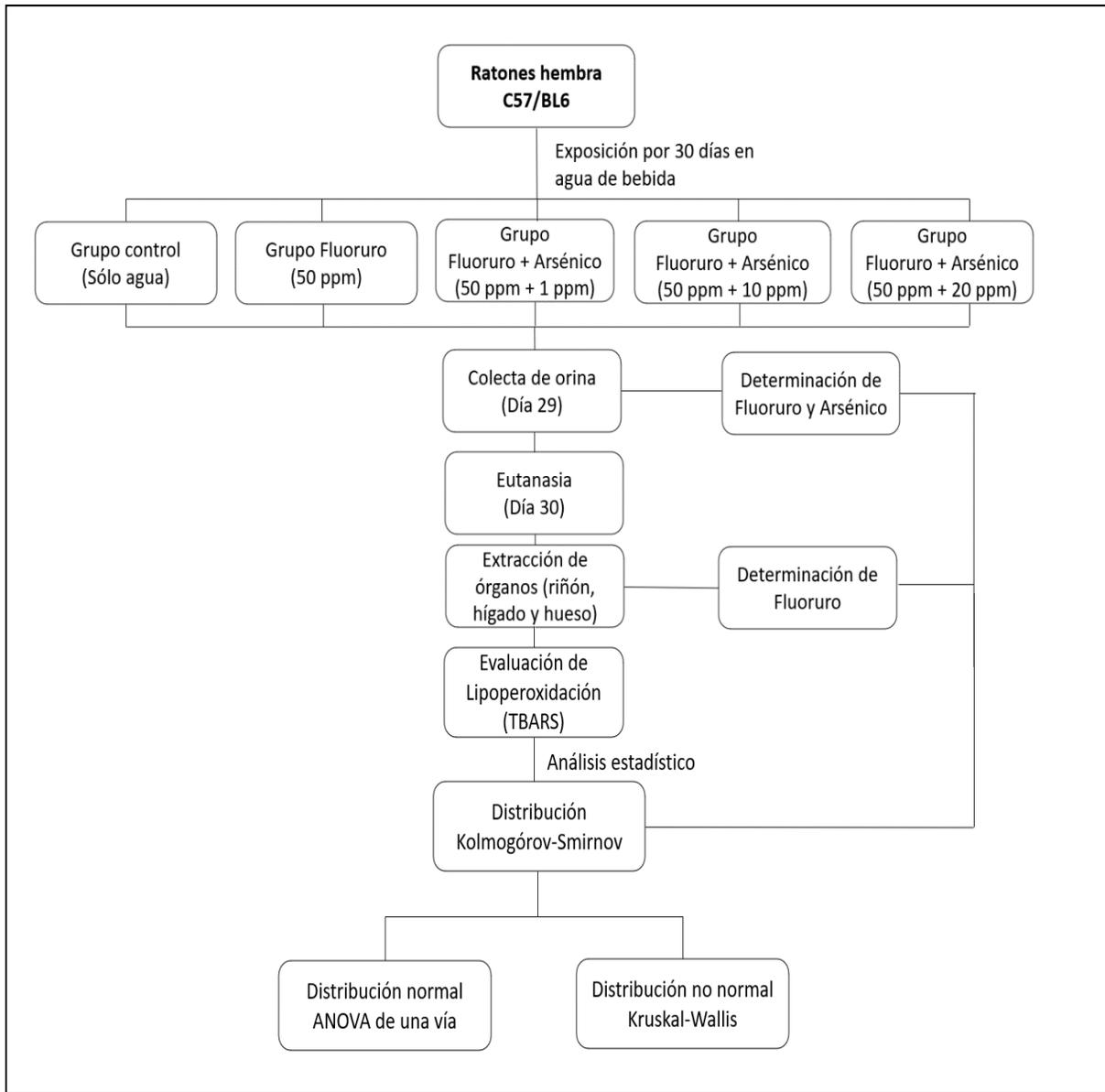


Figura 2. Estrategia experimental con ratones C57BL/6

Tabla 3. Grupos experimentales

Grupos		n	n de cajas con 4 animales cada una
1	Control, solo agua	12	3
2	F ⁻ 50 ppm	12	3
3	F ⁻ 50 ppm + As _i 1 ppm	12	3
4	F ⁻ 50 ppm + As _i 10 ppm	12	3
5	F ⁻ 50 ppm + As _i 20 ppm	12	3

5.2. Colecta de orina y tejidos

Al finalizar el período de exposición en el día 29 se colectó la orina, los animales fueron transferidos a jaulas metabólicas y se colocaron 2 animales por jaula donde se mantuvieron durante 16 horas sin alimento y con acceso libre al agua con los respectivos tratamientos. La orina se colectó en hielo, se registró el volumen obtenido de cada jaula y las muestras se conservaron a -20° C hasta sus respectivos análisis.

La eutanasia se llevó a cabo el día 30 al finalizar la exposición y posterior a la eutanasia se diseccionaron los riñones, hígado y el hueso. Para el caso del hueso se eligió la tibia izquierda por su facilidad de obtención, se tuvo cuidado en no dejar algún residuo de piel o musculo. Finalmente, para cada órgano se registró el peso y se conservaron a -80° C hasta sus respectivos análisis.

5.3. Pretratamiento de tejidos para la cuantificación de fluoruro

5.3.1. Reactivos

NaF de J.T Baker Cat. No. 3688 al 99 %, hidróxido de sodio (NaOH) de Merk Cat. No. 1.06466.0050 al 10%, hexametildisilazano (HMDS) de Sigma Aldrich Cat. No. 205389 al 98%, ácido perclórico (HClO₄) de Merck Cat. No. 100519 al 70%, ácido acético (CH₃COOH) de Merck Cat. No. 30.04.07 al 100% y buffer TISAB II de Thermo Scientific Cat. No. 940909.

5.3.2. Principio

La difusión isotérmica se fundamenta en que el F^- en medio ácido se transforma en HF, compuesto volátil que puede ser recogido sobre una solución alcalina, por ejemplo, NaOH, logrando así aislarlo de una matriz compleja, esto de acuerdo con el método descrito por Rigalli y Puche (2007).

5.3.3. Preparación de la homogenización de tejidos

Se descongelaron los órganos (hígado y riñón) antes de la realización del análisis, se colocaron 500 mg de tejido en tubos de propileno de 50 mL y se les añadió 2 mL de agua desionizada para preparar homogenados mediante un homogeneizador mecánico con aspas de plástico.

Para el caso del hueso, la muestra completa de la tibia se pulverizó con ayuda de un triturador en nitrógeno líquido. El polvo de hueso (aproximadamente 90 mg) se vertió en un tubo de propileno de 50 mL y se le añadió 2 mL de agua desionizada para preparar homogenados de igual forma que el hígado y riñón.

5.3.4. Procedimiento

En el tubo de propileno de 50 mL, donde se encontraban las muestras homogenizadas se añadió 1 mL de hexametildisiloxano (HMDS) saturado con ácido perclórico ($HClO_4$) 6.8 M para llevar a cabo la digestión del tejido. Se colocó en cada tapa de los tubos 50 μ L de NaOH 0.75 M mediante goteo y se cerró con cuidado sin tirar gota alguna. Los tubos se mantuvieron en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo, a la tapa del tubo se le adicionó 25 μ L de ácido acético (CH_3COOH) 0.2 M, se combinó el contenido de la tapa por rotación, se añadió 500 μ L de Total Ionic Strength Adjustment Buffer (TISAB II), y agua desionizada (425 mL). Posteriormente se trasvasó el contenido de la tapa a un nuevo tubo de polipropileno en donde se determinó la concentración de F^- por electrodo ion selectivo, comparado con una gráfica estándar de NaF procesada de igual manera que las muestras de orina.

5.4. Determinación de fluoruro en orina y muestras de tejido pretratadas

5.4.1. Reactivos

Fluoruro de sodio (NaF) de J.T Baker Cat. No. 3688 al 99 %, buffer TISAB II de Thermo Scientific Cat. No. 940909 y estándares de referencia de orina PC-U-F 1102, PC-U-F 1107, PC-U-F 1108, PC-U-F 1109 y PC-U-F 1106 del Laboratorio del Instituto Nacional de Salud Pública de Quebec, Canadá (INSPQ).

5.4.2. Principio

La potenciometría con electrodo de ion selectivo es una técnica que se fundamenta en medir potenciales eléctricos de disoluciones para calcular la concentración final del analito. La relación final entre el potencial y la concentración lo proporciona la ecuación de Nerst. El electrodo selectivo a fluoruro en combinación con un electrodo de referencia combinado que contiene una membrana cristalina compuesta de fluoruro de lantano (LaF_3) y de europio (EuF_2). Esta membrana es permeable a los iones de fluoruro, los cuales crean la diferencia de potencial al estar en contacto con dos disoluciones de concentración diferente de F^- . Se utiliza una solución amortiguadora conocida como TISAB cuyo pH de 5 favorece la presencia del F^- como especie predominante en las especies que contengan F^- ; además, contiene ácido ciclohexilamino-dinitrilotetraacético el cual forma quelatos estables con Fe^{3+} y Al^{3+} liberando el F^- de sus complejos con estos cationes (Rubinson, 2001).

5.4.3. Procedimiento

La cuantificación de F^- en las muestras en solución, tejidos previamente tratados y las muestras de orina, se llevó a cabo por un método potenciométrico usando un electrodo selectivo de F^- combinado 9609BNWP, su uso fue de acuerdo al procedimiento validado y acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación (ema, A.C.) en el Laboratorio de Investigación y Servicio en Toxicología (LISTO) del Cinvestav.

Se llevó a cabo la preparación de las disoluciones estándares de F^- y muestras de orina, se realizó el gráfico de calibración y de las muestras a analizar. Posteriormente se acondicionó el potenciómetro y el electrodo, se llevó a cabo la lectura de las soluciones del gráfico de calibración y con ello se construyó el gráfico de calibración (figura 3).

Las orinas de estudio se evaluaron por duplicado y los datos obtenidos se interpolaron en el gráfico con la fórmula de la recta despejando el valor de "y" ($y = mx + b$) y con el valor de "y" obtenido se calculó el antilogaritmo para obtener la concentración de F^- correspondiente. Se tomó en cuenta que los valores obtenidos estuvieran dentro un valor de exactitud del 90% y de precisión menor al 10%.

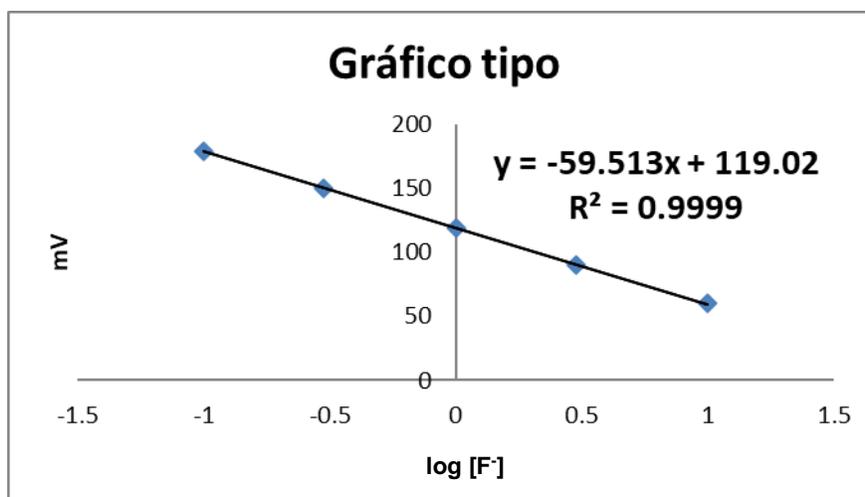


Figura 3. Gráfico de calibración típico para fluoruro

5.5. Determinación de As_i y sus metabolitos en orina

5.5.1. Reactivos

NaAsO₂ de Sigma Aldrich Cat. No. 232-070-5 al 99%, borohidruro de sodio (NaBH₄) de Sigma Aldrich Cat. No. 19807-2 al 1%, hidróxido de sodio (NaOH) de Merk Cat. No. 1.06466.0050 al 10%, buffer TRIS-HCl Sigma Aldrich Cat. No. 0.75 M pH 6 y estándar de orina de referencia 3669-Arsenic Species in Frozen Human Urine del National Institute of Standards and Technology.

5.5.2. Principio

El sistema de separación de las especies de As_i , se fundamenta en la capacidad que tienen los arsenicales de formar especies volátiles en función del pH y de la temperatura de la reacción. Este sistema consiste en un separador gas-líquido en donde se realiza la generación de especies arsenicales totales a un pH de 2 previo a una reducción con cisteína de acuerdo con el método descrito por Hernández y cols., (2007).

5.5.3. Procedimiento

La determinación de As_i y sus metabolitos en orina se realizó por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica PinAAcle 900F (Perkin Elmer) con generador de hidruros acoplado a una criotrampa automatizada (EAA-GH-CT), el cual se encuentra equipado con un FIAS 400 (PerkinElmer). El uso del equipo se llevó a cabo con el procedimiento validado y acreditado en el LISTO del Cinvestav. Todas las soluciones de trabajo (blanco, estándar de As_i , MAs y DMAs, y la orina estándar de referencia) se prepararon en fresco el día del análisis, así mismo alícuotas de las muestras de orina fueron pretratadas con cisteína durante 70 minutos previo al análisis.

En un dosificador acoplado al sistema se depositó la muestra blanco, el estándar de As_i , MAs y del DMAs para realizar el gráfico de calibración o la muestra pretratada con cisteína a una concentración final del 2%, se mezcló con $NaBH_4$ y con buffer Tris-HCl por medio de las bombas peristálticas del FIAS 400, las cuales se encargaron de llevar la mezcla hasta el separador gas-líquido. En estas condiciones la mezcla alcanzó un pH final de entre 1-2 y con ello se llevó a cabo la formación de las especies arsenicales. Se utilizó helio como gas de arrastre y un gradiente de temperatura de -293 a $50^\circ C$ (esto se logró por medio de una criotrampa de nitrógeno líquido y calentamiento a través de corriente aplicada en el alambre enrollado de Ni/Cr a la columna), las especies formadas se liberaron a diferentes temperaturas: As_i a $-55^\circ C$, MAs a $2^\circ C$ y de DMAs a $36^\circ C$.

La atomización de las especies se realizó en una microflama de hidrogeno y aire, con flujo de 23 y 42.9 mL/min respectivamente a través de un multiatomizador. Cada

especie arsenical se detectó en el PinAAcle 900F. Se tomó en cuenta que los valores obtenidos estuvieran dentro un valor de exactitud del 90% y de precisión al 10%.

5.6. Evaluación de lipoperoxidación en tejidos

5.6.1. Principio

La evaluación de la lipoperoxidación en tejidos por medio de TBARS se fundamenta en que la formación de estrés oxidante a nivel celular da como resultado la formación de hidroperóxidos lipídicos altamente reactivos e inestables. La descomposición de los peróxidos inestables derivados de los ácidos grasos polinsaturados da como resultado la formación de malondihaldehído (MDA), el cual se cuantifica colorimétricamente tras su reacción controlada con ácido tiobarbitúrico (Halliwell y Chirico, 1993).

5.6.2. Procedimiento

La evaluación de lipoperoxidación se llevó a cabo con el kit de ensayo de TBARS de Cayman Chemical y los reactivos se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se tomó aproximadamente 30 mg de tejido (hígado y riñón) y se le agregó buffer RIPA, posteriormente se homogenizó en hielo y se centrifugó a 1600 gravedades durante 10 minutos a 4°C y se colocaron los sobrenadantes en hielo o almacenaron a -80° C hasta su respectivo análisis.

Se añadió a la muestra solución SDS y se mezcló, posteriormente se agregó reactivo de color en cada vial. Los viales se colocaron en un soporte en posición vertical, se introdujeron en agua en ebullición durante una hora. Después de una hora, se retiraron los viales y se colocaron en hielo para detener la reacción durante 10 minutos. Se cargaron las muestras de cada vial en la placa transparente y se leyó la absorbancia a 530-540 nm.

Se calculó la absorbancia promedio de cada estándar y muestra, se graficó los valores en función de la concentración de MDA y finalmente se calculó la concentración de MDA para cada muestra a partir de la gráfica estándar.

5.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software GraphPad Prism 8.0. Los datos se representaron como la media +/- error estándar o como la mediana y el rango intercuartil, según la distribución de los datos, los cuales fueron evaluados mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov, los datos que presentaron una distribución normal se analizaron con ANOVA de una vía, mientras que los datos con distribución no normal fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se estableció una $p < 0.05$ como valor de significancia.

6. RESULTADOS

6.1 Peso corporal, consumo de agua, alimento y peso de órganos.

Se expusieron 60 ratonas de la cepa C57BL/6 mediante el agua de consumo a F⁻ a una concentración de 50 ppm y de As_i a concentraciones de 1, 10 y 20 ppm, se dividieron en 5 grupos experimentales cada uno con 12 ratones a lo largo de 30 días (figura 2). Se registró el peso corporal y el consumo de alimento cada cinco días, mientras que el consumo de agua fue diario.

En la figura 4A se muestra el registro del peso corporal durante el periodo de exposición, se observa un aumento gradual del peso en todos los grupos, sin embargo, al no tener un peso de inicio semejante en todos los grupos se decidió construir el gráfico 4B, donde se muestra el cálculo de la ganancia de peso por ratona, donde existe un aumento en promedio entre 3.87- 4.9 g durante los 30 días de tratamiento, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

Peso y ganancia de peso durante el periodo de exposición

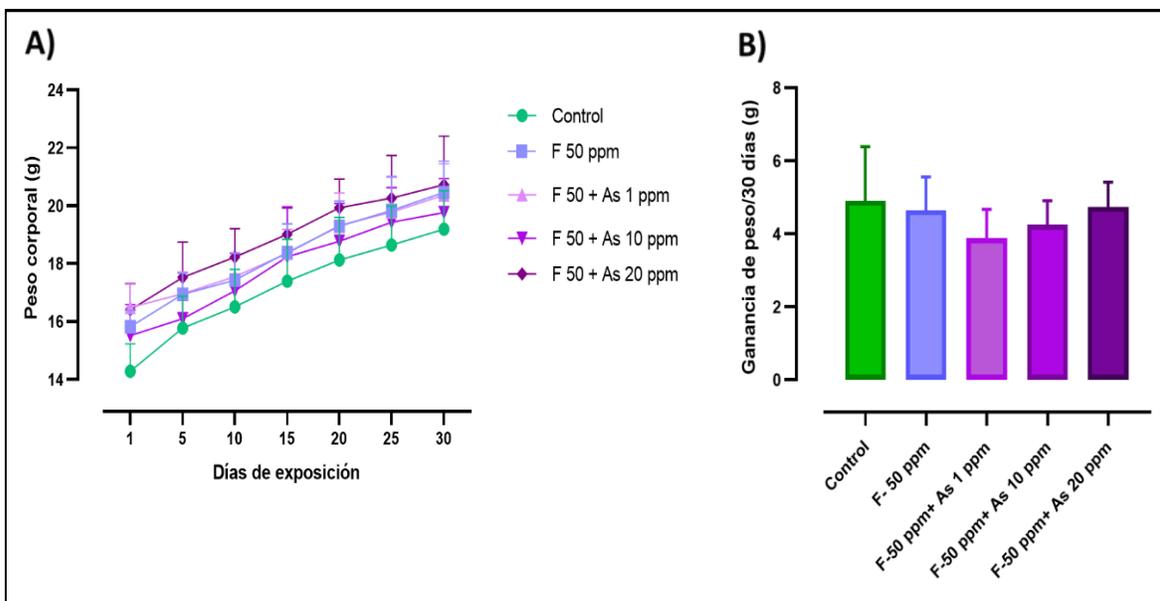


Figura 4. Peso y ganancia de peso. A) Peso corporal por ratón registrado cada 5 días durante los 30 días de exposición, B) Ganancia del peso calculada por ratona en los distintos tratamientos durante los 30 días de exposición. Los datos representan la media \pm desviación estándar, n=12 P>0.05, ANOVA de una vía.

