



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**TESIS**

**EFFECTO DEL DHA Y EPA SOBRE LOS NIVELES DE 5-HT Y BDNF Y  
LA PRESENCIA DE CONDUCTAS SIMILARES A ANSIEDAD Y  
DEPRESIÓN EN UN MODELO MURINO DE FLUOROSIS AGUDA**

PRESENTA

**GLADYS SELESTE ORTIZ BARROSO**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL**

**TUTOR:** DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO  
**COTUTOR:** DRA. DENISSE CALDERÓN VALLEJO  
**ASESOR:** DR. DAVID MASUOKA ITO

Aguascalientes, Ags.

**CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL**

**DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **GLADYS SELESTE ORTIZ BARROSO** con ID 192318 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO DEL DHA Y EPA SOBRE LOS NIVELES DE 5-HT Y BDNF Y LA PRESENCIA DE CONDUCTAS SIMILARES A ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EN UN MODELO MURINO DE FLUOROSIS AGUDA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 30 de mayo de 2024.**



**Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco  
Tutor de tesis**



**Dra. Denisse Calderón Vallejo  
Co-Tutora de tesis**



**Dr. David Masuoka Ito  
Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado

Código: DO-SEE-FC-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/15



**DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO**



Fecha de dictaminación: 31/05/2024

NOMBRE: GLADYS SELESTE ORTIZ BARROSO ID 192318

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): Biomedicina Molecular y Celular

TIPO DE TRABAJO: (  ) Tesis (  ) Trabajo Práctico

TÍTULO: EFFECTO DEL DHA Y EPA SOBRE LOS NIVELES DE 5-HT Y BDNF Y LA PRESENCIA DE CONDUCTAS SIMILARES A ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EN UN MODELO MURINO DE FLUOROSIS AGUDA.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Las condiciones del agua del estado de Aguascalientes se extraen cada vez a mayor profundidad y que hace que venga acompañada de Fluor, esta situación puede predisponer a la población en riesgo de ansiedad, por lo tanto esta investigación, estudia el riesgo de conducta en la población.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N/A				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados:</i>				
N/A				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N/A				El estudiante es el primer autor
N/A				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N/A				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N/A				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N/A				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: SI  No

**FIRMAS**

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DAVID MASUOKA ITO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARRÓN GALLARDO

\* En caso de conflicto de intereses, firmó un miembro del MAB de la LGAC correspondiente al tutor o miembro del comité tutoral, firmado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

MCB. SILVIA PATRICIA GONZÁLEZ FLORES

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ

*Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado*

El cumplimiento del M.A.T. (LIC) del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico ... Cobrar la atención tanto del programa de posgrado y el ARJ 104 funciones del Secretario Técnico, Sever el seguimiento de los alumnos.

ODON-D-24-00321 - Submission Notification to co-author - [EMID:0f81c236fb3324da] [Recibidos](#)



**Editorial Office Odontology** <em@editorialmanager.com>  
para mí

mié, 29 may. 8:17 a.m. (hace 1 día)

Re: "THE USE OF ANTIOXIDANTS AGAINST THE ADVERSE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS INDUCED BY SODIUM FLUORIDE EXPOSURE IN MURINE MODELS"  
Submission ID: ODON-D-24-00321

Full author list: Gladys Ortiz-Barroso; Ricardo Ramirez-Crozo; Vicente Esparza-Villalpando; Mayra Macedo-Mendoza; Tonatiuh Barrios-García; Nayeli Amalinalli Pulido-Hernández

Dear Nutritionist Ortiz-Barroso,

We have received the submission entitled: "THE USE OF ANTIOXIDANTS AGAINST THE ADVERSE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS INDUCED BY SODIUM FLUORIDE EXPOSURE IN MURINE MODELS" for possible publication in *Odontology*, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dentist Vicente Esparza-Villalpando who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
*Odontology*

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, a el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías, por el apoyo brindado a lo largo del posgrado y por fomentar la formación de profesionales en investigación.

Además, a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por abrirme las puertas nuevamente para poder estudiar este posgrado de manera satisfactoria y darme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional; de la misma manera a los docentes que brindaron su conocimiento.

Mi agradecimiento también va dirigido al Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto; además de compartir su conocimiento, su experiencia, ser un guía preciso a lo largo del proceso, por su paciencia, constancia en este trabajo y siempre impulsarme a esforzarme.