Se registró diariamente la ingesta de agua durante los 30 días de exposición en los diferentes grupos experimentales, cada registro corresponde al agua consumida por cuatro ratonas. Como se puede observar en la figura 5A la ingesta de los 5 grupos oscilo a través del tiempo de exposición. Para poder evaluar la ingesta de agua se estimó el consumo diario de agua por ratona, observando un intervalo entre 3.36- 4 mL/ratón (figura 5B). No se observaron diferencias en el consumo de agua entre los grupos tratados y el control, sin embargo, se encontró una disminución estadísticamente significativa del 10% entre el grupo coexpuesto de F⁻ 50 + As_i 1 ppm y el grupo F⁻ 50 + As_i 20 ppm.

Consumo de agua durante el periodo de exposición

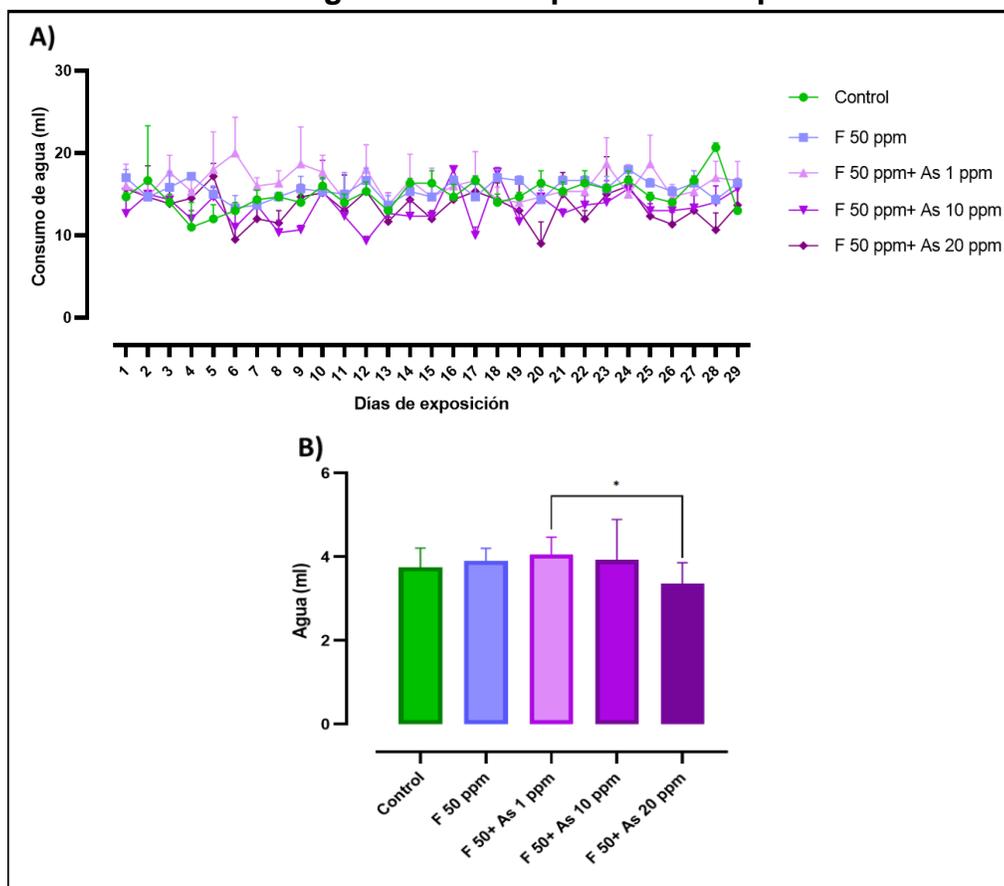


Figura 5. Consumo de agua. A) Evaluación diaria por jaula con cuatro ratones, durante los 30 días de exposición. B) Promedio de consumo de agua diario por ratona durante los 30 días del tratamiento. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=29). *p<0.05, pruebas ANOVA de una vía y post hoc Tukey's.

Respecto al consumo de alimento en la figura 6 se muestra que la ingestión de alimento durante el tiempo de exposición fue similar entre los diferentes grupos que consumieron en promedio entre 45.5-51 gramos cada 5 días por jaula con cuatro ratonas, de acuerdo con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Consumo de alimento durante el periodo de exposición

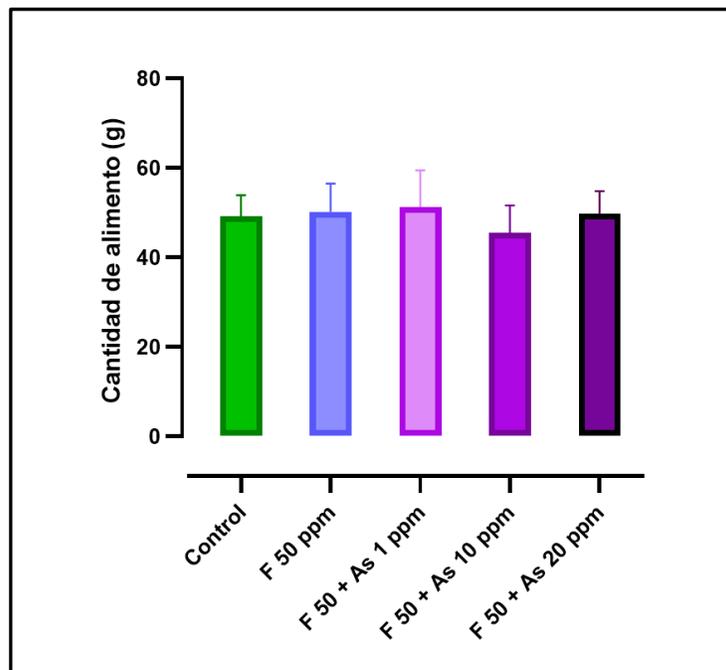


Figura 6. Consumo de alimento de 3 jaulas, evaluado cada 5 días durante el período de exposición. Los datos se representan la media \pm desviación estándar (n=15). $p > 0.05$, ANOVA una vía.

También se registró el peso de los órganos (riñón, hígado y hueso) de cada ratona, para verificar que ninguno de los tratamientos administrados influyera en este. En la figura 7 se muestran los pesos promedio por ratona registrados de cada órgano A) hígado, B) hueso, C) riñón derecho y D) riñón izquierdo para cada uno de los grupos experimentales, en general se observa poca variabilidad entre los pesos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Peso de órganos de las ratonas expuestas durante 30 días

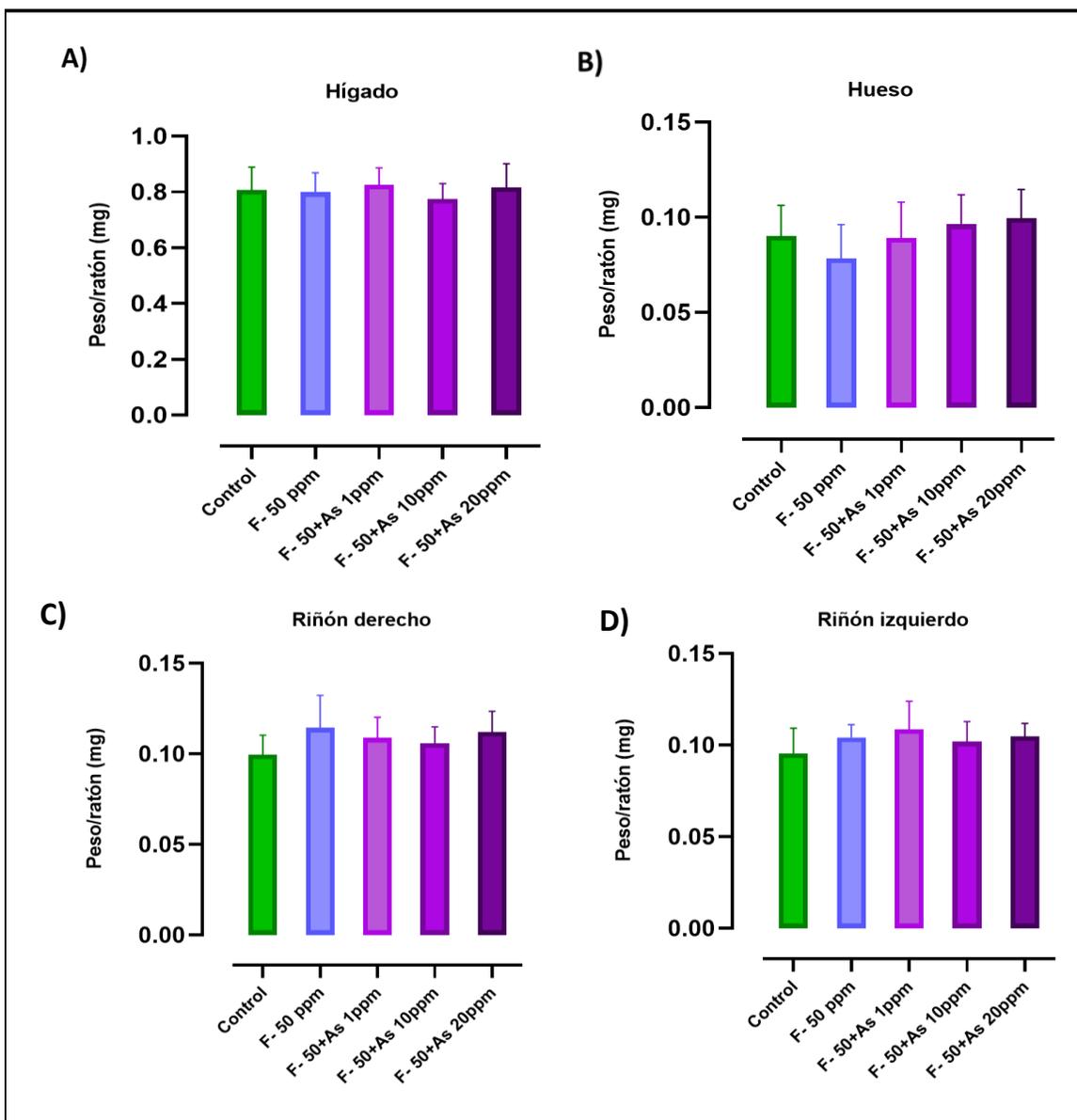


Figura 7. Peso promedio de los órganos de ratonas expuestas durante los 30 días. A) Hígado, B) Hueso, C) Riñón derecho y D) Riñón izquierdo. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=12). $p > 0.05$, pruebas ANOVA una vía.

Finalmente, el día 29 de la exposición se colocaron 2 ratonas por jaula metabólica para la colecta de orina durante 16 horas. En la figura 8 se observa una gran variabilidad de los volúmenes de orina colectada entre los diferentes grupos experimentales sin observar alguna diferencia

estadísticamente significativa con el grupo control ni entre los grupos con tratamiento.

Volumen de orina colectado

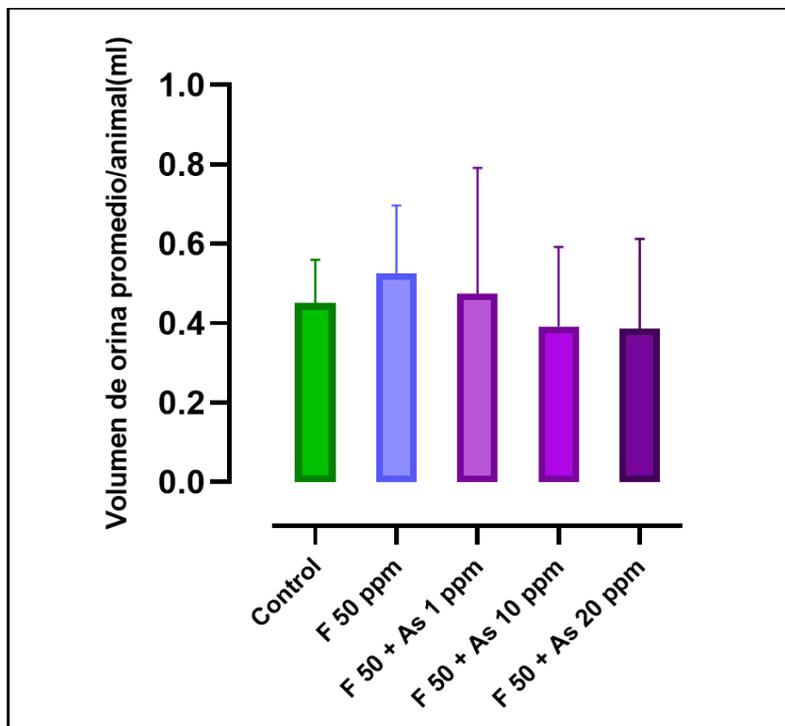


Figura 8. Volumen de orina por ratona colectada durante 16 h en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=6). $p > 0.05$, pruebas ANOVA de una vía.

6.2 Concentraciones urinarias de creatinina.

Para normalizar las posibles variaciones en el volumen de orina colectado, se evaluó la concentración de creatinina en orina en los diferentes grupos experimentales. Las concentraciones urinarias de F⁻ y As fueron ajustadas por su concentración urinaria de creatinina. En la figura 9 se muestran las concentraciones comparativas de creatinina en los diferentes grupos, sin observar diferencias significativas entre los grupos.

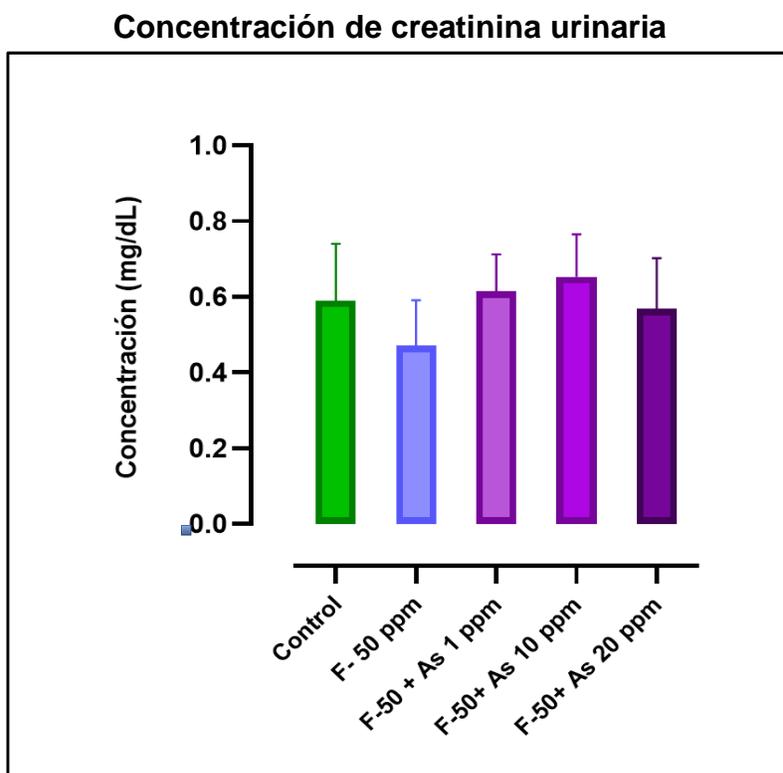


Figura 9. Concentración urinaria promedio de creatinina en los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=6). $P > 0.05$, prueba ANOVA una vía.

6.3 Dosimetría interna de fluoruro

6.3.1 Concentración de fluoruro en hueso.

El hueso es el tejido diana donde el F^- se acumula en un 99%, por tal motivo uno de los objetivos fue evaluar si en la coexposición de F^- y As_i se altera la concentración de F^- . En la figura 10 se muestran las concentraciones de F^- cuantificadas en los diferentes tratamientos, las cuales están expresadas en $\mu g/g$ de tejido. Los resultados muestran claramente un aumento significativo en los grupos expuestos a F^- , respecto al control. Interesantemente, en la exposición concomitante con As_i las concentraciones de F^- disminuyeron significativamente 19 y 24%. con As 10 y 20 ppm, respectivamente.

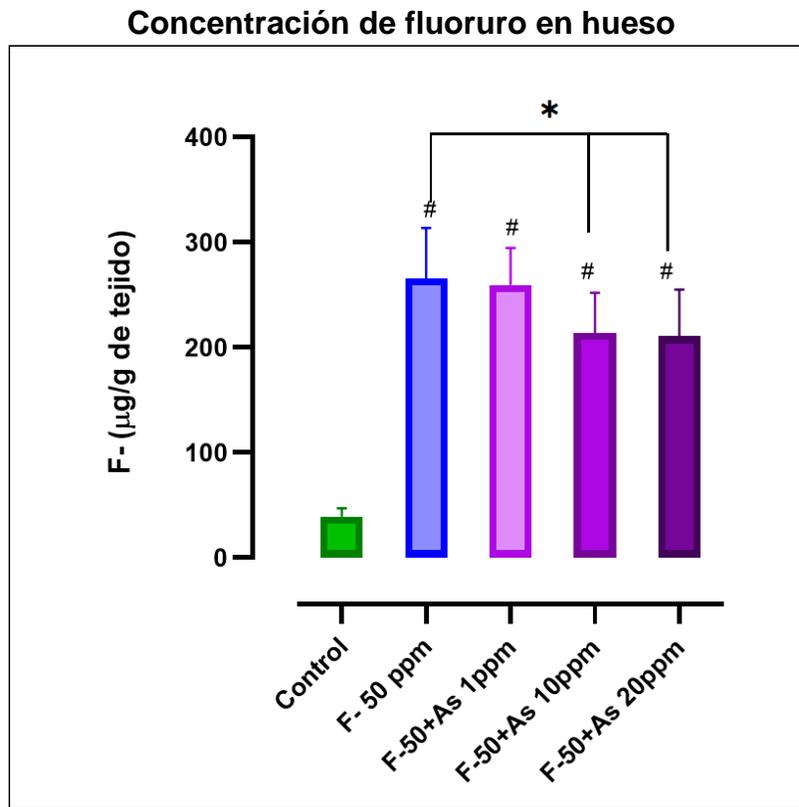


Figura 10. Concentración de fluoruro en tejido óseo. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=12). #p<0.05 respecto al control, *p<0.05, pruebas de ANOVA de una vía y post hoc Tukey's.

6.3.2 Concentración de fluoruro en riñón.

Respecto a los tejidos blandos, el riñón es el tejido de mayor afinidad con el F⁻. No obstante, las concentraciones de F⁻ en el tejido renal fueron significativamente menores a las encontradas en el hueso. En la figura 11 se presentan las concentraciones (µg/g de riñón), en los diferentes grupos. Debido a la poca cantidad de tejido renal, se realizaron pozas de tres muestras de tejido renal para tener suficiente tejido para el pretratamiento de muestra, teniendo al final 4 pozas por grupo experimental. La concentración de F⁻ en el grupo expuesto a 50 ppm fue mayor al control, pero el aumento no fue significativo. En contraste, en los 3 grupos coexpuestos con As_i, la concentración de F⁻ aumentó significativamente respecto al grupo control, se observó un aumento significativo del 44 y 46% en los grupos coexpuestos a As_i 1 y 10 ppm respectivamente, en comparación al grupo expuesto

a F⁻ 50 ppm. En el grupo coexpuesto con As_i 20 ppm la concentración de F⁻ fue similar al grupo expuesto solamente a F⁻.

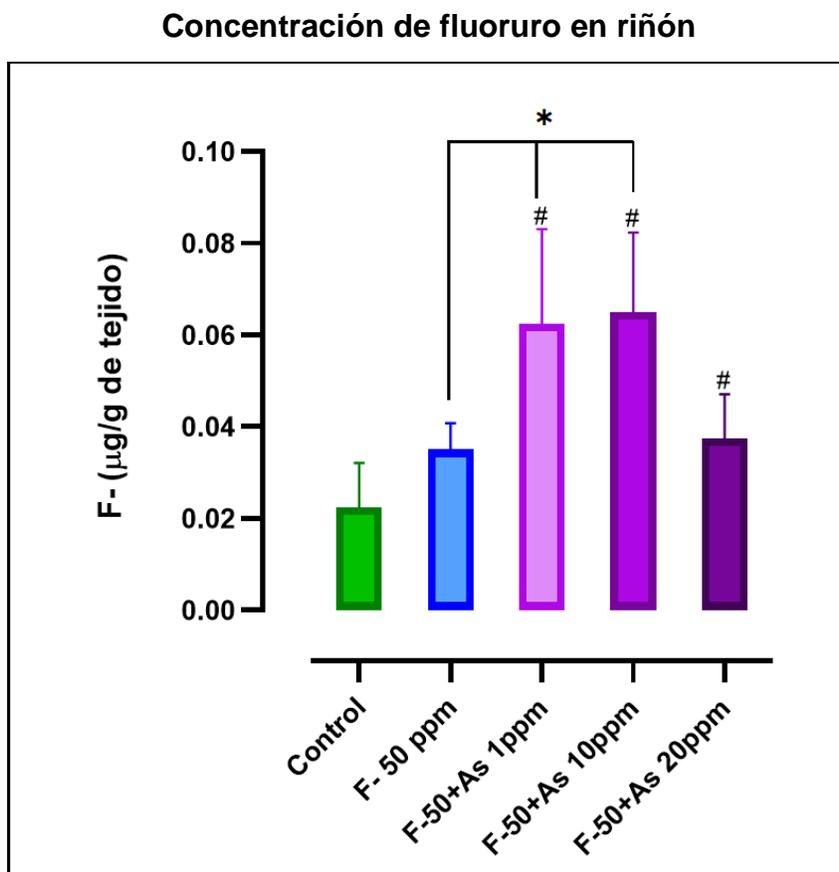


Figura 11. Concentración de fluoruro en tejido renal. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=4). #p<0.05 respecto al control, *p<0.05, pruebas ANOVA una vía, post hoc Tukey's.

6.3.3 Concentración de fluoruro en hígado.

Las concentraciones de F⁻ en el tejido hepático fueron menores a las encontradas en el riñón. Las concentraciones de F⁻ en los grupos de estudio fueron mayores al grupo control, con excepción del grupo coexpuesto con As_i 20 ppm (figura 12). No se observó alguna diferencia en la concentración de F⁻ en la coexposición con As_i.

Concentración de fluoruro en hígado

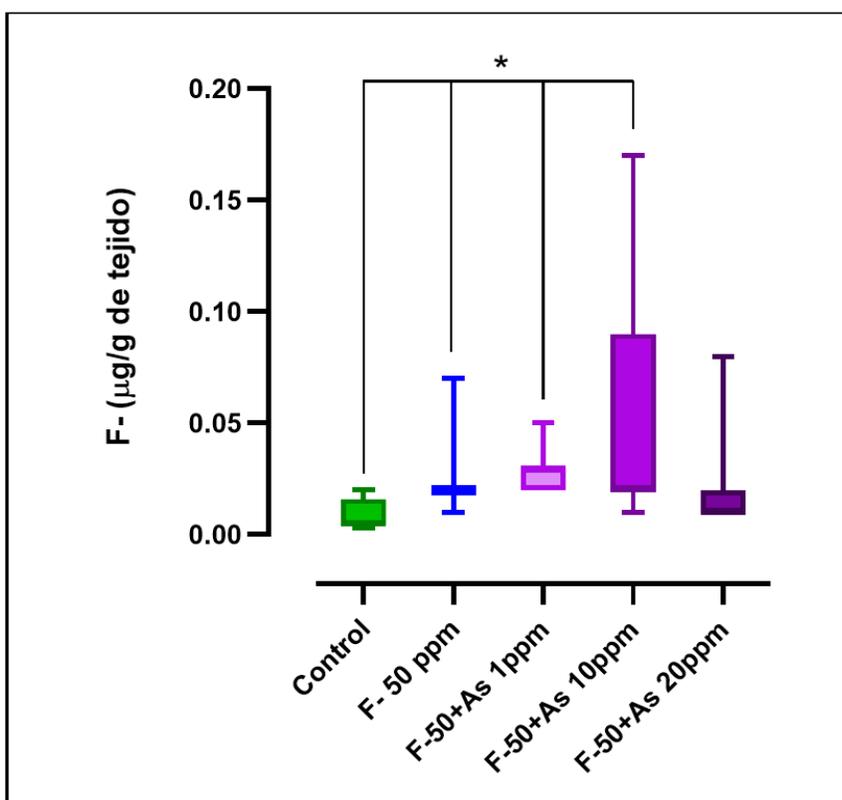


Figura 12. Concentración de fluoruro en tejido hepático. Los datos representan la mediana \pm RIQ (n=12). *p<0.05, pruebas de Kruskal-Wallis y post hoc Dunn's.

6.3.4 Concentración de fluoruro urinario.

Debido a que el F⁻ se excreta principalmente mediante la orina, uno de los objetivos fue determinar su concentración urinaria en la coexposición con diferentes concentraciones de As_i.

6.3.4.1 Concentración de fluoruro urinario sin ajuste con creatinina urinaria.

En la figura 13 se puede observar las concentraciones de F⁻ en los grupos expuestos a F⁻ 50 ppm y coexpuestos a diferentes concentraciones de As_i, como se esperaba muestran un aumento significativo respecto al control. Sin embargo, entre los grupos coexpuestos se muestra una disminución significativa del 48% en el grupo coexpuesto de F⁻ 50 + As_i 10 ppm respecto al grupo de F⁻ 50 + As_i 1 ppm.

Concentración de fluoruro en orina

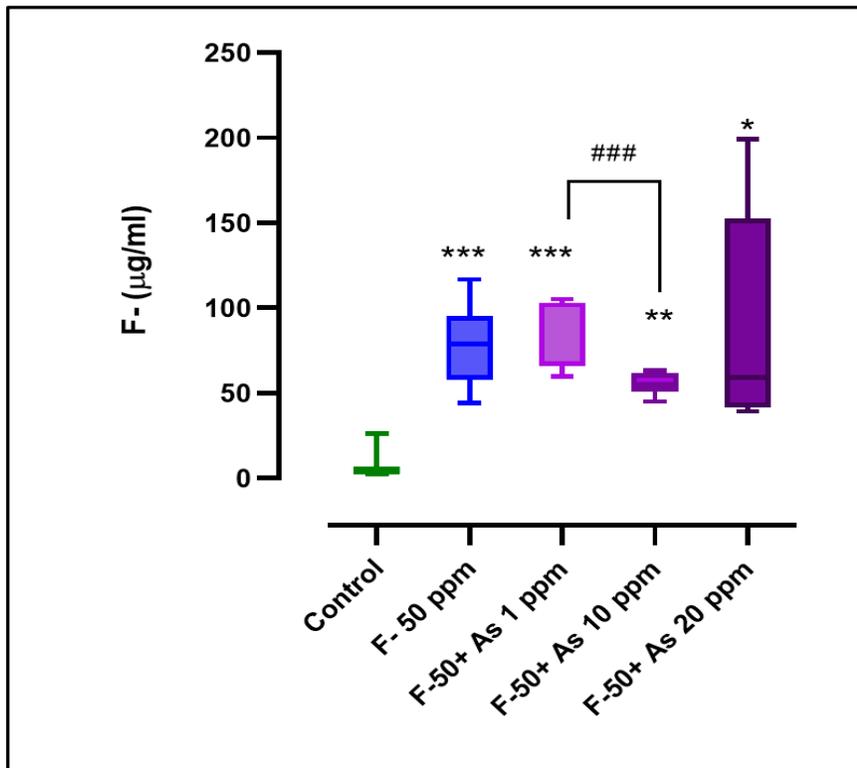


Figura 13. Concentración de fluoruro en orina expresada en $\mu\text{g/mL}$. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil ($n=6$). *** $p<0.0001$ respecto al control, Kruskal- Wallis y post hoc Dunn's, ### $p<0.05$, Mann-Whitney.

6.3.4.2 Concentración de fluoruro urinario con ajuste de creatinina

En la figura 14 se muestran las concentraciones comparativas de F^- expresadas en mg/g de creatinina. Como se esperaba, las concentraciones urinarias en todos los grupos que recibieron F^- fue significativamente mayor con respecto al grupo control. Respecto a la exposición concurrente con As_i , no se observó diferencia en la concentración urinaria de F^- en la coexposición con As_i 1 ppm, mientras que con As_i 10 ppm existió una disminución estadísticamente significativa del 35% con respecto al grupo de F^- 50 ppm. En el grupo con As_i 20 ppm la disminución del F^- urinario no fue significativa.

Concentración de fluoruro en orina corregida por creatinina

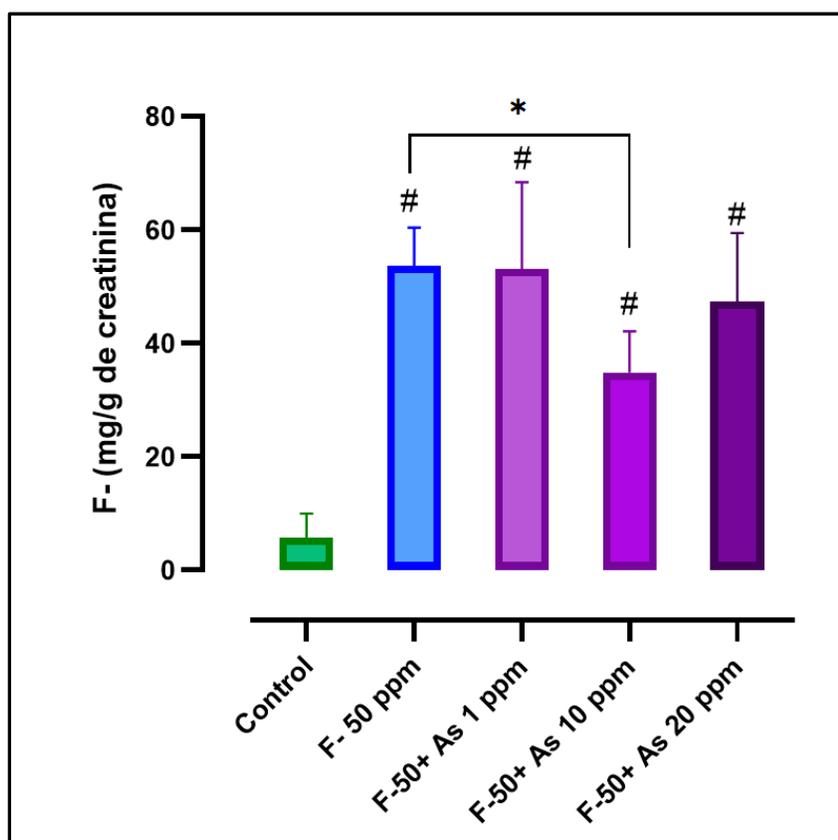


Figura 14. Concentración de fluoruro en orina expresada en mg/g de creatinina. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=6). #p<0.05 respecto al control, ANOVA una vía y post hoc Tukey's; post hoc, *p<0.05, t de student.

6.4 Dosimetría interna de arsénico

6.4.1 Concentración urinaria de arsénico sin ajuste de creatinina.

Debido a que el As se elimina principalmente por la orina, se determinaron las concentraciones de este y sus metabolitos, además de inferir si en la coexposición a F⁻ este puede cambiar su proporción de especies medidas en la orina.

Los resultados están expresados en ng/mL (figura 15 y figura 16). En la figura 15 se observa que las concentraciones de arsenicales son significativamente mayores en los tres grupos coexpuestos con As_i, comparativamente con los dos grupos que no fueron expuestos a As_i (control y expuesto a F⁻). Respecto a la concentración urinaria de As_i, no se observó una relación dosis-dependiente en los tres grupos

expuestos a As_i , mientras que si se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de MAs en los grupos F-50 + As_i 1 ppm vs F-50 + As_i 10 ppm y F-50 + As_i 20 ppm. Para el caso de DMAs solo se observó aumento significativo entre los grupos F-50 + As_i 1 ppm vs F-50 + As_i 10 ppm, sin aumento significativo entre el grupo de mayor exposición a As_i (F-50 + As_i 20 ppm).

Concentración de especies arsenicales en orina

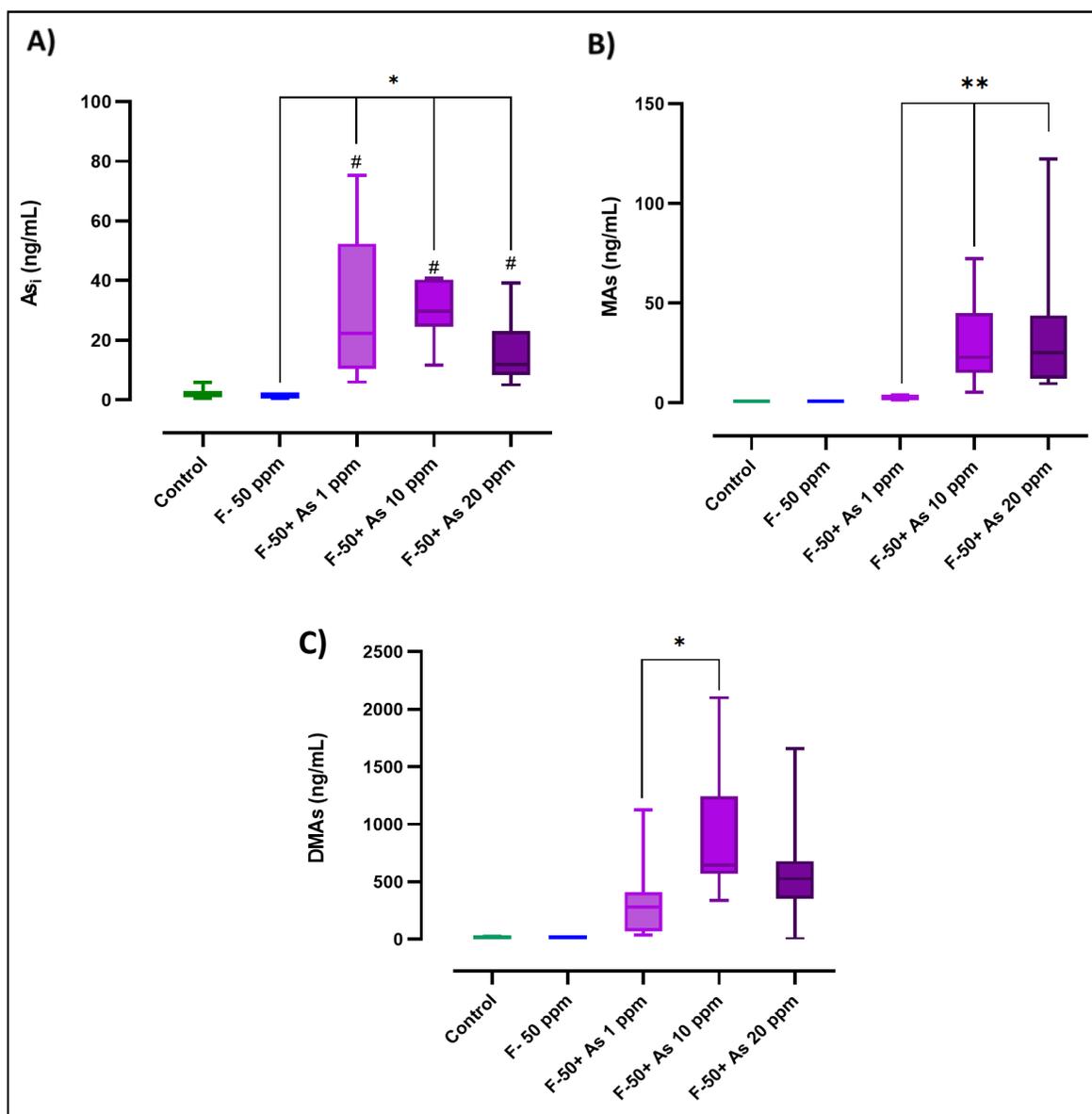


Figura 15. Concentración de especies arsenicales en orina expresadas en ng/mL. A) As_i , B) MAs y C) DMAs Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil (n=6). # $p < 0.05$ respecto al control, * $p < 0.05$, pruebas Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's.

En la figura 16 se representa la sumatoria de las concentraciones urinarias de As_i y sus metabolitos. Como era de esperarse existe una relación dosis -respuesta entre los grupos co-expuestos a As_i, únicamente para dos de las concentraciones: 1 y 10 ppm de As_i; sin embargo, el grupo coexpuesto a 20ppm de As_i no contribuye a la respuesta lineal dependiente de la dosis.

Concentración urinaria de AsT (As_i+MAs+DMAs)

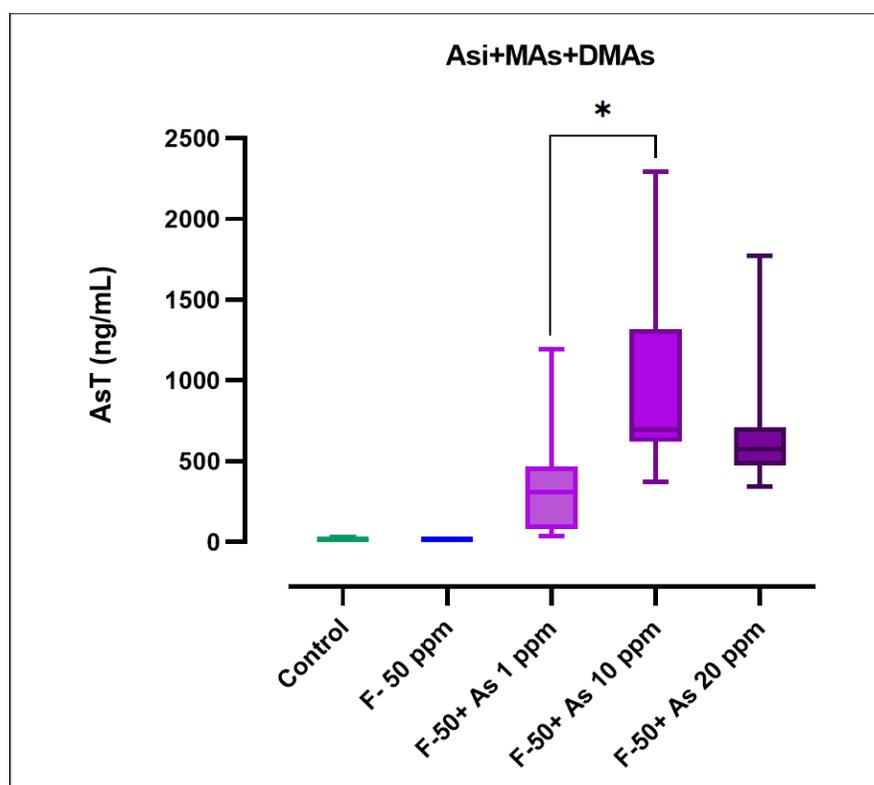


Figura 16. Concentración urinaria de As_i+MAs+DMAs expresada en ng/mL. Los datos representan la mediana ± rango intercuartil (n=6). p>0.05, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's.

6.4.3 Concentración urinaria de arsénico ajustada por creatinina.

Asimismo, se obtuvieron las concentraciones de especies arsenicales ajustadas por la concentración urinaria de creatinina, donde podemos observar concentraciones trazas (18.54 y 8.67 µg/g de creatinina) de As_i en los grupos control y F⁻ 50 ppm (figura 17 A). Mientras que los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de As_i se observa un aumento de la concentración, sin embargo, el aumento no fue significativo.

Respecto a la concentración de MAs (figura 17 B) los grupos control y F⁻ 50 ppm registraron una concentración de 1.66 y 0.95 $\mu\text{g/g}$ de creatinina. En los grupos coexpuestos a las diferentes concentraciones de As_i hubo un aumento gradual del 89% y del 79% en los grupos de As_i 10 y 20 ppm respecto al grupo de As_i 1 ppm. En cuanto a la concentración de DMAs (figura 17 C) se obtuvo una concentración en el grupo control y F⁻ 50 ppm de 120.5 y 69.12 $\mu\text{g/g}$ de creatinina respectivamente. En los grupos coexpuestos como era de esperarse hubo un aumento de DMAs, sin embargo, solo se mostró un incremento significativo del 72% en el grupo coexpuesto de As_i 10 ppm respecto al grupo de As_i 1 ppm.