Agradezco también a la Dra. Denisse Calderón Vallejo, por contribuir con su experiencia no solo en el proyecto, sino también en el desarrollo de nuevas habilidades que enriquecieron mi formación; así como su confianza y apoyo incondicional.

A mi asesor, el Dr. David Masuoka Ito, por su sabiduría, dedicación, por transmitir los conocimientos de manera oportuna y brindar el apoyo necesario para la realización de esta investigación.

Les agradezco muy profundamente a todos los miembros del laboratorio de Investigación en Nutrición, quienes compartieron conmigo conocimientos y horas de trabajo, por su guía sincera, su paciencia y sus consejos.

Por último, agradecer a mi familia quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han acompañado cumpliendo un logro más, gracias por siempre creer en mí y estar a mi lado apoyándome incondicionalmente en todos mis objetivos profesionales y personales.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	8
2.1 Fluoruro.....	8
2.2 Generalidades de la fluorosis.....	8
2.3 Epidemiología de la fluorosis .....	9
2.4 Fisiopatología de la fluorosis.....	9
2.5 Fluorosis dental.....	10
2.6 Fluorosis esquelética .....	10
2.7 Fluorosis no esquelética .....	11
2.8 Alteraciones neurológicas en la fluorosis .....	12
2.9 Hipocampo.....	13
2.10 Marcadores de función neurológica .....	13
2.11 Omega 3 .....	15
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	16
3.1 Pregunta de investigación.....	17
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos .....	18
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	18
6.1 Hipótesis de investigación.....	18
6.2 Hipótesis nula.....	19
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	19
7.1 Diseño del estudio.....	19
7.2 Población y lugar de estudio .....	19
7.3 Cálculo de tamaño de la muestra.....	19
7.4 Intervención propuesta.....	19
7.4.1 Generalidades .....	19
7.4.2 Estandarización de la dosis .....	19



7.4.3 Administración de fluoruro de sodio .....	20
7.4.4 Administración de DHA y EPA.....	20
7.4.5 Evaluación de conductas similares de ansiedad .....	20
7.4.6 Evaluación de serotonina (5-HT) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).....	21
7.5 Operacionalización de variables .....	21
7.6 Plan de análisis de resultados.....	22
<b>8. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....</b>	<b>22</b>
<b>9. RECURSOS PARA EL ESTUDIO .....</b>	<b>23</b>
<b>10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES .....</b>	<b>23</b>
<b>11. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
11.1 Registro semanal del peso de los ratones .....	24
11.2 Conductas similares a la ansiedad en Prueba de Campo Abierto .....	25
11.3 Conductas similares a la ansiedad en Prueba de Laberinto Elevado en Cruz .....	26
11.4 Conductas similares a depresión en Prueba de Nado Forzado .....	27
11.5 Evaluación de los niveles de 5-HT en hipocampo.....	28
11.6 Evaluación de los niveles de BDNF en hipocampo.....	29
<b>12. DISCUSIONES.....</b>	<b>29</b>
<b>13. CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Recomendaciones y límites máximos de ingesta diaria de fluoruro.....	8
<b>Tabla 2:</b> Protocolo experimental .....	19
<b>Tabla 3:</b> Operacionalización de variables .....	21





**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1:** Clasificación de la fluorosis según el tejido afectado ..... 12

**Figura 2:** Neurotoxicidad causada por la fluorosis y los marcadores de la función neurológica..... 14

**Figura 3:** Metabolismo y funciones del DHA/EPA ..... 16

**Figura 4:** Registro semanal del peso de los ratones por grupo ..... 24

**Figura 5:** Resultados de la prueba de campo abierto por grupo..... 25

**Figura 6:** Recorridos en la prueba de campo abierto por grupo ..... 26

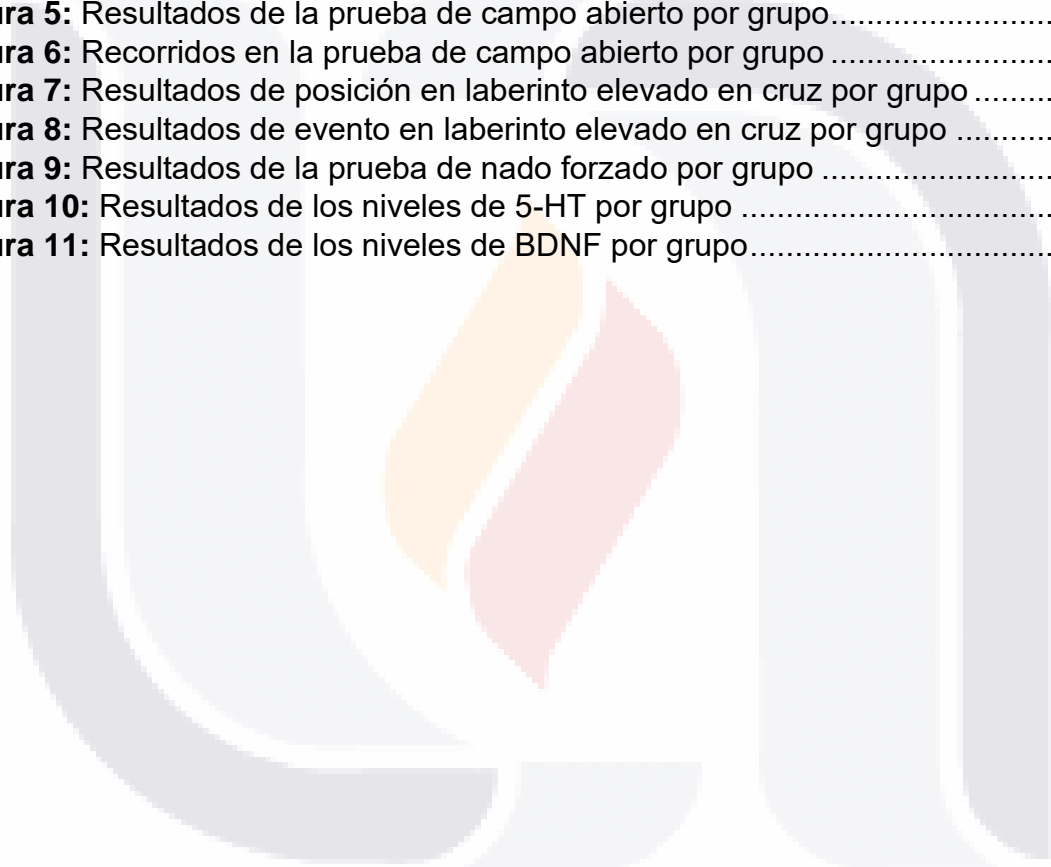
**Figura 7:** Resultados de posición en laberinto elevado en cruz por grupo ..... 26

**Figura 8:** Resultados de evento en laberinto elevado en cruz por grupo ..... 27

**Figura 9:** Resultados de la prueba de nado forzado por grupo ..... 28

**Figura 10:** Resultados de los niveles de 5-HT por grupo ..... 28

**Figura 11:** Resultados de los niveles de BDNF por grupo..... 29



## RESUMEN

**Introducción:** La fluorosis es una toxicidad cuyo mecanismo de daño generalmente es atribuido al estrés oxidativo. El fluoruro tiene la capacidad de provocar alteraciones en la función del sistema nervioso central. Debido a las propiedades antioxidantes que poseen el ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), se sospecha un posible efecto protector.

**Metodología:** Se formaron 4 grupos con ratones macho BALB/c (n=10): Control, grupo NaF (con una exposición a fluoruro de sodio de 12 mg/kg/30 días), grupo NaF + DHA/EPA (NaF: 12 mg/kg/30 días + DHA/EPA: 50 mg/kg/45 días) y grupo DHA/EPA (administración de 50 mg/kg/ 45 días de DHA/EPA). Posterior al periodo experimental se aplicaron pruebas de conducta para evaluar la presencia de conductas similares a la ansiedad y depresión. Al finalizar se extrajo el hipocampo, para la evaluación de los niveles de 5-HT y BDNF mediante pruebas de ELISA.