Concentración de especies arsenicales en orina corregidas por creatinina

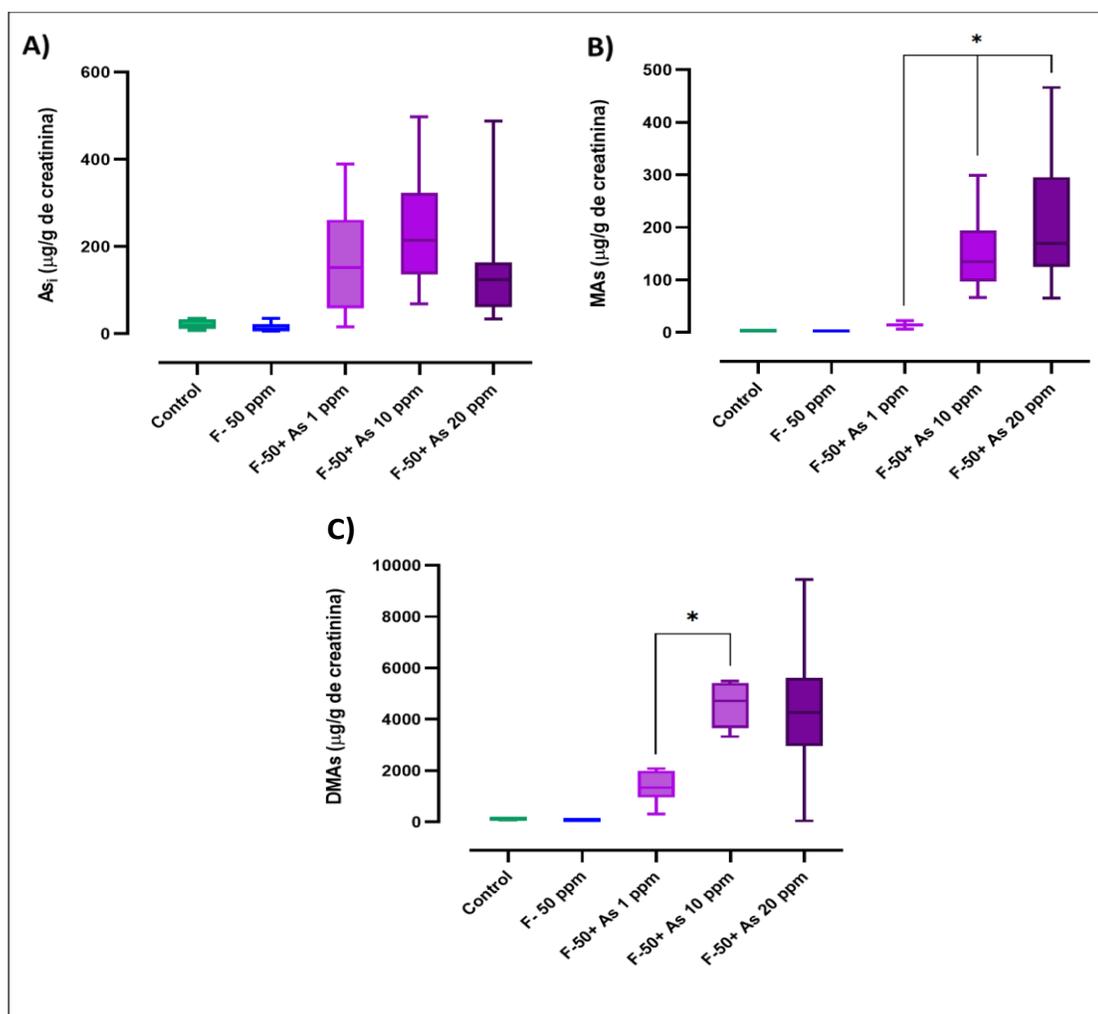


Figura 17. Concentración de especies arsenicales en orina expresadas en $\mu\text{g/g}$ de creatinina. A) As_i, B) MAs y C) DMAs. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil (n=6). * $p < 0.05$, pruebas Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's.

Finalmente se obtuvo la concentración de la sumatoria de las especies arsenicales As_i +MAs+DMAs, a las que también será referida como arsénico total (AsT) expresada en $\mu\text{g/g}$ de creatinina. En la figura 18 se observa como se esperaba un aumento de AsT en los grupos coexpuestos a las diferentes concentraciones de As_i , sin embargo, también se esperaba que la concentración de AsT aumentara de manera lineal conforme aumentara las concentraciones de 1, 10 y 20 ppm de As_i ; sin embargo, en el grupo coexpuesto con As_i 20 ppm, la concentración de AsT no aumentó por lo que se puede inferir que en presencia de F^- no existe una relación dosis respuesta de As a concentraciones altas.

Concentración urinaria de AsT corregida por creatinina (As_i +MAs+DMAs)

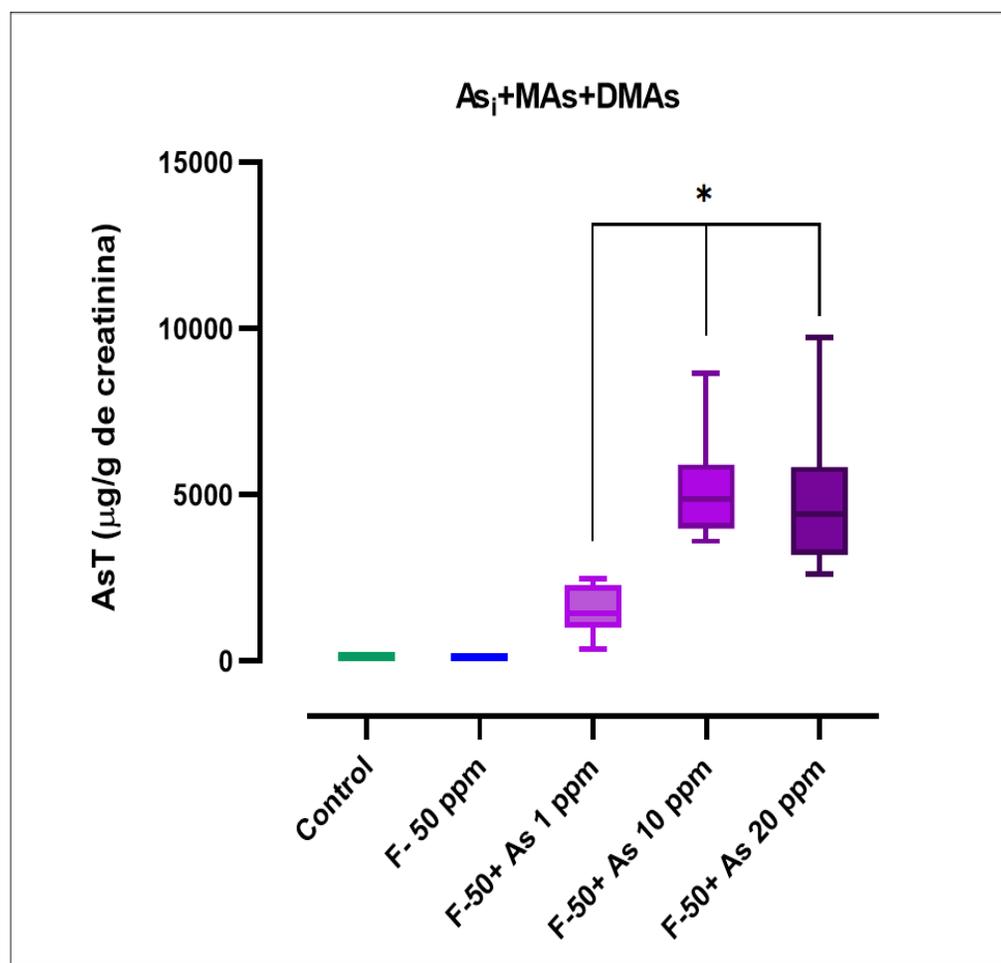


Figura 18. Concentración urinaria de As_i +MAs+ DMAs representados en $\mu\text{g/g}$ de creatinina. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil ($n=6$). $*p<0.05$, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's

6.4.4 Proporción relativa de especies arsenicales en orina.

En cuanto a la proporción relativa de las especies arsenicales en orina en los grupos control y F⁻ 50 ppm se puede observar (figuras 19 A y B) que en ambos grupos se sigue el mismo comportamiento de porcentaje que se esperaba. Se puede observar que existe un mayor porcentaje de especies de DMAs (85%), seguido de As_i (14-45%) y finalmente un menor porcentaje de MAs (1%). Sin embargo, en los grupos coexpuestos a F⁻ y As_i (figuras 19 C, D y E) se puede observar que mientras incrementa la concentración de As aumenta la proporción de MAs, por el contrario, el porcentaje de As_i disminuye a mayor concentración de exposición.

Porcentaje de especies arsenicales en orina

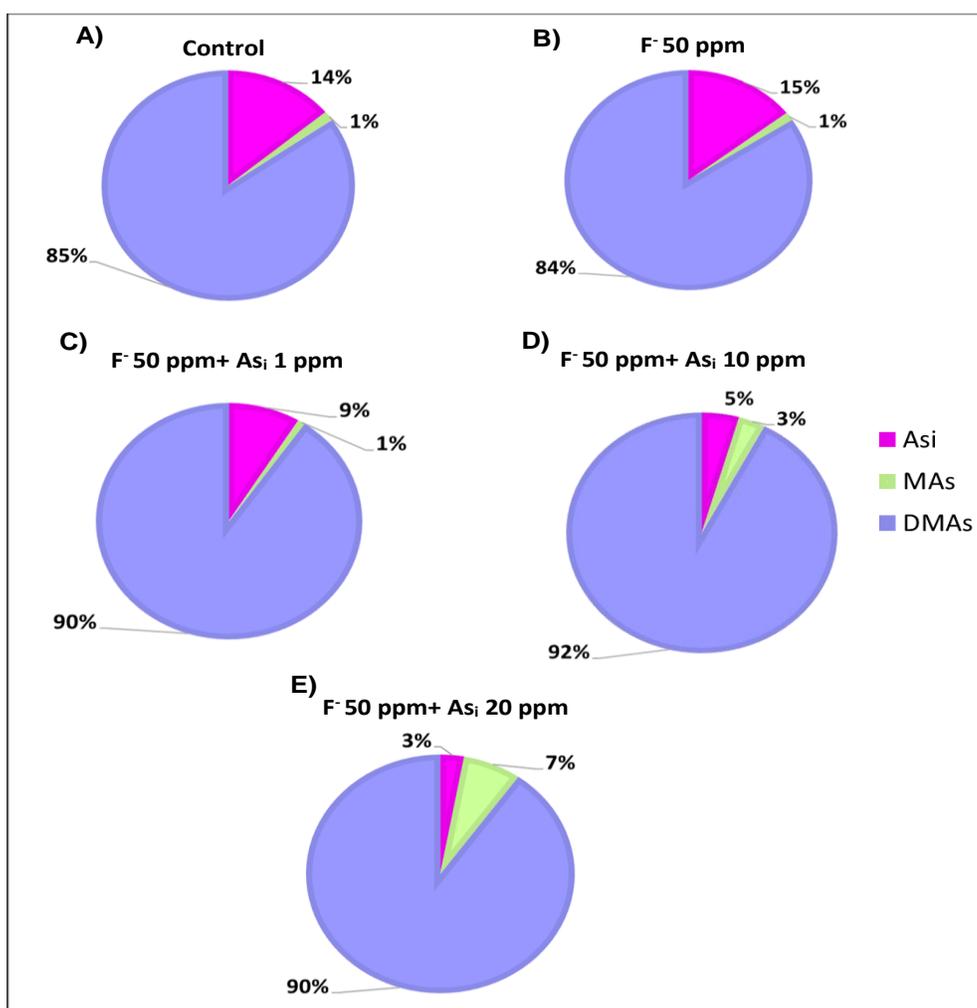


Figura 19. Porcentaje urinario de especies As_i+MAs+DMAs. A) Grupo control, B) F⁻ 50 ppm, C) F⁻ 50 + As_i 1 ppm, D) F⁻ 50 + As_i 10 ppm y E) F⁻ 50 + As_i 20 ppm. Los datos representan la media (n=6).

6.5 Concentración de proteína total en hígado y riñón.

Se han realizado algunos estudios sobre el impacto de la exposición a F^- en la proteína total en diversos órganos, registrando alteraciones en su cantidad (Holland, 1979), por lo cual se decidió evaluar la concentración de proteína tanto en hígado como en riñón. Sin embargo, como podemos observar en las figuras 20 y 21 no encontramos algún cambio en la concentración de proteína total por grupo de tratamiento en ambos órganos.

Concentración de proteína en hígado

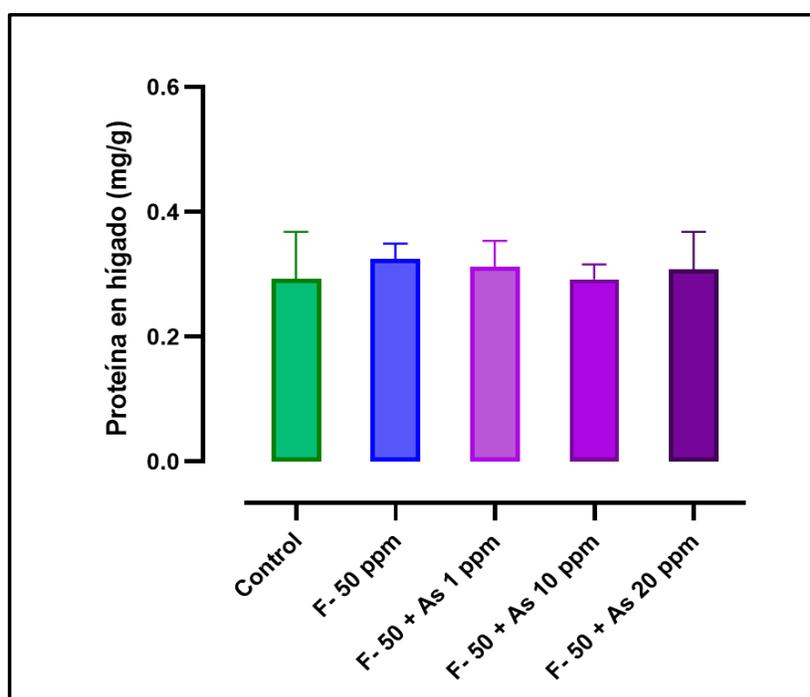


Figura 20. Concentración de proteína en hígado. Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n=8$) $p>0.05$, pruebas de ANOVA de una vía y post hoc Tukey's.

Concentración de proteína en riñón

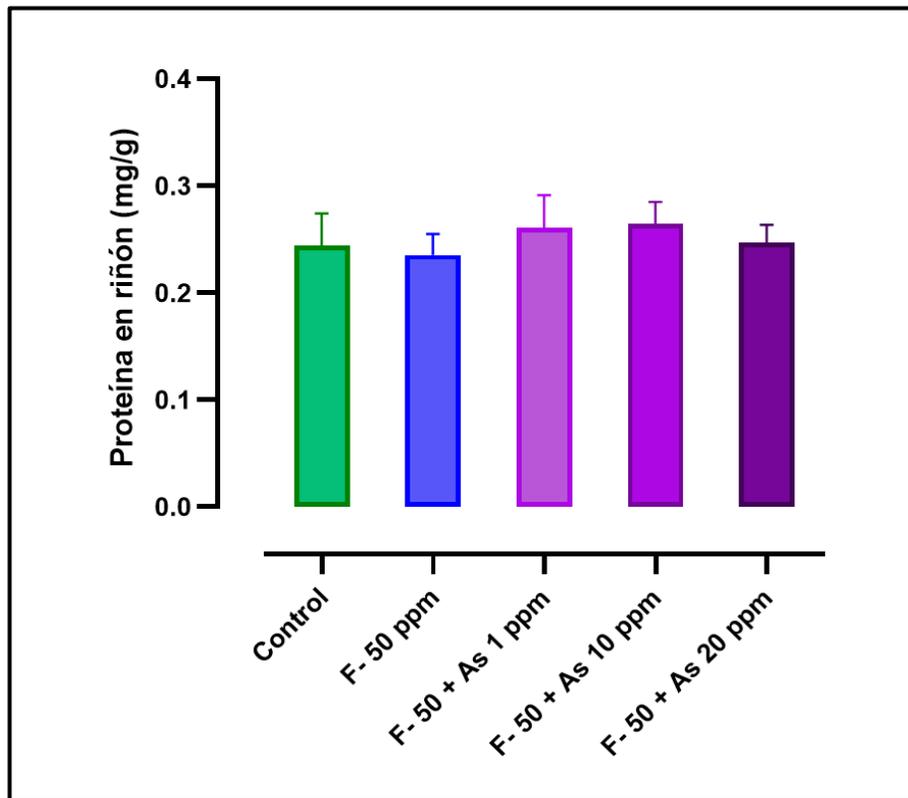


Figura 21. Concentración de proteína en riñón. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=8). $p > 0.05$, pruebas de ANOVA de una vía y post hoc Tukey's.

6.6 Evaluación de daño oxidante mediante TBARs.

El MDA al ser un reconocido marcador de daño oxidante se decidió evaluar en los principales órganos blandos (hígado y riñón) afectados por la exposición solo a F^- y concomitante a diferentes concentraciones de As_i .

6.6.1 Concentración de MDA en tejido renal sin ajustar por concentración de proteína.

En cuanto a las concentraciones de MDA en riñón (figura 22) se puede observar solo un aumento significativo de MDA del 34% en el grupo de F^- 50 ppm respecto al grupo control.

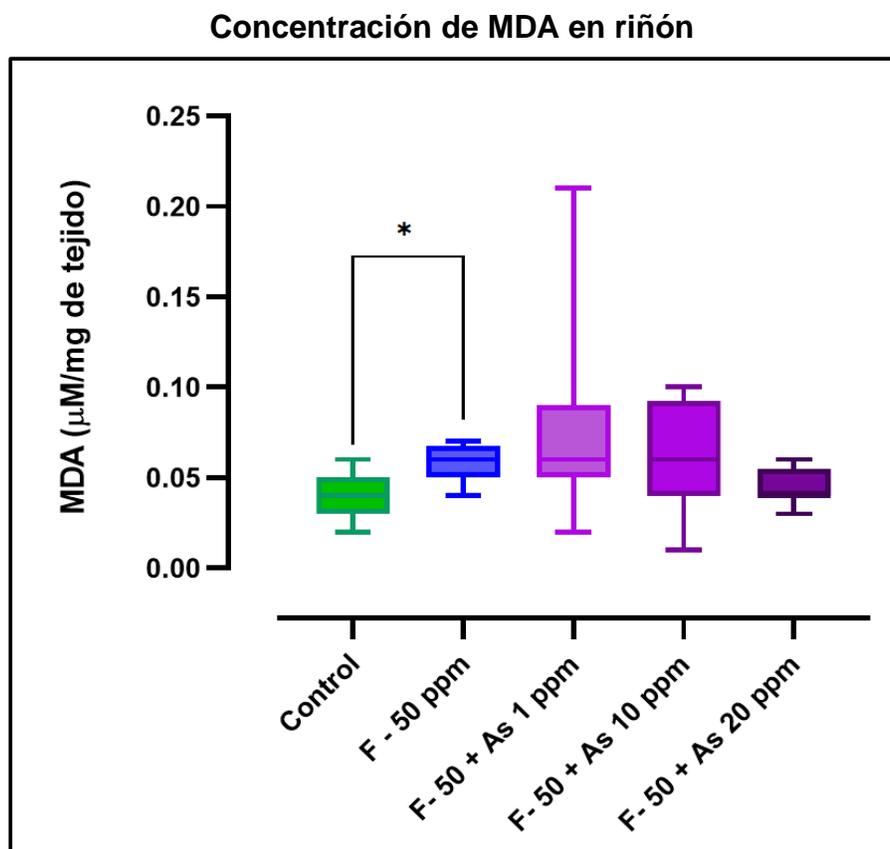


Figura 22. Concentración de malondialdehído (MDA) en riñón presentado por $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tejido. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil ($n=8$). $*p<0.05$, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's.

6.6.2 Concentración de MDA en tejido hepático sin ajustar con la concentración de proteína.

Las concentraciones obtenidas de MDA en tejido hepático se pueden observar en la figura 23, donde encontramos un aumento significativo del 66% en la concentración de MDA entre el grupo coexpuesto a $\text{F}^- 50 + \text{As}_i 10 \text{ ppm}$ y el grupo control. Por el contrario, existe una disminución del 66% de MDA en el grupo coexpuesto a $\text{F}^- 50 + \text{As}_i 20 \text{ ppm}$ respecto al grupo de $\text{F}^- 50 + \text{As}_i 10 \text{ ppm}$.

Concentración de MDA en hígado

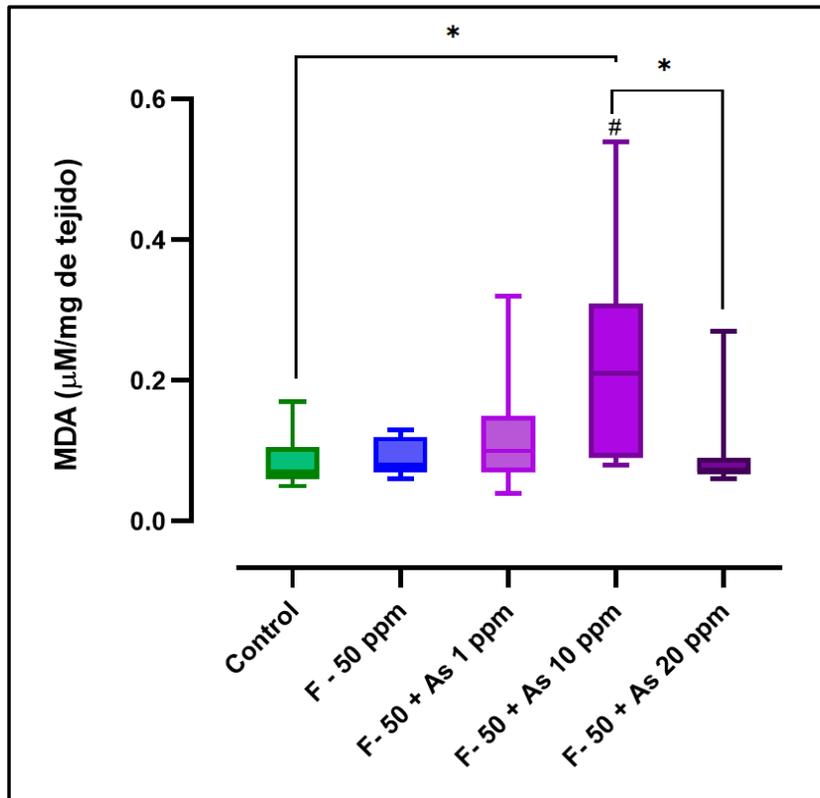


Figura 23. Concentración de MDA en hígado presentado en µM/mg de tejido. Los datos representan la mediana ± rango intercuartil (n=12). *p<0.05, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's y #p<0.05 prueba U-Mann-Whitney respecto al grupo F-50 ppm.

6.6.3 Concentración de MDA en tejido renal ajustada por proteína renal.

La concentración de MDA ajustada por proteína renal (figura 24) se muestra un aumento significativo del 30% respecto al grupo control y el expuesto a F-50 ppm, mientras que entre los grupos de F-50 ppm y el grupo de F-50 + As_i 20 ppm se observa una disminución significativa del 30% de MDA.

Concentración de MDA en riñón

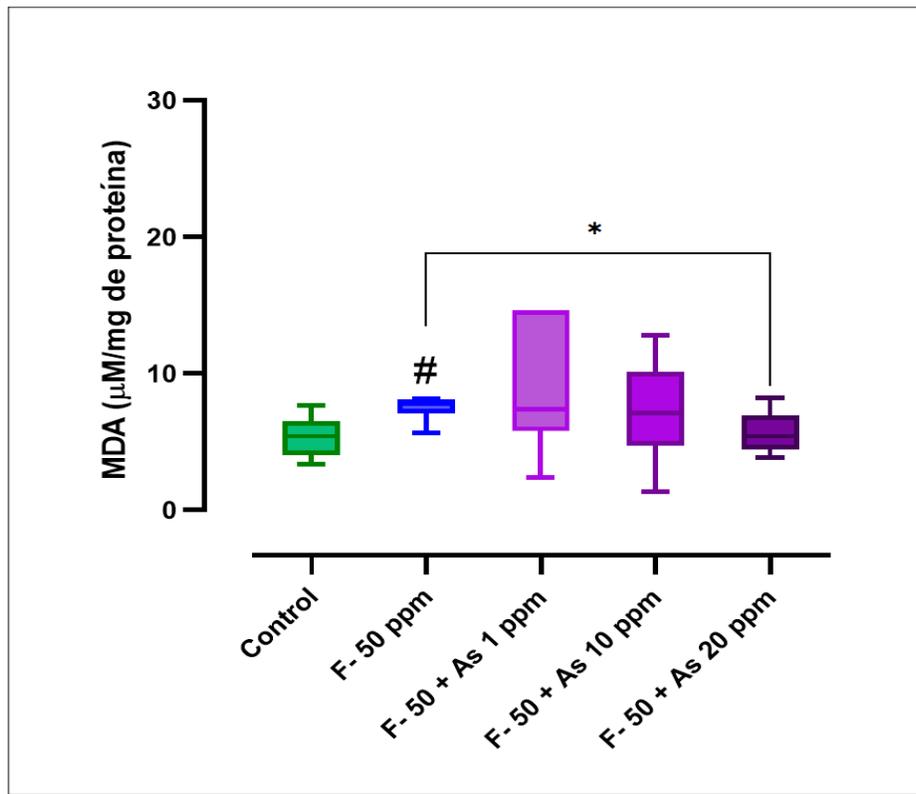


Figura 24. Concentración de MDA en riñón expresado en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. . Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil ($n=8$). # $p<0.05$, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's respecto al control y * $p<0.05$ prueba U-Mann-Whitney.

6.6.4 Concentración de MDA en hígado ajustado por proteína hepática.

Las concentraciones obtenidas de MDA ajustadas por proteína hepática se muestran en la figura 25, donde podemos observar un aumento significativo en la concentración de MDA del 63% entre el grupo F⁻ 50 ppm y el F⁻ 50 + As 10ppm, del mismo modo entre el grupo control y el F⁻ 50 + As 10ppm. Por el contrario, existe una disminución significativa del 66% entre el grupo F⁻ 50 + As_i 20ppm comparado con el grupo F⁻ 50 + As_i 10ppm.

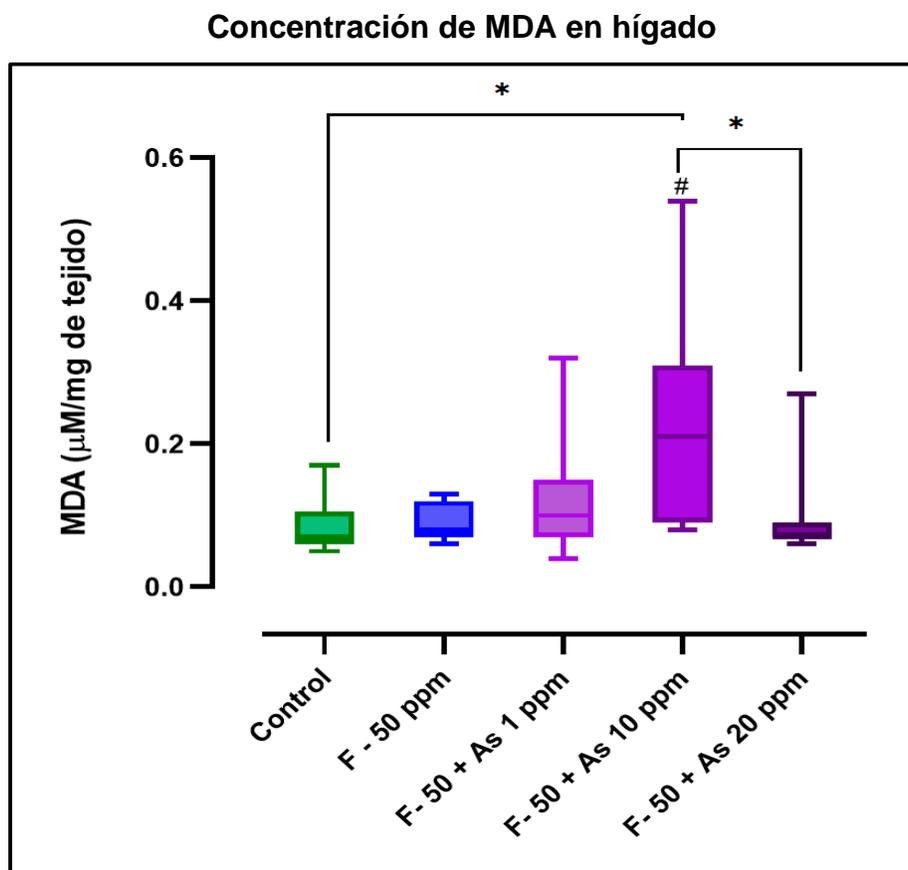


Figura 25. Concentración de MDA en hígado presentado por $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartil ($n=12$). $*p<0.05$, prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's y $\#p<0.05$ prueba U-Mann-Whitney respecto al grupo control.

6.6.5 Correlación entre las concentraciones de MDA y fluoruro en hígado, riñón y orina y la concentración de MDA y arsénico total urinario.

Finalmente se evaluaron las correlación entre las concentraciones de MDA y F^- obtenidas en las muestras de hígado, riñón y orina. En la figura 26 se puede observar una correlación significativa entre las concentraciones de MDA y el F^- en hígado, con un coeficiente de correlación $r_p= 0.9078$, $R^2=.8241$ ($p= 0.0331$), en donde los grupos coexpuestos con $\text{F}^- 50 + \text{As}_i 1 \text{ ppm}$ y $\text{F}^- 50 + \text{As}_i 10\text{ppm}$ que presentan mayor daño oxidante son los que presentan mayor concentración de F^- hepático. Es de llamar la atención que el grupo coexpuesto a $\text{As}_i 20 \text{ ppm}$ no tenga el mismo comportamiento. En cuanto a las correlaciones de MDA y F^- en riñón (figura 27 A) no se observó correlación significativa ($R^2= 0.4498$, $p= 0.2153$), al igual

que las concentraciones de MDA en riñón e hígado y de F⁻ en orina ($R^2= 0.2348$, $p= 0.4081$) y ($R^2= -0.3000$, $p= 0.6833$), respectivamente (figura 27 B y D).

También se obtuvieron las correlaciones entre las concentraciones de MDA obtenido en hígado y riñón y la sumatoria de las especies de As en orina (Asi, MAs y DMAs) las cuales no fueron significativas ($R^2= 0.9000$, $p= 0.0833$ y $R^2= 0.01188$, $p= 0.8615$, respectivamente) (figura 27 C y E).

Correlación entre concentraciones de MDA y F- en hígado

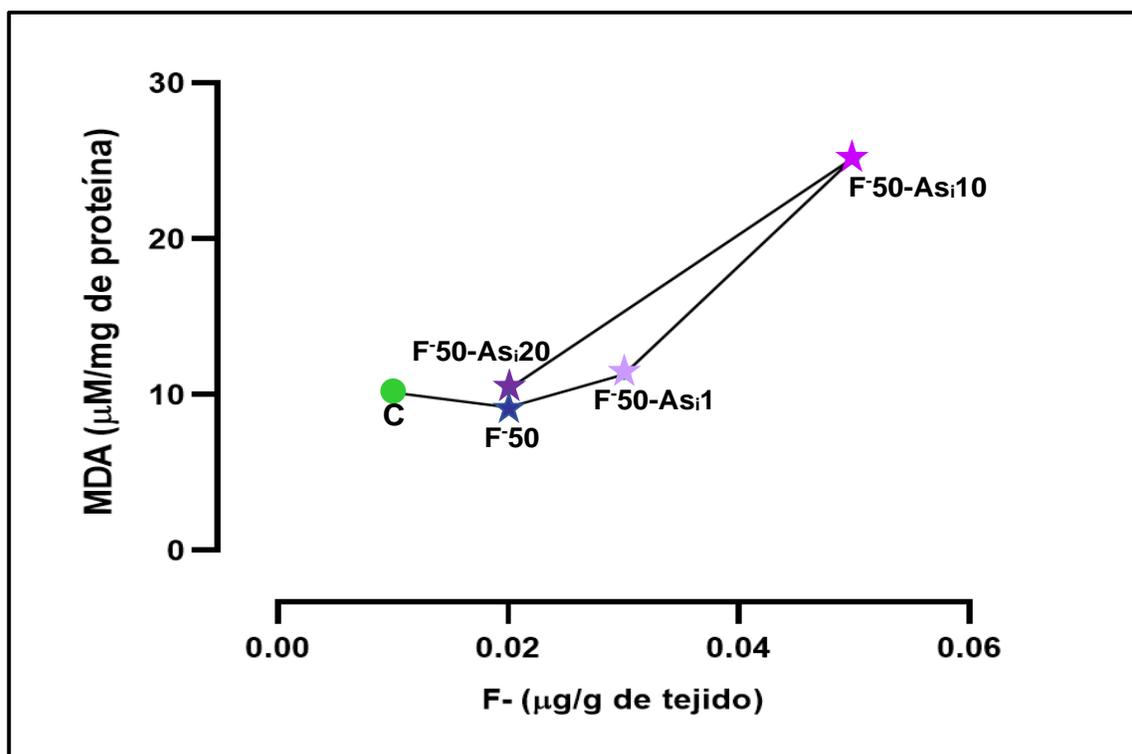


Figura 26. Correlación entre las concentraciones de MDA y F- en hígado. * $p<0.05$, prueba de correlación de Pearson. El símbolo redondo corresponde al grupo control y los símbolos con forma de estrella corresponden los grupos expuestos sólo a F⁻ y a los coexpuestos F⁻ y Asi.

Correlaciones entre las concentraciones de MDA, F⁻ y AsT

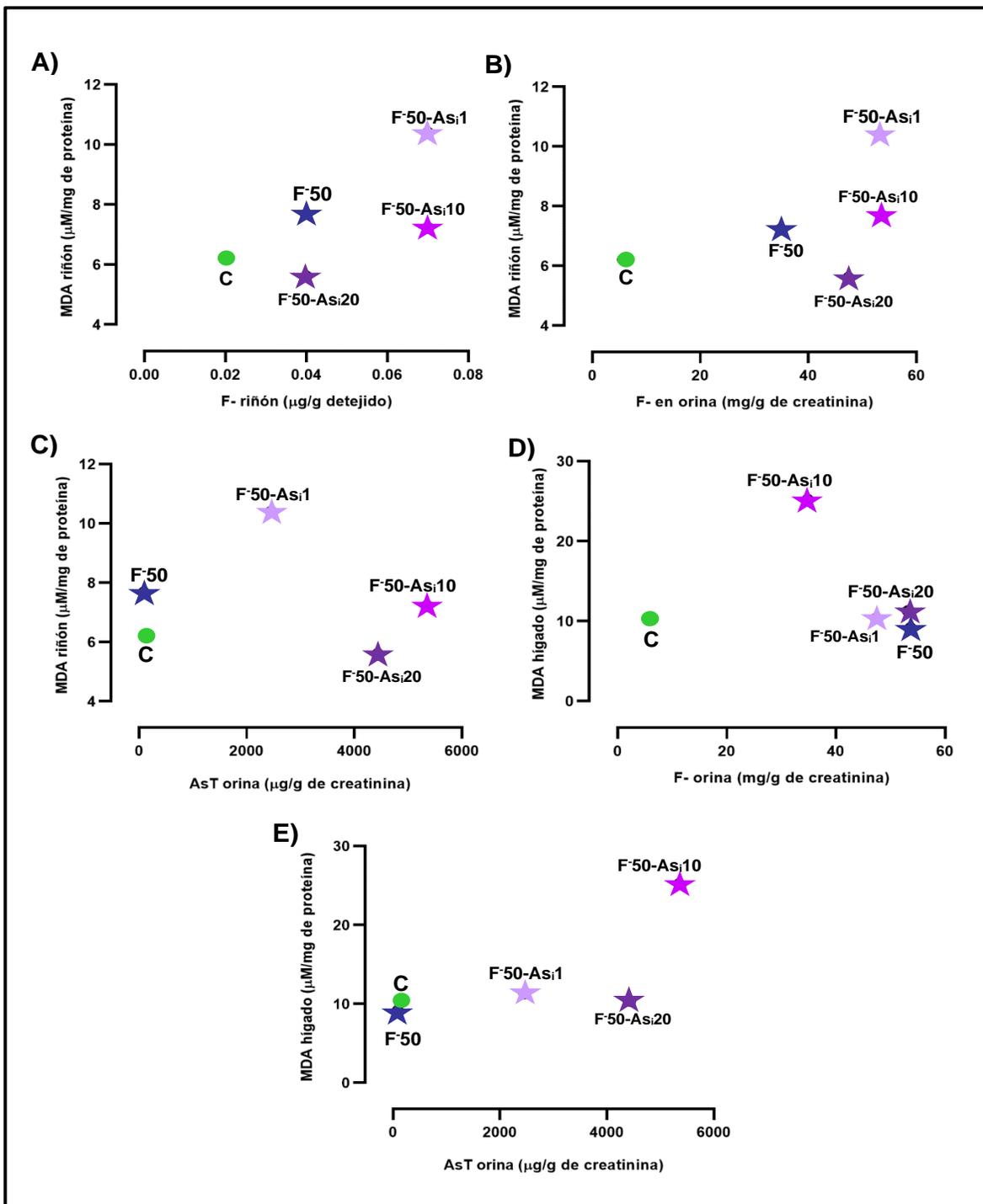
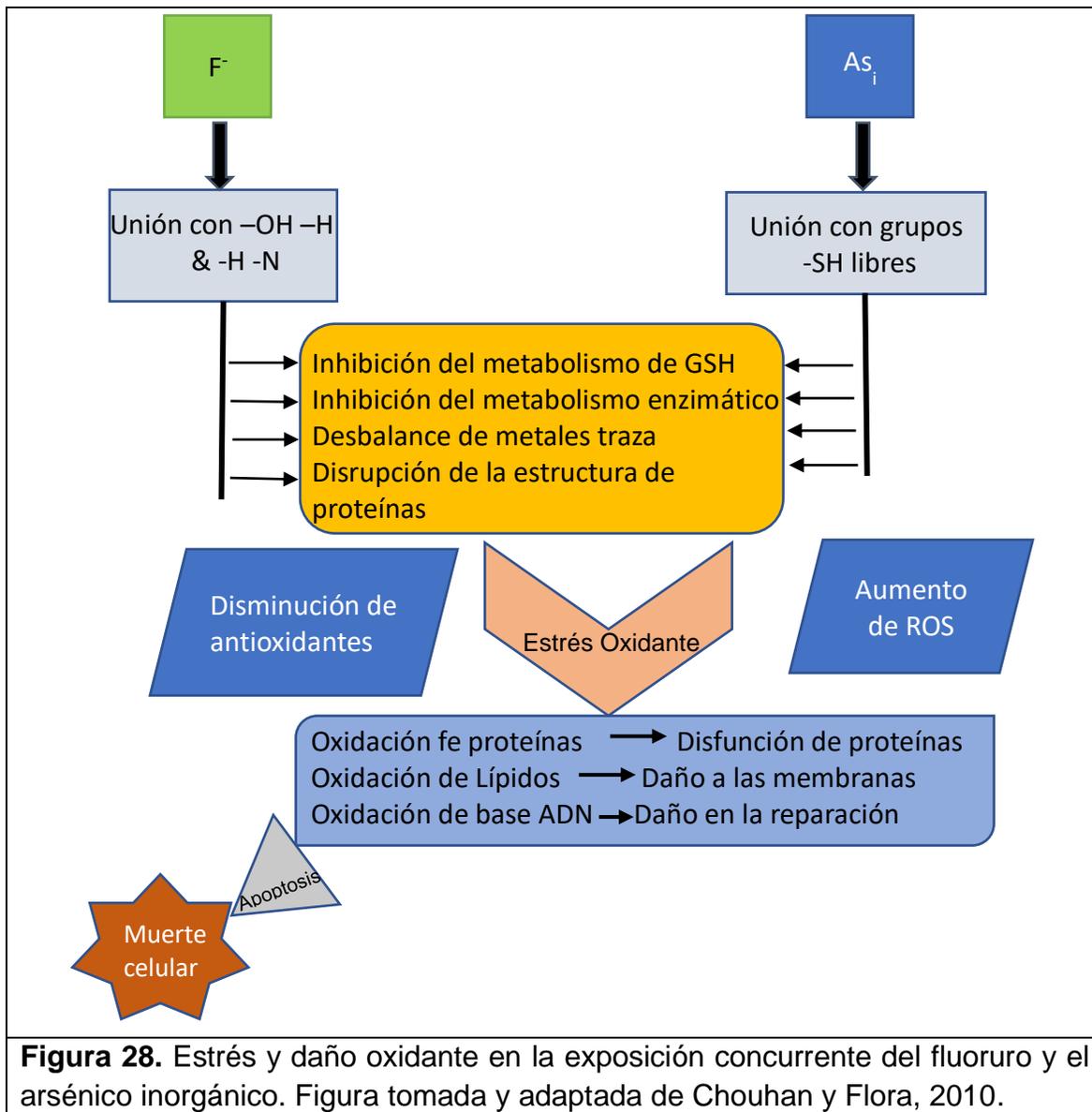


Figura 27. Correlación entre las concentraciones de MDA (hígado y riñón), F⁻ (riñón y orina) y AsT (orina). $p > 0.05$, prueba de correlación de Pearson. El símbolo redondo corresponde al grupo control y los símbolos con forma de estrella corresponden los grupos expuestos sólo a F⁻ y a los coexpuestos F⁻ y As_i.