**Resultados:** En las pruebas de conducta se observó que los ratones del grupo DHA/EPA permanecieron un mayor tiempo en el brazo cerrado ( $p= 0.0488$ ) y un menor número de avistamientos del laberinto elevado en cruz respecto a los ratones del grupo NaF ( $p= 0.0114$ ). Mientras que, en la prueba de nado forzado, el grupo DHA/EPA tuvo un menor porcentaje de tiempo con movilidad alta, en comparación con el grupo NaF ( $p= 0.0012$ ) y el grupo NaF + DHA/EPA ( $p= 0.0337$ ). Por otro lado, los grupos NaF y NaF + DHA/EPA presentaron niveles más bajos de BDNF en hipocampo que los ratones pertenecientes a los grupos Control y DHA/EPA ( $p<0.0001$ ).

**Conclusiones:** Los ratones a los cuales se les indujo la fluorosis mostraron cambios conductuales, así como niveles disminuidos de BDNF. El tratamiento con DHA/EPA no logró restaurar los niveles de BDNF; mientras que en algunos comportamientos tuvo un efecto contrario al NaF; lo que sugiere un efecto protector.

**Palabras clave:** Fluorosis, DHA/EPA, depresión, ansiedad, serotonina, BDNF.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fluorosis is a toxicity whose mechanism of damage is generally attributed to oxidative stress. Fluoride has the ability to cause alterations in the function of the central nervous system. Due to the antioxidant properties of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), a possible protective effect is suspected.

**Methodology:** Four groups were formed with male BALB/c mice (n=10): Control, NaF group (exposed to sodium fluoride at 12 mg/kg/30 days), NaF + DHA/EPA group (NaF: 12 mg/kg/30 days + DHA/EPA: 50 mg/kg/45 days), and DHA/EPA group (administration of 50 mg/kg/45 days of DHA/EPA). After the experimental period, behavioral tests were applied to evaluate the presence of anxiety and depression-like behaviors. At the end, the hippocampus was extracted for the evaluation of 5-HT and BDNF levels using ELISA tests.

**Results:** In the behavioral tests, it was observed that mice in the DHA/EPA group spent more time in the closed arm ( $p=0.0488$ ) and had a lower number of sightings of the elevated plus maze compared to mice in the NaF group ( $p=0.0114$ ). Meanwhile, in the forced swimming test, the DHA/EPA group had a lower percentage of time with high mobility compared to the NaF group ( $p=0.0012$ ) and the NaF + DHA/EPA group ( $p=0.0337$ ). On the other hand, the NaF and NaF + DHA/EPA groups showed lower levels of BDNF in the hippocampus than mice belonging to the Control and DHA/EPA groups ( $p<0.0001$ ).

**Conclusions:** Mice induced with fluorosis showed behavioral changes, as well as decreased levels of BDNF. Treatment with DHA/EPA failed to restore BDNF levels; while in some behaviors, it had an opposite effect to NaF; suggesting a protective effect.

**Keywords:** Fluorosis, DHA/EPA, depression, anxiety, serotonin, BDNF.

## 1. INTRODUCCIÓN

El flúor es un elemento con funciones fisiológicas, se encuentra a manera de fluoruros formando enlaces con otros elementos de manera natural en alimentos, agua subterránea y adicionado a algunos productos; sin embargo, un consumo excesivo de fluoruros causa una toxicidad llamada fluorosis. La fluorosis se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial en zonas en las que reportan un alto contenido de fluoruros en aguas subterráneas, superando 1.5 mg/L de fluoruros, que son los niveles que la Organización Mundial de la Salud y en el caso de México la Norma Oficial Mexicana (NOM- 127-SSA1-1994) señalan como la cantidad máxima permitida (1–4).

El daño ocasionado es determinado por las concentraciones, la vía de administración y el entorno que rodea a la célula; las alteraciones y manifestaciones que se presenten dependerán del tejido dañado y con base en eso se clasificará la fluorosis en dental, esquelética y no esquelética. Cuando la toxicidad se presenta en tejidos blandos, esta se clasifica como fluorosis no esquelética. Las alteraciones causadas por la fluorosis en conjunto o de manera independiente resultan en estrés oxidativo, el cual se refleja dependiendo el sistema que este siendo dañado (4–6).

El sistema nervioso central se ve afectado por la fluorosis causando estrés oxidativo y una disminución en la actividad antioxidante; que, a su vez conducen a alteraciones en estructuras cerebrales relacionadas con procesos cognitivos, así como cambios conductuales como ansiedad y depresión. El uso de distintos marcadores puede ayudar a determinar el funcionamiento neurológico como lo es la serotonina, la cual interviene en varios procesos como la regulación de las conductas, memoria y ciclos de sueño; por otro lado, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), es una proteína que regula procesos celulares involucrados en la función cerebral normal promoviendo la neurogénesis en hipocampo. A causa de esto la alteración en los niveles de ambos se relacionan con daño neurológico y trastornos conductuales (7–11).