DISCUSIÓN

La exposición a F^- y As_i mediante el consumo de agua subterránea representa un problema de salud a nivel mundial, ya que millones de personas están expuestas a concentraciones altas de uno o ambos contaminantes. Amini y cols (2008) estimaron que más de 200 millones de personas consumen agua con concentraciones de F^- mayores de 1.5 mg/L, en lugares como India, China, Tanzania, México, Argentina, Sudáfrica, entre otros. Por otra parte, se ha estimado que de 94 a 220 millones de personas están potencialmente expuestas a concentraciones altas de As_i , la mayoría en Asia (Podgorski y Berg, 2020). Sin embargo, existen algunas áreas en América como Argentina, México y Estados Unidos que también consumen agua contaminada con As_i . En algunas regiones de Asia y de Latinoamérica como Argentina y México también se ha documentado la co-exposición de F^- y As_i (Buchhamer y cols., 2012; Alarcón-Herrera y cols., 2020). Para el caso de México se ha estimado que al menos 20 millones de personas están expuestos a F^- y 6 millones a As_i y en el 54% de los casos existe la exposición concurrente a ambos contaminantes (Limón-Pacheco y cols., 2018).

La mayoría de los estudios que han abordado la problemática de exposición a través del agua subterránea, lo han realizado enfocados en la exposición a uno solo de los contaminantes, por lo que el estudio de alguna posible interacción entre el F^- y el As_i es de reciente interés. Al respecto, se han realizado varios abordajes experimentales donde se han evaluado algunos efectos, principalmente asociados a la generación del estrés y daño oxidante (figura 27); sin embargo, los resultados obtenidos son controversiales y sin una conclusión en común (Mondal y Chattopadhyay, 2020; Saeed y cols., 2021). Sin duda, la magnitud de exposición evaluada por concentración y tiempo de exposición tiene un papel importante en los efectos observados, por ejemplo, en los estudios *in vitro* a concentraciones no citotóxicas donde la relación de $F^-:As_i$ siempre fue mayor la concentración de F^- en un intervalo de 5-50 veces, se observaron tanto efectos antagónicos como sinérgicos (tabla 1).



Respecto a los estudios *in vivo*, los efectos también son controversiales, la mayoría se han realizado en roedores, y en este caso la relación $F^-:As_i$ fue de 1-2, es decir igual o un poco mayor la concentración de F^- respecto a la de As_i (tabla 2). Este hecho puede representar un error en la estrategia experimental ya que el F^- es mucho más abundante en el medio ambiente, encontrándose a concentraciones a nivel de ppm (mg/L o mg/kg), mientras que el As_i generalmente se encuentra en ppb ($\mu\text{g/L}$ o $\mu\text{g/kg}$). En muestras de agua de lugares con agua contaminada se encuentra en una relación $F^-:As_i$ de 25-50, mientras que en muestras urinarias de personas que consumen el agua contaminada la relación $F^-:As_i$ es de 25-30 (González-Horta

y cols., 2015). En un estudio reciente donde se expuso al pez cebra a través del agua del acuario a concentraciones de 15 mgF/L y 0.050 mgAs/L (relación F⁻:As_i de 300) se observaron menores efectos de estrés y daño oxidante en la co-exposición comparado con la exposición individual a un solo contaminante (Mondal y cols., 2021). En los estudios realizados tanto *in vitro* como en modelos de animales expuestos donde se ha evaluado la posible interacción entre F⁻ y As_i, no se ha evaluado si la dosimetría de alguno de los contaminantes se modifica en presencia del otro.

7.1 Ratón hembra C57BL/6 como modelo experimental en la evaluación de la posible interacción biológica de fluoruro y arsénico inorgánico.

Como modelo experimental se eligió al ratón de la cepa C57BL/6, ya que se caracteriza por ser sensible a los efectos de la exposición a F⁻ además de ser un buen modelo ante la exposición y efectos metabólicos de la exposición al As_i (Hughes y cols, 1999; Drobna y cols.2009; Li y cols., 2017). La rata representa un buen modelo para estudiar la exposición a F⁻, sin embargo, no lo es para el estudio de la exposición al As_i, ya que la hemoglobina de la rata presenta mayor número de -SH comparativamente con otras especies ocasionando que los arsenicales se retengan más y por mayor tiempo en la sangre. Los compuestos arsenicales tienen mayor afinidad a la hemoglobina, debido a que en cada de sus cadenas alfa contiene tres cisteínas a diferencia de la hemoglobina de los humanos que sólo contiene una cisteína, teniendo una unión preferencial para la retención del As y como resultado la modificación en su distribución en los diferentes órganos (Cohen y cols., 2006; Shen y cols., 2013).

Desde la década de 1960, el estudio en ratones macho era absolutamente la norma a menos que se estuviera estudiando reproducción, así que de manera general se confía en los roedores machos para los estudios y que muchos temen el factor que complica las hormonas femeninas. Actualmente, se recomienda considerar a ambos sexos en la experimentación; se ha reconocido que el factor sexo de un individuo juega un papel muy importante en la susceptibilidad, tratamiento y secuelas de las enfermedades (Lee, 2018), cuando no se tiene esta posibilidad y se trabaja con un

solo sexo, en la mayoría de los estudios se ha evitado trabajar con hembras ya que está bien documentado que las hormonas ováricas en ratones hembras fluctúan en el transcurso de un ciclo de cuatro a cinco días. Sin embargo, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica recomendó la inclusión del sexo como una variable biológica en los proyectos de investigación (NIH, 2015), pocos son los estudios que evalúan los efectos de la exposición a contaminantes ambientales en hembras, por lo que se recomienda la experimentación en animales hembra.

La mayoría de los ratones utilizados en experimentos de laboratorio se alojan en grupos y en el caso de los ratones macho forman una estructura jerárquica donde los machos dominantes pueden tener hasta cinco veces más testosterona circulando en sus sistemas que los ratones subordinados por lo que los ratones macho también pueden tener disparidades hormonales (McPhie-Lalmansingh y cols., 2008). Además, los machos en su dominio orinan la camada para marcar su territorio y presentan mayor variabilidad en el volumen de orina colectado; por esta razón y porque hay mayor disponibilidad de animales hembras dado que en la mayoría de los estudios se da preferencia al estudio de animales macho, en el presente estudio se trabajó con ratones hembras. Al final de estudio, con apoyo de miembros del laboratorio 29 del Departamento de Toxicología a cargo de la Dra. Hernández-Ochoa se evaluó el ciclo estral de los ratones hembra, mediante frotis vaginal, encontrando que en su gran mayoría se encontraban con el mismo ciclo ya que del 90 al 93 % estuvieron en estro y del 5 al 9% en diestro.

Existen varios estudios que han documentado investigaciones de toxicocinética de arsenicales con ratones hembra (Kenyon y cols., 2005; Hughes y cols., 2008; Drobna y cols., 2009). Se ha identificado que el metabolismo, de As_i es similar entre machos y hembras; sin embargo, la distribución, y depuración del As_i en ratones C57BL6 fue menor en las hembras (Drobna y cols., 2009).

Para la experimentación con F^- la mayoría de los estudios en ratones C57BL6 se ha realizado en machos. No se encontró información disponible sobre el dimorfismo sexual en la toxicocinética del F^- en animales de experimentación.

7.2 Relación de las concentraciones de exposición a fluoruro y arsénico inorgánico.

Se ha informado que existen diferencias en la toxicocinética del F⁻ entre humanos y roedores. En estos últimos el F⁻ se distribuye y depura 10 veces más rápido y los efectos son menos tóxicos (Dunipace y cols., 1995; Dionizio y cols. 2018). Debido a lo anterior en nuestro trabajo se expusieron a los ratones a concentraciones de 50 ppm mediante el agua de bebida y considerando que la ingesta diaria de agua con esta concentración equivaldría a concentraciones de 5 ppm, buscando que los roedores estén expuestos a una concentración que se puede encontrar naturalmente en el agua contaminada con F⁻ (Molina Frechero y cols., 2013).

Respecto a las concentraciones de As_i utilizadas: 1, 10 y 20 ppm se consideró que los roedores de igual forma que el F⁻ depuran más eficientemente el As_i que los humanos, haciéndolos menos susceptibles (Koller y cols., 2020). Con estas concentraciones se intentó simular las concentraciones de As_i encontradas en poblaciones endémicas de 0.2, 2 y 4 ppm. Existen muchas regiones con concentraciones de As_i en el agua de 0.2 ppm, muy pocos lugares han reportado concentraciones tan altas como las de 2 ppm y de forma excepcional concentración de hasta 5 ppm (Del Razo y cols., 2021).

La relación F⁻:As_i empleada en los tres grupos coexpuestos fue de 50 veces (50: 1); 5 veces(50:10) y 2.5 veces (50:20).

7.3 Evaluación general del estado de salud de los ratones.

No se observaron en general signos de toxicidad en las 60 ratonas durante la duración del estudio. La ganancia del peso corporal no se afectó por la exposición a F⁻ solo ni en coexposición con As, ya que se observó un aumento gradual a través de los 30 días de tratamiento. Se estimó un aumento de peso entre 3.87 y 4.9 gramos durante el estudio. Resultados similares fueron obtenidos por Yao y cols., (2019) en ratones expuestos a 50 ppm de F⁻ así como Zou y cols., (2019), donde expusieron a ratonas C57BL/6 con agua conteniendo 20 ppm de As_i, observando en ambos trabajos un aumento gradual del peso a través del periodo de exposición, además de no observar algún signo de toxicidad.

El consumo diario promedio de agua en los grupos expuestos durante los 30 días de exposición fue similar al grupo control; Sin embargo, se observó una disminución significativa entre el grupo coexpuesto de F⁻ 50 + As_i 1 ppm y el grupo F⁻ 50 + As_i 20 ppm, (4 vs 3.36 mL).

7.4 Distribución de fluoruro en hueso en presencia de arsénico inorgánico.

Debido a que el F⁻ tiene fuerte afinidad ósea y se acumula en tejidos calcificados como dientes y huesos en un 99%, conduciendo a fluorosis esquelética dando como resultado deformaciones óseas y osteoporosis (Buzalaf y Whitford, 2011; Solanki y cols., 2022), uno de nuestros objetivos fue evaluar la distribución del F⁻ en la coexposición con As_i. El resultado más robusto de la presente investigación está relacionado con la concentración de F⁻ en hueso, la exposición concomitante en concentraciones de As de 10 y 20 ppm, la concentración de F⁻ en hueso disminuyó significativamente, en comparación al grupo expuesto únicamente con F⁻ 50 ppm, 213.9 y 210.5 vs 265.3 µg/g; la disminución de la concentración de F⁻ fue notable, de casi 55 ppm (figura 10).

La concentración ósea de F⁻ en el presente estudio fue casi 10 veces menor a la concentración de F⁻ en el hueso de ratones C57BL/6 expuestos a 50 ppm durante 3 meses (2,254.4 ppm, Yao y cols., 2019), esta diferencia puede ser explicada por el tiempo de exposición, ya que en el estudio actual los ratones fueron expuestos a F⁻ durante 1 mes y el hueso tiene una gran capacidad de acumular F⁻.

Se ha demostrado que el F⁻ interfiere con la formación de colágeno en los osteoblastos, lo que afecta los procesos de formación y reparación del hueso, ya que este funciona como el marco para el depósito del Ca²⁺ y fosforo (Yiamouyiannis, 1986; Lu y cols., 2019; Zhao y cols., 2022), lo que puede contribuir a la disminución de la densidad mineral ósea. También se ha descrito la acumulación de As en el hueso ya que reemplaza al fósforo y con ello puede distribuirse en la matriz ósea (Wu y cols., 2014; Liu y cols., 2019;). La acumulación de As en el hueso puede afectar la reabsorción y remodelación ósea al promover la diferenciación de osteoclastos y disminuir la cantidad de osteoblastos; además, se ha demostrado que en ratones Nrf2- KO se agrava la pérdida ósea debido a la osteoclastogénesis elevada (Liu y cols., 2019). En un estudio en ratas expuestas durante 45 días a concentraciones

moderadas de As_i en el agua de bebida (10 ppm), se identificó la alteración de la osificación endocondral con un aumento en el volumen del hueso esponjoso primario (Aybar Odstroil y cols., 2010).

Ya se ha evaluado la posible interacción de $F^-:As_i$ en tejido óseo, en un estudio realizado en habitantes de China expuestos a F^- y As_i a través de la quema de carbón, se identificó la interacción de F^- y As_i por medio de la expresión del factor de transcripción AP1 involucrado en la toxicidad ósea inducida por la exposición a F^- concluyendo que la exposición a As_i puede influir en la toxicidad relacionada a la exposición a F^- (Zeng y cols., 2014). Recientemente, en otro estudio, en la coexposición $F^-:As_i$, el As_i antagonizó el efecto promotor de F^- sobre la expresión del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6) y la expresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B). TRAF-6 juega un papel importante en la transmisión de señales intracelulares y está estrechamente relacionado con el metabolismo óseo mientras que NF- κ B está involucrado en la actividad de diferenciación, maduración y reabsorción ósea de los osteoclastos. Los autores del estudio concluyen que existe una interacción del F^- y el As_i donde As_i podría regular inicialmente las señales y participar después en la diferenciación de los osteoclastos (Nie y cols., (2003). En esta investigación, la densidad de masa ósea disminuyó con el aumento de la exposición de F^- . Sin embargo, no hubo correlación entre las concentraciones de exposición a As_i y la densidad de masa ósea y tampoco hubo cambios patológicos significativos en el hueso, lo que sugiere que la exposición a As_i no afectó la densidad ósea. Es posible que, en la coexposición al As_i puede existir una competencia entre los arsenicales pentavalentes y el F^- por su distribución en el tejido óseo y explicar la disminución en la distribución del el F^- en el hueso en presencia de la concentración de As_i .

Por otra parte, también existe la posibilidad de que la absorción de F^- pueda verse disminuida en presencia de As_i y de esta manera explicar la disminución en la concentración ósea de F^- en la co-exposición con As_i . Esta posibilidad será discutida más adelante.

7.5 a Distribución de fluoruro en riñón e hígado en presencia de arsénico inorgánico.

El riñón es el órgano blando que acumula mayores cantidades de F^- , por lo cual la exposición a concentraciones altas de F^- se ha relacionado a daño renal y problemas de salud, debido a que se ha determinado en riñones humanos concentraciones de hasta 50 veces a la concentración del plasma (Dharmaratne, 2019). Por lo tanto, en el presente estudio uno de los objetivos fue estudiar como la exposición a diferentes concentraciones de As_i podría afectar la distribución del F^- en el principal órgano blando.

Las concentraciones de F^- en el tejido renal fueron significativamente menores a las encontradas en el tejido óseo (0.03 vs 265.3 ppm). Interesantemente en nuestros resultados se puede apreciar un aumento significativo en la concentración de F^- del 44 y 46% en los grupos coexpuestos con As_i 1 ppm y 10 ppm, pero sin cambio en el grupo coexpuesto a As_i 20 ppm (figura 11), respecto al grupo expuesto únicamente a F^- 50 ppm. En contraste, Mittal y cols., (2018), observaron que en ratas Wistar expuestas a As_i 50 ppm + F^- 50 ppm hubo una disminución estadísticamente significativa en la concentración de F^- en comparación del grupo expuesto únicamente a F^- 50 ppm. Esta diferencia puede deberse a la concentración alta de As_i empleada en la investigación de Mittal y cols., (2018).

La exposición a As_i contribuye a la distribución del As_i y sus metabolitos en diferentes órganos, las formas trivalentes se distribuyen preferencialmente en tejidos con concentración alta de grupos SH, mientras que las formas pentavalentes en tejidos con concentración alta de fosfatos. Las especies arsenicales, al ser eliminadas mayormente por la orina, se pueden distribuir en los riñones, predominantemente en la corteza renal. Interesantemente, se ha informado que al distribuirse en el riñón puede afectar la distribución de diferentes elementos como el cobre, el silicio y el potasio (Rubatto y cols., 2010; Shakoore y cols., 2017; Bongiovanni y cols., 2019;). Desafortunadamente, en el presente trabajo no se tuvo la oportunidad de cuantificar las concentraciones de As en el tejido renal ni en el hepático. Sin embargo, recientemente Sánchez Peña y cols., (manuscrito en preparación) observaron que las concentraciones de $As_i+MAs+DMAs$ en tejidos fue

mayor en vejiga>pulmón>hígado>riñón en ratones hembra C57BL/6 expuestos a 1 ppm de As_i a través del agua de consumo. En este mismo estudio, cuando las ratonas fueron coexpuestas a As_i 1 ppm + F^- 50 ppm, las concentraciones de arsenicales disminuyeron significativamente en los 4 tejidos evaluados. Además, en el grupo que también estuvo coexpuesto a F^- se observó una alteración del patrón de metilación de As_i distribuido en la vejiga, que fue el tejido con mayor concentración de AsT .

Por otra parte, se reconoce que la exposición a F^- está relacionada en la inhibición de la actividad de la enzima $ATPasa Na^+/ K^+$; esta inhibición puede alterar vías biológicas que responden a la alteración de la expresión de genes y la actividad de enzimas glucolíticas, metaloenzimas, hormonas, proteínas, neuropéptidos y citocinas, así como interacciones biológicas que dependen de la biodisponibilidad de magnesio y manganeso con ello cambios en la excreción de iones (Waugh, 2019).

A pesar de que se ha reportado la distribución de F^- en órganos blandos como el riñón y el hígado, sus concentraciones son relativamente bajas y el método de cuantificación de F^- desde el punto de vista analítico la voltimetría con electrodo de ion selectivo no es un método tan sensible, de manera que no fue posible identificar un aumento significativo de la concentración renal de F^- en el grupo expuesto a F^- a 50 ppm, comparativo con el grupo control (figura 11). No obstante, es claro el aumento de la concentración de F^- en los grupos coexpuestos a As_i a 1 y 10 ppm. En el caso del tejido hepático las concentraciones de F^- fueron similares a las cuantificadas en el tejido renal, y fueron significativamente mayores al grupo control en los grupos expuestos a F^- 50 ppm y en los coexpuestos a As_i 1 y 10 ppm (figura 12). En el tejido hepático no se observó una modificación significativa en las concentraciones de F^- en función de la coexposición con As_i . Como se comentó previamente, en el estudio de Sánchez Peña (en preparación) se identificó la disminución de la concentración de AsT en el tejido coexpuesto a As_i 1 ppm + F^- 50 ppm, al compararlo con el grupo que solo fue expuesto a As_i . De la misma manera que en el tejido renal, también en el tejido hepático se reportó la disminución de la concentración de F^- en ratas coexpuestas a F^- 50 ppm + As_i 50 ppm (Mittal y cols.,

2018). Los resultados pueden depender de la estequiometría a de $F^-:As_i$ (1:1) empleada en estudio de Mittal y cols.,(2018), ya que como se mencionó anteriormente la relación estequiométrica de la coexposición $F^-:As_i$ puede explicar la diferencia en los resultados.

La disposición de F^- en presencia de As_i fue diferente entre el tejido óseo, considerado el reservorio de mayor acumulación de F^- , con poco recambio tisular, comparativamente con los tejidos renal y hepático donde las concentraciones de F^- son mucho menores y existe mayor recambio tisular. La concentración ósea de F^- disminuyó significativamente en la coexposición $F^-:As_i$ dependiente de la concentración de As_i , mientras que en el tejido renal aumentó de forma dosis dependiente únicamente en las concentraciones de As_i 1 y 10 ppm; mientras que en el tejido hepático no se observaron cambios significativos en los grupos coexpuestos.

Debido a lo anterior posiblemente el aumento de la concentración de F^- en el riñón se deba a que el As al modificar las concentraciones de K^+ en el tejido, el F^- puede tener una mayor interacción este y como resultado una mayor acumulación en riñón, esto además confirmaría la disminución en la excreción de F^- observada en nuestros resultados.