Actualmente no existe un tratamiento contra la fluorosis, por lo que se usan alternativas para tratar las manifestaciones; con la información actual acerca de los mecanismos por los que se da la toxicidad mediante el incremento de estrés oxidativo y disminución de la actividad enzimática, permiten suponer un posible efecto terapéutico del ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), los cuales son ácidos grasos poliinsaturados que tienen efectos antioxidantes y un rol terapéutico contra la neurodegeneración; por lo cual, su deficiencia se ha relacionado con anomalías neurológicas entre las cuales se encuentra la depresión y la ansiedad (12–14).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Fluoruro

El flúor es un elemento con alta reactividad y electronegatividad, este se encuentra de manera natural y abundante en el medio ambiente en forma de fluoruros al formar enlaces iónicos con otros elementos, siendo el decimotercer elemento más abundante en la corteza terrestre. Es esencial para funciones fisiológicas, entre ellas la salud ósea y dental, así como procesos metabólicos, la recomendación de ingesta diaria de fluoruro depende principalmente de la edad y el sexo (Tabla 1) (4,15,16).

A pesar de que el fluoruro se encuentra de manera natural en el medio ambiente, las cantidades contenidas en los alimentos y el agua en algunos casos no son suficientes, por lo que a algunos de estos se les adiciona. El termino fluoración se refiere a la adición de fluoruros a ciertos productos; esta medida se ha tomado en distintos países ingesta de flúor se da por agua embotellada, sal fluorada, alimentos, bebidas embotelladas, suplementos dietéticos y algunos productos dentales a incluyendo México, para la prevención de caries y el fortalecimiento de los huesos. La principal ingesta de flúor se da por agua embotellada, sal fluorada, alimentos, bebidas embotelladas, suplementos dietéticos y algunos productos dentales los cuales se les adiciona (17,18).

### 2.2 Generalidades de la fluorosis

La fluorosis es una toxicidad causada por la exposición crónica a una dosis elevada de fluoruros (6). Una vez ingerido el fluoruro recorre el tracto gastrointestinal y entre el 75% y el 95% de este es absorbido para distribuirse en el cuerpo a través del torrente sanguíneo, posteriormente se acumula en tejidos como huesos, dientes, las partes calcificadas de la glándula pineal, el bazo y los riñones (4,5,19).

Edad	Recomendación (mg)	Límites (mg)
0 a 6 meses	0.01	0.7
7 a 12 meses	0.5	0.9
1 a 3 años	0.7	1.3
4 a 8 años	1.0	2.2
9 a 13 años	2.0	10.0
14 a 18 años	3.0	10.0
Hombres mayores de 19 años	4.0	10.0
Mujeres mayores de 19 años	3.0	10.0
Embarazo y lactancia	3.0	10.0

*Información obtenida de: "Datos sobre el fluoruro" NIH (2020) (10). Mg: miligramos.*

**Tabla 1:** Recomendaciones y límites máximos de ingesta diaria de fluoruro.

Los mecanismos por los cuales se da la toxicidad aún no se conocen con exactitud; sin embargo, se sabe que, dependiendo las concentraciones, su vía de

administración y el entorno que rodea cada célula, determinan el tipo de daño que causa (5).

La toxicidad aguda es poco frecuente y se da a concentraciones muy altas de fluoruro por ingestiones de 5 a 8 mg/kg de peso corporal. Sus principales manifestaciones son náuseas, diarrea, dolores de cabeza y dolor gástrico: mientras que el consumo frecuente de más de 1.5 ppm de fluoruro en humanos causa una toxicidad crónica (5).

### **2.3 Epidemiología de la fluorosis**

Como se ha mencionado, el fluoruro es parte del medio ambiente, por lo cual se encuentra en el agua subterránea, Según la Organización Mundial de la Salud y la Norma Oficial Mexicana (NOM- 127-SSA1-1994) la cantidad de fluoruros permitida en el agua potable es de 1.5 mg/L (1,20).