7.6 Concentración de fluoruro en orina en presencia de arsénico inorgánico.

Se conoce que el 60% del F^- absorbido se excreta principalmente por el sistema urinario, por lo tanto, la orina es un excelente biomarcador de la exposición a F^- , refleja la carga de la concentración existente en el agua de bebida contaminada (Buzalaf y Whitford, 2011; Ding y cols., 2011).

No se observaron cambios significantes en los resultados urinarios al comparar las concentraciones de F^- expresadas en unidad de volumen ($\mu g/mL$ o mg/L) con las ajustadas con la concentración urinaria de creatinina. Las concentraciones urinarias de F^- son altas, así que desde el punto de vista analítico es fácilmente distinguir las concentraciones de F^- urinarias entre los grupos donde se destaca la gran disminución de F^- (~ 25 ppm) en el grupo coexpuesto con As_i 10ppm, respecto al grupo expuesto únicamente a F^- 50 ppm (figuras 13 y 14). De acuerdo con las concentraciones de F^- obtenidos en hueso (~250 ppm) y en riñón e hígado (~0.025-

0.06 ppm), las concentraciones de F^- en orina (~85 ppm); se infiere que después de 30 días de exposición las concentraciones urinarias de F^- representan la magnitud de exposición en estado estacionario y refleja la concentración del organismo. Con esto en mente se puede considerar que existe una interferencia entre la exposición $F^-:As_i$ que repercute en la disminución de la concentración interna de F^- , particularmente cuando la concentración de F^- fue 5 veces mayor a la de As_i . En particular, el riñón al ser el principal ruta de eliminación para el F^- y As , se ha reportado para ambos que se acumulan principalmente en la zona peri glomerular y mitocondrias del riñón (Abhyankar y cols., 2012; Dharmaratne, 2019). Al coincidir en estas zonas es posible que exista una interacción entre ambos elementos y el As al modificar la distribución y aumento de la concentración de K^+ , puede dar como resultado una afección a la función renal (Rubatto y cols., 2010) y por lo tanto una disminución en la excreción de F^- .

7.7 Concentración de arsenicales en orina en presencia de fluoruro.

La presente investigación estuvo orientada a evaluar si las concentraciones de F^- podrían modificarse en presencia de As_i , por lo que no se expusieron a ratonas únicamente a As_i , lo que hubiera implicado adicionar al diseño experimental 3 grupos más a los 5 que se estudiaron; sin embargo, se tuvo la oportunidad de evaluar las concentraciones de especies de As en las muestras urinarias de los 5 grupos experimentales estudiados, para el caso de los arsenicales, la variación de las determinaciones fue menor cuando las concentraciones fueron expresadas en $\mu g/g$ de creatinina (figuras 17 y 18). Un resultado inesperado fue que únicamente se observó una relación lineal positiva en las concentraciones urinarias de los grupos coexpuestos a As_i 1 y 10 ppm, pero no para el grupo de 20 ppm, lo que obliga a suponer un comportamiento atípico en el grupo coexpuesto a la más alta concentración de As_i ; al no tener un grupo experimental expuesto únicamente a As_i 20 ppm, no se puede identificar si hubo una menor concentración interna por la presencia de F^- . Además, los resultados obtenidos en las concentraciones de F^- en riñón y en orina en el grupo coexpuesto con As_i 20ppm no fueron en el mismo sentido a los observados con la coexposición a As_i 10ppm, lo que abre la posibilidad de que en la relación $F^-:As_i$ 50:20 la exposición interna a As haya sido menor.

Con relación al patrón de metilación de As_i , evaluado a través de la orina, se observó en la coexposición F^-As_i , que al aumentar la concentración de As_i existe a un aumento en la proporción relativa de MAs acompañado de una disminución en la proporción de As_i . En un estudio epidemiológico realizado por nuestro grupo, ya se había identificado un aumento en el % de MAs, pero en ese estudio también se observó una disminución en el % de DMAs en la coexposición de $F^-:As_i$ (Jiménez-Córdova y cols., 2019). Interesantemente, recién se identificó menor expresión del gen *as3mt* (1.8 veces) en el cerebro de pez cebra coexpuesto a F^- (15 ppm) y As_i (0.05 ppm), comparado con el expuesto únicamente a As_i (2.5 veces) lo que ayuda a explicar la alteración en el patrón metabólico del As_i (Mondal y cols., 2021). Desafortunadamente, en el presente estudio no se evaluó el patrón de metilación de As_i en tejido, lo que hubiera permitido conocer mejor la alteración del patrón metabólico del As_i en presencia del F^- .

7.8 Daño oxidante en riñón e hígado.

El MDA es el producto final de la lipoperoxidación, el cual es tóxico para las células y su producción elevada se utiliza como un biomarcador para el estrés y daño oxidante (Niki, 2008). Por esta razón se cuantificó para reflejar la posible oxidación lipídica causados por F^- y As tanto en hígado como riñón, reconocidos como órganos diana para las exposiciones a F^- y As , causando daño en las funciones hepáticas y renales (Dong y cols., 2020). Se observaron resultados similares al comparar las concentraciones de MDA por peso tisular vs peso de proteína, sin embargo, la variación de los resultados fue menor al expresar la concentración de MDA por g de proteína. En general se ha descrito que tanto el F^- y el As se pueden distribuir en tejidos blandos y ejercen efectos tóxicos a través de la generación de ROS y el posterior estrés oxidante (Mondal y cols., 2021). Se conoce que ejercen estrés oxidante principalmente al inhibir enzimas antioxidantes y provocando la peroxidación lipídica (Yao y Wang 1988), además que el As_i puede generar ROS a través de sus reacciones red-ox en el organismo (Del Razo y cols., 2001).

Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la concentración de MDA en el grupo expuesto a F^- 50 ppm en el riñón (figura 24). Mientras que en los grupos coexpuestos a As_i 1 y 10ppm, el aumento de MDA no fue significativo, y en el grupo coexpuesto a As_i 20 ppm se observó una inesperada disminución significativa de la concentración de MDA, con concentraciones de MDA similares a la del grupo control, por lo cual se puede sugerir que a concentraciones altas de As_i existe un efecto antagónico para el daño oxidante renal entre la coexposición de F^- y As_i . Mittal y cols., (2018) también evidenciaron el aumento significativo de MDA en el riñón de ratas expuestas a 50 ppm de F^- ; mientras que en la coexposición con As_i de 50 ppm, el aumento en la concentración de MDA fue menos pronunciado al registrado en los grupos expuestos únicamente a F^- o As_i .

Los resultados de daño oxidante en hígado no fueron similares a los encontrados en el tejido renal. Las concentraciones de MDA en hígado fueron similares entre el grupo control y el expuesto únicamente a F^- (figura 25), no obstante, se observó un aumento significativo en el grupo coexpuesto a F^- 50+ As_i 10 ppm, que no fue dependiente de la concentración de exposición a As_i , ya que en el grupo coexpuesto F^- 50 + As_i 20 ppm no se mantuvo el aumento en la concentración de MDA presentando concentraciones similares al grupo control.

Se ha reportado que la exposición a F^- aumenta la concentración de MDA en hígado de diversas especies (Niu y cols., 2018, Zhou y cols., 2015, Atmaca y cols., 2014). En la coexposición con As_i , se han observado efectos controversiales en las concentraciones de MDA hepático. Mittal y cols. (2018) observaron resultados similares en hígado y riñón con disminución en la concentración de MDA en la exposición concomitante en F^- y As_i en comparación de los grupos expuestos únicamente a F^- o As_i .

Khan y cols., (2022) observaron que en ratas coexpuestas a F^- y As_i existe un aumento significativo en la concentración de MDA en el grupo coexpuesto en comparación del grupo solo expuesto a F^- , lo cual concuerda con nuestros resultados.; cabe resaltar que en el estudio de Mittal y cols., (2018) las ratas fueron expuestas a través del consumo de agua a F^- 50 ppm y As_i 50 ppm durante 9 meses y en el estudio de Khan y cols., (2022) las ratas fueron coexpuestas a la misma

dosis de F⁻ y As_i de 4mg/kg/día, con sonda gástrica, durante 3 meses. En ambos estudios la estequiometría F⁻:As_i fue 1:1, mientras que en nuestro estudio fue de 5:1, además del período de exposición de 1 mes. Se ha descrito que en las exposiciones combinadas de F⁻ y As_i en tiempos cortos se produce una mayor toxicidad en el hígado, en comparación de tiempos más prolongados donde se asume una adaptación (Khan y cols., 2022), por lo cual la duración de la exposición puede explicar la diferencia observada en los estudios.

En cuanto a las correlaciones entre la concentración de MDA y las concentraciones de F⁻ obtenidas en hígado, riñón y orina, sólo se encontró correlación positiva significativa de la concentración de MDA y la concentración de F⁻ en el hígado (figura 26), donde podemos apreciar que conforme aumenta la concentración de F⁻ también aumenta la concentración de MDA. Esta relación positiva ha sido reportada por Ranjan y cols. (2009), donde observaron en hígado de conejos blancos expuestos a diferentes concentraciones de F⁻ una fuerte correlación positiva entre estos y los niveles de lipoperoxidación. Del mismo modo Krechniak y Inkielewicz (2005) reportaron una correlación positiva entre concentraciones crecientes de F⁻ y MDA en hígado de ratas expuestas a F⁻. Es bien sabido que el hígado es el principal responsable de la desintoxicación de xenobióticos, incluyendo al F⁻, y el As_i por lo cual lo hace un blanco del daño causado por estos mismos (Grucka-Mamczar y cols., 1997), ya que, como anteriormente se mencionó se le relaciona con un aumento de ROS, inhibición de las enzimas antioxidantes, cambios de lípidos en la membrana y por lo tanto daño en el tejido hepático (Lu y cols., 2017; Prakash y cols., 2018; Wang y cols., 2000).

7.8 Interacción fluoruro y arsénico inorgánico.

En general los xenobióticos pueden interactuar física o fisiológicamente para producir una respuesta aditiva, sinérgica o antagónica en un sitio en particular, (Flora y cols., 2012). En los años recientes, ha llamado la atención el estudio de la posible interacción del F⁻ y el As_i, debido a la coexposición de ambos contaminantes. Varios de los estudios que han evaluado la exposición concurrente de F⁻ y As_i concluyen que, si existe una interacción entre ambos elementos y que los efectos

observados dependen de la concentración, el tiempo de exposición, y el efecto evaluado. Se han reportado tanto efectos sinérgicos (Roy y cols., 2006; Rocha y cols., 2011; Aydin y Orta-Yilmaz, 2022; Qiu y cols., 2021; Yan y cols., 2021) como antagonicos. La mayoría de los estudios realizados en la coexposición $F^-:As_i$ reportan efectos antagonicos (Liu y cols., 1999; Chauhan y Flora, 2010; Ma y cols., 2012, 2017; Mittal y cols., 2018; Mondal y Chattopadhyay, 2020; Tian y cols., 2020; Huma y cols., 2021; Liu y cols., 2021; Mondal y cols., 2021; Khan y col., 2022; Li y cols., 2022; Zaho y cols., 2022; Nie y cols., 2023).

El presente estudio apoya la evidencia de la interacción entre F^- y As_i basado principalmente en la gran disminución de las concentraciones de F^- en orina y hueso. Si partimos del principio básico de Paracelso: *la dosis hace al tóxico*, el tener una dosimetría de F^- menor en el organismo permite suponer un menor efecto adverso. Con base a los resultados obtenidos identificamos que la relación estequiométrica entre las concentraciones de $F^-:As_i$ es importante, siendo la relación 5:1 F^- 50ppm y As_i 10ppm la que permitió identificar claramente el cambio en la dosimetría interna de F^- . A mayor concentración de As_i , parece que no hubiera algún cambio en la coexposición, sin embargo, en la combinación F^- 50ppm y As_i 20ppm se observó un comportamiento que no se ajustó a la relación lineal que si se observó en la coexposición a As_i 1 y 10 ppm; se requieren más estudios que ayuden a entender la dicotomía observada en la coexposición F^- 50ppm y As_i 10 y 20 ppm. La disminución de la concentración de F^- en hueso y orina en presencia de As_i , contrasta con su aumento discreto pero significativo observado en riñón e hígado, sin dejar a un lado el aumento en el daño oxidante en hígado correlacionado con el aumento en la concentración hepática de F^- .

Otros estudios han identificado una disminución de la concentración de F^- en presencia de As_i : en sangre de ratas expuestas durante 9 meses (Mittal y col., 2018) y en el cerebro del pez cebra expuesto a 60 días (Mondal y cols., 2021).

Algunos autores han sugerido la formación de complejos $As-F^-$, ya que el F^- al ser un elemento electronegativo puede formar enlaces iónicos con el As_i , y formar el trifluoruro de arsénico (AsF_3) un complejo que no se absorbe fácil por el intestino (Mondal y cols., 2019) mientras que, en su estado pentavalente, puede formar

pentafluoruro de arsénico (AsF_5) disminuyendo la ionización del As (Huma y cols., 2022). De manera que la menor toxicidad por parte de ambos contaminantes se puede atribuir a una menor absorción sistémica del complejo As-F^- (Flora y cols., 2012).

En cuanto a la absorción y competencia de ambos contaminantes se han realizado varias sugerencias sobre la competencia en la absorción de estos, principalmente el F^- se conoce que se absorbe en el tracto gastrointestinal a través del estómago y el intestino. En el estómago el pH ácido conduce a la formación de HF, a través del cual el 20-25% del F^- ingerido total se absorbe fácilmente por difusión simple en el estómago y del 70-75% restante se absorbe en el intestino a través de vías tanto paracelulares (uniones estrechas) y transcelulares (transportador de aniones de proteína Band3 y el transportador acoplado a protones) (; Nopakun y Messer, 1990; He y cols., 1998; Buzalaf y Whitford, 2011). En contraparte el As se absorbe en el intestino de igual manera por vías paracelulares y transcelulares, a través de transportadores de glucosa, transportadores de aniones orgánicos y acuaporinas 3 y 10 (Calatayud y cols., 2012). Por lo cual se sugiere una posible interacción competitiva en la absorción en intestino y por vía paracelular, ya que ambos contaminantes comparten ambas vías.

Por último, se ha demostrado que tanto el F^- como el As pueden modificar las poblaciones de la microbiota gastrointestinal (Dionizio y cols., 2021; Zhong y cols., 2021). Dentro de las modificaciones que ambos contaminantes comparten por parte de la microbiota es la reducción de la barrera gastrointestinal y un daño en las uniones estrechas del intestino, lo que conduce a una mayor permeabilidad de patógenos y sustancias químicas tóxicas (Wang y cols. 2015; Rácz y cols., 2017). Con lo descrito anteriormente podríamos sugerir que el As con esta interacción competitiva puede modificar la absorción del F^- y con esto su distribución y concentración hacia los diferentes órganos como el riñón, hígado y hueso que fueron evaluados en el presente estudio.

7.9 Fortalezas y limitaciones del estudio

Se valoraron 3 diferentes combinaciones de la relación F⁻:As_i: 50:1, 50:10 y 50:20 y se identificó que esta relación estequiométrica es relevante y debe de ser considerado para el estudio de la interacción entre los dos contaminantes inorgánicos estudiados. Las concentraciones empleadas y sus combinaciones fueron biológicamente relevantes; sin embargo, la relación F⁻:As_i: 50:20 es de menor relevancia biológica debido que la exposición a As_i es muy alta, se intentó simular una concentración de exposición a través del agua de bebida en seres humanos equivalente a 2.0- 2.5 ppm.

Se evaluó la disposición de F⁻ en tres de los principales tejidos blanco de la exposición a F⁻ y As_i. La cuantificación de ambos contaminantes se realizó con métodos validados en el laboratorio acreditado LISTO lo que proporciona mayor confianza en las concentraciones de dosimetría interna evaluadas.

La principal limitación del trabajo fue que no se experimentó con otros 3 grupos de ratones expuestos únicamente a As_i (1, 10 y 20 ppm) por lo que la evaluación de la interacción F⁻:As_i estuvo limitada. Además, no se evaluó si la evaluación en ratones macho presenta diferencias en los resultados obtenidos en ratones hembra.

8. CONCLUSIONES

- 1. La dosimetría interna de F^- se altera en presencia de As_i .** En tejidos de baja irrigación como el hueso hay una disminución de la concentración de F^- dependiente de la concentración de As_i . En tejidos de alta irrigación como el hígado no se observó una alteración significativa, mientras que en el riñón aumentó la concentración de F^- . La concentración urinaria de F^- disminuyó, de manera no dependiente de la concentración de As_i .
- 2. El patrón urinario de As_i y sus metabolitos (MAs y DMAs) se alteró en presencia de F^- .** A mayor concentración de exposición a As_i aumentó la especie MAs.
- 3. El hígado fue blanco de la acción oxidante de la exposición a F^-** aumentado la oxidación de lípidos.
- 4. El daño oxidante en tejido hepático estuvo relacionado con la concentración de F^- .** Fue mayor en la coexposición con As_i a 1 y 10 ppm, pero no a 20 ppm.
- 5. Las concentraciones de exposición y la estequiometría en la relación F^- As_i , influye en los resultados obtenidos.** Para futuros estudios se recomienda en modelos experimentales en roedores la relación F^- 50 ppm: As_i 5 ppm.

9. PERSPECTIVAS

1. Comparar la dosimetría interna de As_i y sus metabolitos entre grupos experimentales expuestos únicamente a As_i vs grupos coexpuestos F^- .
2. Evaluar las concentraciones y el patrón de metilación del As en la coexposición con F^- en diferentes órganos como riñón, hígado y cerebro.
3. Evaluar otros marcadores de estrés oxidante en la coexposición de F^- y As en los diferentes órganos.
4. Estudiar el posible mecanismo de interacción entre F^- y As en la coexposición, considerando a proteínas involucradas en el transporte como la ATPasa de Na^+/K^+ .
5. Evaluar si las alteraciones de microbiota en la coexposición de F^- y As_i afectan la capacidad de absorción de ambos contaminantes.

10. REFERENCIAS

- Abhyankar, L. N., Jones, M. R., Guallar, E., & Navas-Acien, A. (2012). Arsenic exposure and hypertension: a systematic review. *Environmental health perspectives*, 120(4), 494–500. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103988>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. (2007). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, Georgia. 559 p. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>.
- Alarcón-Herrera, M. T., Martín-Alarcon, D. A., Gutiérrez, M., Reynoso-Cuevas, L., Martín-Domínguez, A., Olmos-Márquez, M. A., & Bundschuh, J. (2020). Co-occurrence, possible origin, and health-risk assessment of arsenic and fluoride in drinking water sources in Mexico: Geographical data visualization. *The Science of the total environment*, 698, 134168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134168>
- Arroyo-Guerrero, J. & Del Razo, L.M. (2022) Arsénico y fluoruro en Huerta Olvera S.G. Toxicología ambiental, clínica y cotidiana. Casos de aplicados, 1ª Ed. Manual Modero, México. pag 127-137. ISBN 978-607-448-8678.
- Atmaca, N., Atmaca, H. T., Kanici, A., & Antepioglu, T. (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity, and neurotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 70, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.011>
- ATSDR. Toxicological Profile for Arsenic (Update). Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; (2005):1–357.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org.access.biblioteca.cinvestav.mx/10.1155/2014/360438>.
- Aybar Odstrcil AC, Carino SN, Ricci JC, Mandalunis PM. (2010). Effect of arsenic in endochondral ossification of experimental animals. *Exp Toxicol Pathol.*;62(3):243-9. doi: 10.1016/j.etp.2009.04.001
- Barbería L. E., Cárdenas C. D., Cruz S. C., Maroto E. M. (2005). Fluoruros tópicos: Revisión sobre su toxicidad. *Revista Estomatológica Herediana*, 15(1),86-92. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539343017>.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., & Del Razo, L. M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-biological interactions*, 188(2), 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>

- Bongiovanni, G. A., Pérez, R. D., Mardirosian, M., Pérez, C. A., Marguá, E., & Queralt, I. (2019). Comprehensive analysis of renal arsenic accumulation using images based on X-ray fluorescence at the tissue, cellular, and subcellular levels. *Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 150, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.05.018>
- Boonstra, J., & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.032>.
- Buzalaf, M., & Whitford, G. M. (2011). Fluoride metabolism. *Monographs in oral science*, 22, 20–36. <https://doi.org/10.1159/000325107>.
- Calatayud, M., Barrios, J. A., Vélez, D., & Devesa, V. (2012). In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chemical research in toxicology*, 25(2), 446–453. <https://doi.org/10.1021/tx200491f>.
- Chouhan, S., & Flora, S. J. (2010). Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian journal of experimental biology*, 48(7), 666–678. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/07>.
- Ciosek, Ź., Kot, K., Kosik-Bogacka, D., Łanocha-Arendarczyk, N., & Rotter, I. (2021). The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*, 11(4), 506. <https://doi.org/10.3390/biom11040506>
- Cohen, S. M., Arnold, L. L., Eldan, M., Lewis, A. S., & Beck, B. D. (2006). Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Critical reviews in toxicology*, 36(2), 99–133. <https://doi.org/10.1080/10408440500534230>
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, Manno M, Albores A (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*. 177(2):132-48. doi: 10.1006/taap.2001.9291.
- Dhar, V., & Bhatnagar, M. (2009). Physiology and toxicity of fluoride. *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research*, 20(3), 350–355. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.57379>
- Dharmaratne R. W. (2019). Exploring the role of excess fluoride in chronic kidney disease: A review. *Human & experimental toxicology*, 38(3), 269–279. <https://doi.org/10.1177/0960327118814161>
- Ding, Y., YanhuiGao, Sun, H., Han, H., Wang, W., Ji, X., Liu, X., & Sun, D. (2011). The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *Journal of hazardous materials*, 186(2-3), 1942–1946. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.097>

- Dionizio, A., Uyghurturk, D. A., Melo, C. G. S., Sabino-Arias, I. T., Araujo, T. T., Ventura, T. M. S., Perles, J. V. C. M., Zanoni, J. N., Den Besten, P., & Buzalaf, M. A. R. (2021). Intestinal changes associated with fluoride exposure in rats: Integrative morphological, proteomic and microbiome analyses. *Chemosphere*, 273, 129607. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129607>
- Dong, N., Feng, J., Xie, J., Tian, X., Li, M., Liu, P., Zhao, Y., Wei, C., Gao, Y., Li, B., Qiu, Y., & Yan, X. (2020). Co-exposure to Arsenic-Fluoride Results in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis Through the PERK Signaling Pathway in the Liver of Offspring Rats. *Biological trace element research*, 197(1), 192–201. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01975-1>
- Dunipace, A. J., Brizendine, E. J., Zhang, W., Wilson, M. E., Miller, L. L., Katz, B. P., Warrick, J. M., & Stookey, G. K. (1995). Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *Journal of dental research*, 74(1), 358–368. <https://doi.org/10.1177/00220345950740011201>
- Faita F., Cori L., Bianchi F., Andreassi M. G. (2013). Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *Int J Environ Res Public Health*. 10(4): 1527-1546.
- Flora, S. J., Mittal, M., & Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines, and DNA damage in mouse brain. *Journal of the neurological sciences*, 285(1-2), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.001>
- Flora, S. J., Mittal, M., Pachauri, V., & Dwivedi, N. (2012). A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics: integrated biometal science*, 4(1), 78–90. <https://doi.org/10.1039/c1mt00118c>
- Grucka-Mamczar, E., Machoy, Z., Tamawski, R., Birkner, E., & Mamczar, A. (1997). Influence of long-term sodium fluoride administration on selected parameters of rat blood serum and liver function. *Fluoride*, 30(3), 157-164.
- Hall, M. N., & Gamble, M. V. (2012). Nutritional manipulation of one-carbon metabolism: effects on arsenic methylation and toxicity. *Journal of toxicology*, 2012, 595307. <https://doi.org/10.1155/2012/595307>
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5 Suppl), 715S–725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- He, H., Ganapathy, V., Isales, C. M., & Whitford, G. M. (1998). pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1372(2), 244-254. [doi:10.1016/S0005-2736\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00064-9)
- Hernández-Zavala, A., Matoušek, T., Drobná, Z., Paul, D. S., Walton, F., Adair, B. M., Jiří, D., Thomas, D. J., & Stýblo, M. (2007). Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry

- with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *Journal of analytical atomic spectrometry*, 23, 342–351. <https://doi.org/10.1039/b706144g>.
- Holloway J. (1966) The photochemical reaction of xenon with fluorine at room temperature: A demonstration of the reactivity of xenon. *Journal of Chemical Education*, 43(4), 202. <https://doi.org/10.1021/ed043p202>.
- Huma, Verma, Y., & Rana, S. V. S. (2022). Duration of exposure modulates combined effects of arsenic and fluoride on oxidative stress in the liver of rat. *Journal of Environmental Biology*, 43(4), 514-519. [doi:10.22438/jeb/43/4/MRN-2083](https://doi.org/10.22438/jeb/43/4/MRN-2083)
- Huma, Verma, Y., & Rana, S. V. S. (2022). Liver and kidney function in rats co-treated with fluoride and arsenic for different time intervals. *Fluoride*, 55(1), 90-98.
- IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Arsenic and Arsenic Compounds*. (2011). Vol. 100c. Lyon, France.
- IARC: Arsenic in Drinking Water. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Drinking Water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic. (2004). Vol. 84, (pp. 41, 60–61). IARC Press, Lyon, France.
- Jagtap, S., Yenkie, M. K., Labhsetwar, N., & Rayalu, S. (2012). Fluoride in Drinking Water and Defluoridation of Water. *Chemical Reviews*, 112(4), 2454–2466. <https://doi:10.1021/cr2002855>
- Jiménez-Córdova, M. I., Sánchez-Peña, L. C., Barrera-Hernández, Á., González-Horta, C., Barbier, O. C., & Del Razo, L. M. (2019). Fluoride exposure is associated with altered metabolism of arsenic in an adult Mexican population. *The Science of the total environment*, 684, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.356>
- Johnston, N. R., & Strobel, S. A. (2020). Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Archives of Toxicology*, 94(4), 1051–1069. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02687-5>.
- Kenyon EM, Del Razo LM, Hughes MF. (2005). Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate. *Toxicol Sci*. 85(1):468-75. [doi: 10.1093/toxsci/kfi107](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi107)
- Khan, H., Verma, Y., & Rana, S. V. S. (2022). Significance of Inflammation and Apoptosis in Hepatocellular Death in Rat, Co-treated with Arsenic and Fluoride. *Biological trace element research*, 200(7), 3227–3235. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02929-2>
- Koller, B. H., Snouwaert, J. N., Douillet, C., Jania, L. A., El-Masri, H., Thomas, D. J., & Stýblo, M. (2020). Arsenic Metabolism in Mice Carrying a BORCS7/AS3MT Locus Humanized by Syntenic Replacement. *Environmental health perspectives*, 128(8), 87003. <https://doi.org/10.1289/EHP6943>
- Krechaniak, J., & Inkielewicz, I. (2005). Correlations between fluoride concentrations and free radical parameters in soft tissues of rats. *Fluoride*, 38(4), 293-296.

- Lee S. K. (2018). Sex as an important biological variable in biomedical research. *BMB reports*, 51(4), 167–173. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2018.51.4.034>
- Li, B. Y., Gao, Y. H., Pei, J. R., Yang, Y. M., Zhang, W., & Sun, D. J. (2017). CIC-7/Ostm1 contribute to the ability of tea polyphenols to maintain bone homeostasis in C57BL/6 mice, protecting against fluorosis. *International journal of molecular medicine*, 39(5), 1155–1163. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2933>
- Limón-Pacheco, J. H., Jiménez-Córdova, M. I., Cárdenas-González, M., Sánchez Retana, I. M., Gonsebatt, M. E., & Del Razo, L. M. (2018). Potential Co-exposure to Arsenic and Fluoride and Biomonitoring Equivalents for Mexican Children. *Annals of global health*, 84(2), 257–273. <https://doi.org/10.29024/aogh.913>
- Liu, K. T., Wang, G., Ma, L., Jang, P., Xiao, B. Y., & Zhang, C. (1999). Adverse effects of combined arsenic and fluoride on liver and kidney in rats. *Fluoride*, 32(4), 243–247.
- Liu, S., Zhou, H., Liu, H., Ji, H., Fei, W., & Luo, E. (2019). Fluorine-contained hydroxyapatite suppresses bone resorption through inhibiting osteoclasts differentiation and function in vitro and in vivo. *Cell proliferation*, 52(3), e12613. <https://doi.org/10.1111/cpr.12613>
- Liu, Z., Hou, Y., Li, L., Yang, Y., Jia, J., Hong, Z., Li, T., Xu, Y., Fu, J., Sun, Y., Yamamoto, M., Wang, H., & Pi, J. (2019). Nrf2 deficiency aggravates the increase in osteoclastogenesis and bone loss induced by inorganic arsenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 367, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.02.003>
- Liu, H. Y., Chen, J. R., Hung, H. C., Hsiao, S. Y., Huang, S. T., & Chen, H. S. (2011). Urinary fluoride concentration in children with disabilities following long-term fluoride tablet ingestion. *Research in developmental disabilities*, 32(6), 2441–2448. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2011.07.016>
- Lu, X., Chen, Y., Wang, H., Bai, Y., Zhao, J., Zhang, X., Liang, L., Chen, Y., Ye, C., Li, Y., Zhang, Y., Li, Y., & Ma, T. (2019). Integrated Lipidomics and Transcriptomics Characterization upon Aging-Related Changes of Lipid Species and Pathways in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Journal of proteome research*, 18(5), 2065–2077. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00936>
- Lu, Y., Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Aging*, 9(6), 1623–1639. <https://doi.org/10.18632/aging.101257>
- Mittal, M., & Flora, S. J. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic, and fluoride levels in male mice. *Chemico-biological interactions*, 162(2), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.018>
- Mittal, M., Chatterjee, S., & Flora, S. (2018). Combination therapy with vitamin C and DMSA for arsenic-fluoride co-exposure in rats. *Metallomics: integrated biometal science*, 10(9), 1291–1306. <https://doi.org/10.1039/c8mt00192h>

- Molina Frechero, N., Sánchez Pérez, L., Castañeda Castaneira, E., Oropeza Oropeza, A., Gaona, E., Salas Pacheco, J., & Bologna Molina, R. (2013). Drinking water fluoride levels for a city in northern Mexico (durango) determined using a direct electrochemical method and their potential effects on oral health. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 186392. <https://doi.org/10.1155/2013/186392>
- Mondal, P., & Chattopadhyay, A. (2020). Environmental exposure of arsenic and fluoride and their combined toxicity: A recent update. *Journal of applied toxicology: JAT*, 40(5), 552–566. <https://doi.org/10.1002/jat.3931>
- Mondal, P., Shaw, P., Bandyopadhyay, A., Dey Bhowmik, A., Chakraborty, A., Sudarshan, M., & Chattopadhyay, A. (2019). Mixture effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) liver: Expression pattern of Nrf2 and related xenobiotic metabolizing enzymes. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 213, 105219. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.06.002>
- Mondal, P., Shaw, P., Dey Bhowmik, A., Bandyopadhyay, A., Sudarshan, M., Chakraborty, A., & Chattopadhyay, A. (2021). Combined effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) brain: Alterations in stress marker and apoptotic gene expression. *Chemosphere*, 269, 128678. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128678>
- Navas-Acien, A., Silbergeld, E. K., Pastor-Barriuso, R., & Guallar, E. (2008). Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults. *JAMA*, 300(7), 814–822. <https://doi.org/10.1001/jama.300.7.814>
- NIH then declared NIH. (2015). Guide Notice NOT-OD-15-102 (available at <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-15-102.html>)
- Niki E. (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors* (Oxford, England), 34(2), 171–180. <https://doi.org/10.1002/biof.5520340208>
- Nie C. Hu J. Wang B. Li H. Yang X. Hong F. Effects of co-exposure to fluoride and arsenic on TRAF-6 signaling and NF-κB pathway of bone metabolism. *Biol Trace Elem Res* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03508-9>
- Niu, Q., He, P., Xu, S., Ma, R., Ding, Y., Mu, L., & Li, S. (2018). Fluoride-induced iron overload contributes to hepatic oxidative damage in mouse and the protective role of Grape seed proanthocyanidin extract. *The Journal of toxicological sciences*, 43(5), 311–319. <https://doi.org/10.2131/jts.43.311>
- Nopakun, J., & Messer, H. H. (1990). Mechanism of fluoride absorption from the rat small intestine. *Nutrition Research*, 10(7), 771-779. [doi:10.1016/S0271-5317\(05\)80826-7](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(05)80826-7)
- NRC. Arsenic in the Drinking Water (Update) Washington, DC: National Research Council, National Academy Press. (2001). 1–225.

- Osterhoff, G., Morgan, E. F., Shefelbine, S. J., Karim, L., McNamara, L. M., & Augat, P. (2016). Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury*, 47 Suppl 2(Suppl 2), S11–S20. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(16\)47003-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(16)47003-8)
- Prakash, B., Sabal, S. K., Verma, R., John, P. J., & Soni, I. (2018). Sodium fluoride-induced oxidative stress and histological changes in liver of swiss albino mice and amelioration by ocimum sanctum linn. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(9), 195-199. [doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i9.26840](https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i9.26840)
- Rácz, R., Földes, A., Bori, E., Zsembery, Á., Harada, H., Steward, M. C., Varga, G. (2017). No change in bicarbonate transport but tight-junction formation is delayed by fluoride in a novel ameloblast model. *Frontiers in Physiology*, 8(DEC) [doi:10.3389/fphys.2017.00940](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00940)
- Ranjan, R., Swarup, D., & Patra, R. C. (2009). Oxidative stress indices in erythrocytes, liver, and kidneys of fluoride-exposed rabbits. *Fluoride*, 42(2).
- Ribeiro, D. A., Cardoso, C. M., Yujra, V. Q., DE Barros Viana, M., Aguiar, O., Jr, Pisani, L. P., & Oshima, C. T. F. (2017). Fluoride Induces Apoptosis in Mammalian Cells: In Vitro and In Vivo Studies. *Anticancer research*, 37(9), 4767–4777. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11883>
- Rigalli R., Puche R. C. (2007). Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. *Actualizaciones en Osteología*, Volumen 3, 27-34. http://www.osteologia.org.ar/files/pdf/rid13_5.pdf
- Rizzu, M., Tanda, A., Canu, L., Masawe, K., Mtei, K., Deroma, M. A., Roggero, P. P., & Seddaiu, G. (2020). Fluoride uptake and translocation in food crops grown in fluoride-rich soils. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(15), 5498–5509. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10601>.
- Rubatto Birri, P. N., Pérez, R. D., Cremonuzzi, D., Pérez, C. A., Rubio, M., & Bongiovanni, G. A. (2010). Association between As and Cu renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake. *Environmental research*, 110(5), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.09.002>
- Rubinson, K. A y Rubinson J. F. (2001) *Análisis Instrumental* (Edición en español). Madrid: ED. Pearson
- Saeed, M., Rehman, M., Farooqi, A., & Malik, R. N. (2021). Arsenic and fluoride co-exposure through drinking water and their impacts on intelligence and oxidative stress among rural school-aged children of Lahore and Kasur districts, Pakistan. *Environmental geochemistry and health*, 10.1007/s10653-021-01141-4. *Advance online publication*. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01141-4>
- Shakoor, M. B., Nawaz, R., Hussain, F., Raza, M., Ali, S., Rizwan, M., Oh, S. E., & Ahmad, S. (2017). Human health implications, risk assessment and remediation of As-contaminated water: A critical review. *The Science of the total environment*, 601-602, 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.223>

- Shen, S., Li, X. F., Cullen, W. R., Weinfeld, M., & Le, X. C. (2013). Arsenic binding to proteins. *Chemical reviews*, 113(10), 7769–7792. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>
- Shivarajashankara, Y. M., Shivashankara, A. R., Hanumanth Rao, S., & Gopalakrishna Bhat, P. (2001). Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*, 34(2), 103-107
- Solanki, Y. S., Agarwal, M., Gupta, A. B., Gupta, S., & Shukla, P. (2022). Fluoride occurrences, health problems, detection, and remediation methods for drinking water: A comprehensive review. *The Science of the total environment*, 807(Pt 1), 150601. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150601>
- Tian, X., Xie, J., Chen, X., Dong, N., Feng, J., Gao, Y., Tian, F., Zhang, W., Qiu, Y., Niu, R., Ren, X., & Yan, X. (2020). Deregulation of autophagy is involved in nephrotoxicity of arsenite and fluoride exposure during gestation to puberty in rat offspring. *Archives of toxicology*, 94(3), 749–760. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02651-y>
- Tokar J. E., Boyd A. W., Freedman H. J. y Waalkes P. M. (2013). Toxic Effects of Metals. In: Klaassen, C. D., & Amdur, M. O. (Eds.8). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (p. 286-289). New York: McGraw-Hill.
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A. M., Chen, P., & Schnabl, B. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *Journal of immunological methods*, 421, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>
- Wang, Y. N., Xiao, K. Q., Liu, J. L., Dallner, G., & Guan, Z. Z. (2000). Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. *Toxicology*, 146(2-3), 161–169. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00167-0](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00167-0)
- Waugh DT.(2019). Fluoride Exposure Induces Inhibition of Sodium-and Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase (Na⁺, K⁺-ATPase) Enzyme Activity: Molecular Mechanisms and Implications for Public Health. *Int J Environ Res Public Health*. 16(8):1427. [doi: 10.3390/ijerph16081427](https://doi.org/10.3390/ijerph16081427)
- World Health Organization (2011). *Guidelines for drinking-water quality* (4th ed.). Geneva: WHO.
- Wu, C. T., Lu, T. Y., Chan, D. C., Tsai, K. S., Yang, R. S., & Liu, S. H. (2014). Effects of arsenic on osteoblast differentiation in vitro and on bone mineral density and microstructure in rats. *Environmental health perspectives*, 122(6), 559–565. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307832>
- Yao, H. and G. Wang. (1988). Acute and chronic experimental studies on joint effect of fluoride and arsenic. *Clin.J.Prevent.Med.*,22,284.
- Yao, H., Wang, G., (1988). Recent situation of studies on the interactions between fluoride and other chemical substances. *Chin. J. Endemic Dis.*, 7 (6), p. 18.

- Yao, Y., Ma, Y., Zhong, N., & Pei, J. (2019). The Inverted U-Curve Association of Fluoride and Osteoclast Formation in Mice. *Biological trace element research*, 191(2), 419–425. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1624-3>
- Yiamouyiannis, J. (1986). Fluoride: the aging factor, 3rd ed. Delaware, Ohio: Health Action Press.
- Zeng QB, Xu YY, Yu X, Yang J, Hong F, Zhang AH (2014). Arsenic may be involved in fluoride-induced bone toxicity through PTH/PKA/AP1 signaling pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*;37(1):228-33. doi: 10.1016/j.etap.2013.11.027
- Zhan, X. A., Wang, M., Xu, Z. R., Li, W. F., & Li, J. X. (2006). Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 20(2), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.11.003>
- Zhao, S., Guo, J., Xue, H., Meng, J., Xie, D., Liu, X., Yu, Q., Zhong, H., & Jiang, P. (2022). Systematic impacts of fluoride exposure on the metabolomics of rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 242, 113888. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113888>
- Zheng, Y., Wu, J., Ng, J. C., Wang, G., & Lian, W. (2002). The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicology letters*, 133(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00082-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00082-6)
- Zhong, G., Wan, F., Lan, J., Jiang, X., Wu, S., Pan, J., Hu, L. (2021). Arsenic exposure induces intestinal barrier damage and consequent activation of gut-liver axis leading to inflammation and pyroptosis of liver in ducks. *Science of the Total Environment*, 788 doi: [10.1016/j.scitotenv.2021.147780](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147780)
- Zhou, B. H., Zhao, J., Liu, J., Zhang, J. L., Li, J., & Wang, H. W. (2015). Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. *Chemosphere*, 139, 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.030>
- Zuo, H., Chen, L., Kong, M., Qiu, L., Lü, P., Wu, P., Yang, Y., & Chen, K. (2018). Toxic effects of fluoride on organisms. *Life sciences*, 198, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.001>
- Zuo, Z., Liu, Z., Gao, T., Yin, Y., Wang, Z., Hou, Y., Fu, J., Liu, S., Wang, H., Xu, Y., & Pi, J. (2019). Prolonged inorganic arsenic exposure via drinking water impairs brown adipose tissue function in mice. *The Science of the total environment*, 668, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.008>