Debido a que una de las principales fuentes de fluoruro es el agua, en el mundo existe una prevalencia de fluorosis por el alto contenido de fluoruro en aguas subterráneas en regiones de la India, Turquía, China, Japón, Irán, Irak, Afganistán, México y Latinoamérica (21).

En México los estados de San Luis Potosí, Durango, Zacatecas, Aguascalientes y Jalisco tienen incidencia de fluorosis endémica. En el estado de Aguascalientes se ha reportado que aproximadamente el 43.7% de las fuentes de abastecimiento de agua superan el límite establecido de concentraciones, llegando a tener concentraciones de 10.0 mg/L. Un estudio dirigido a fluorosis dental reportó prevalencias superiores al 50% en niños de entre 9 y 11 años (22).

### **2.4 Fisiopatología de la fluorosis**

El daño que genera la fluorosis generalmente es atribuido a distintos mecanismos, los cuales en conjunto o de manera independiente desencadenan el estrés oxidativo, la detención del ciclo celular y activación de la apoptosis (5).

El fluoruro de sodio tiene la capacidad de inhibir proteínas como: la lipasa, fosfatasas, quinasas, hidrolasas y otras metaloproteínas. El fluoruro tiene la capacidad de unirse a los metales de los sitios activos de las proteínas formando un complejo altamente estable, generando así una inhibición de estas, de esta manera se podría afectar vías como la glucólisis, el transporte de nutrientes y la respiración celular (5).

Una exposición prolongada a fluoruro puede causar a nivel extracelular pérdida de calcio y magnesio del plasma y un exceso de potasio, mientras que de manera intracelular hay una mayor entrada de calcio y magnesio y concentraciones bajas de potasio, provocando un desequilibrio electrolítico que se relaciona con implicaciones en la homeostasis celular y la interrupción de la señalización (5).

El fluoruro tiene la capacidad de volver más ácido el citoplasma de las células a las que ingresa liberando protones, además se ha observado en células que posterior a la exposición a fluoruro muestran respiración reducida y signos de daño



permanente en la mitocondria, conduciendo a la reducción de ATP y de manera consecuente una acidificación intracelular. Durante este proceso existe liberación de radicales libres y citocromo c por el daño generado a la mitocondria, que lleva a un estado de estrés oxidativo que tiene la capacidad de interrumpir el metabolismo y activar la señalización de estrés (5).

Entre las propiedades que tiene el fluoruro se encuentra la inhibición de proteínas transmembrana, una de estas es la bomba sodio potasio, por consecuencia se da un cambio en el pH por la acumulación de protones en el citoplasma (5).

Las mitocondrias no son el único orgánulo dañado por el fluoruro, también se han visto alteraciones en la superficie celular, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y el núcleo. Con una mayor absorción de fluoruro a la célula, existe un reordenamiento del citoesqueleto dado por la unión del fluoruro con la actina lo que provoca un cambio en su polimerización, esto daña la membrana en conjunto con la peroxidación de lípidos y el estrés oxidativo (5).

El estrés oxidativo dado por el exceso de fluoruros en la célula resulta en daño al ADN de una o dos cadenas, lo que conduce a la detención del ciclo celular en la fase S. Además, el estrés oxidativo es responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas, que se relaciona con la señalización apoptótica (5).

El mecanismo de daño puede presentarse en varios tejidos, causando diferentes alteraciones y manifestaciones; por lo que la fluorosis se clasifica según el tejido al que este dañando (Figura 1) (4).

## **2.5 Fluorosis dental**

La fluorosis dental es la primera manifestación clínica de la fluorosis, se caracteriza por desgaste en el esmalte de los dientes, coloración amarillenta, manchas y tinciones en color café. La afectación del fluoruro en la síntesis de proteínas alterando la secreción de proteínas de los ameloblastos, lo que ocasiona la hidrólisis de la amelogenina, retraso en la eliminación y cambios en la susceptibilidad al fluoruro. Existe daño a la función del retículo endoplásmico de los ameloblastos por el fluoruro, causando trastornos en la síntesis de proteínas de los ameloblastos. El estrés oxidativo inducido por la fluorosis a nivel dental activa la vía de estrés del retículo endoplásmico provocando apoptosis y aumentando la capacidad fagocítica de los ameloblastos maduros. Todos estos procesos en conjunto conllevan a la aparición de fluorosis dental (6).

## **2.6 Fluorosis esquelética**

Una alta absorción de fluoruro en el hueso altera la red ósea general y reduce la resistencia, lo que provoca una mayor fragilidad asociada con dismorfia esquelética y mayor riesgo de fracturas. Al igual que en la fluorosis dental, el fluoruro causa estrés oxidativo a partir del daño ocasionado al retículo endoplásmico, pero en este caso de los osteoblastos alterando su diferenciación. El fluoruro estimula los osteoblastos lo que aumenta la densidad ósea y el recambio óseo acelerado,



este proceso está relacionado con la afección a nivel hormonal, dada por un aumento en la secreción de la hormona paratiroidea. También existe apoptosis dada por estrés oxidativo a través de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (6).

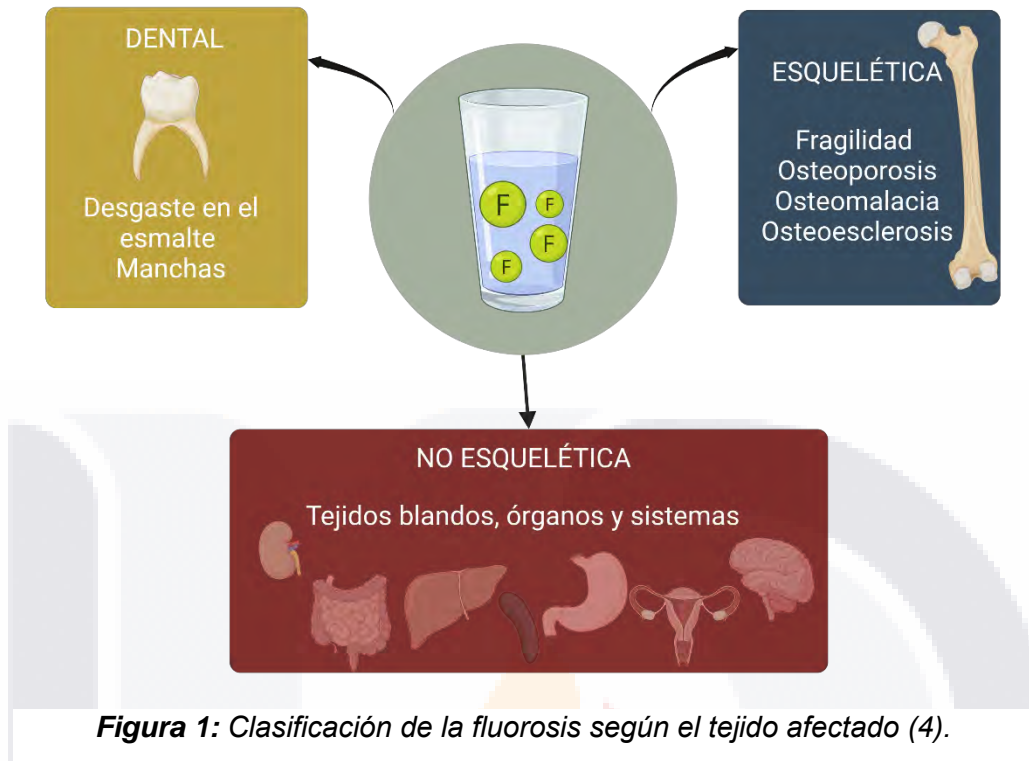
Las manifestaciones de la fluorosis esquelética son osteoporosis, osteomalacia, osteoesclerosis, osificación del tejido blando perióseo y cambios en el cartílago y articulaciones (6). El desarrollo de estas se debe a la función activa y la absorción de los osteoclastos. Con la estimulación a los osteoblastos se secreta el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL), el cual es necesario para la formación de los osteoclastos. El fluoruro puede inhibir la expresión del factor nuclear de células T activas (NFAT) c1 en los osteoclastos lo que reduce la actividad de estos e inducir la destrucción osteoblástica y aceleran el proceso de recambio óseo (6).

El fluoruro también interfiere con el metabolismo óseo por la afección a la matriz extracelular del tejido óseo. Durante la fluorosis los osteoblastos están activos; sin embargo, por estado patológico el tejido óseo formado es inmaduro por las anomalías causadas en el metabolismo del colágeno tipo I en huesos y cartílagos causando cambios en su estructura (6).

## **2.7 Fluorosis no esquelética**

La fluorosis no esquelética daña distintos tejidos blancos, órganos y sistemas del cuerpo como el renal, hepático, gonadal, endotelial, endócrino y neurológico, causando diversas alteraciones y manifestaciones (4).

El mecanismo responsable de la patogénesis de la fluorosis no esquelética se le atribuye a la alta afinidad de los fluoruros para unirse al calcio y proteínas, e interrumpir su metabolismo, lo que afecta vías mencionadas anteriormente y provoca la oxidación celular causada por altos niveles de ROS, finalizando con la muerte celular en los distintos tejidos (4,23).



**Figura 1:** Clasificación de la fluorosis según el tejido afectado (4).

### 2.8 Alteraciones neurológicas en la fluorosis

El fluoruro tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y permanecer en el líquido cefalorraquídeo, por lo que se ha observado que una ingesta excesiva puede provocar alteraciones en la función del sistema nervioso central (SNC) (19,24). La protección que brinda la barrera hematoencefálica en el adulto es diferente a la que se tiene en una edad más temprana, caso del feto y el niño, que cuentan con una barrera incompleta, por lo que son más propensos a presentar alteraciones neurológicas por fluorosis. Al tener la facilidad de atravesar esta barrera los niveles de fluoruro en el líquido cefalorraquídeo se aproximan a los del suero (19).

El fluoruro tiene una alta capacidad prooxidativa la cual ocasiona daños al sistema nervioso de distintas maneras. En la membrana el exceso de flúor produce peroxidación lipídica, ya que a concentraciones altas produce la liberación y oxidación de los lípidos de membrana. El estrés oxidativo en sistema nervioso también se debe a dicha capacidad, ya que por un lado se tiene una producción excesiva de ROS como: peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidróxido (OH<sup>-</sup>) y oxígeno (O<sub>2</sub>), que se da por alteraciones en el metabolismo del oxígeno, esto es posible ya que el cerebro contiene una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y metales como el cobre y el hierro, los cuales tienen actividad redox. Aunado al alto consumo de oxígeno y una capacidad regenerativa baja y por otro lado existe una disminución de la función de enzimas antioxidantes como: la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (7,8).

El fluoruro también tiene un efecto proinflamatorio en sistema nervioso pues estimula la síntesis de citocinas proinflamatorias, aumentando los niveles de la interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ ) y el interferón  $\gamma$  (e IFN- $\gamma$ ), que dan como resultado inflamación, neurodegeneración, trastornos en la diferenciación, maduración y división celular, lo que conduce a cambios en el funcionamiento celular como el metabolismo y la transmisión de impulsos nerviosos, apoptosis y daño tisular (7).

El estrés oxidativo y la actividad proinflamatoria estimulada por el exceso de fluoruros está relacionado con alteraciones en estructuras cerebrales relacionadas con los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje; así como desordenes psiquiátricos como ansiedad, depresión y enfermedades neurodegenerativas de gran importancia como enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple (Figura 2) (7–9).

## **2.9 Hipocampo**

El hipocampo es una estructura especializada más grande del giro intralímbico, está ubicado en la asta temporal del ventrículo lateral, tiene una forma arqueada, mide entre 4 y 5 centímetros de largo y alrededor de 1 centímetro de ancho en los adultos. Se divide en tres segmentos, en la parte anterior y más dilatada se encuentra la cabeza, el cuerpo y el segmento más angosto la cola. Está conformado por láminas de allocorteza, que al estar en la parte central reciben información de casi todas las áreas de asociación neocortical a través de las cortezas perirrinal, parahipocampal y entorrinal (25,26).

Entre las funciones del hipocampo se encuentra la memoria a largo plazo, el aprendizaje, la navegación espacial, la regulación de emociones como el sueño, la ansiedad y el estrés, esto debido a la neuroplasticidad con la que cuenta, lo que le da la capacidad de adaptar y reorganizar la estructura dependiente de los estímulos internos o externos: por lo que puede modificar los árboles dendríticos y axones, el número de sinapsis y la formación de nuevas neuronas. Esta misma plasticidad es la que lo vuelve vulnerable ante factores como: isquemia, neuroinflamación, estrés crónico, neurodegeneración y al envejecimiento (26).

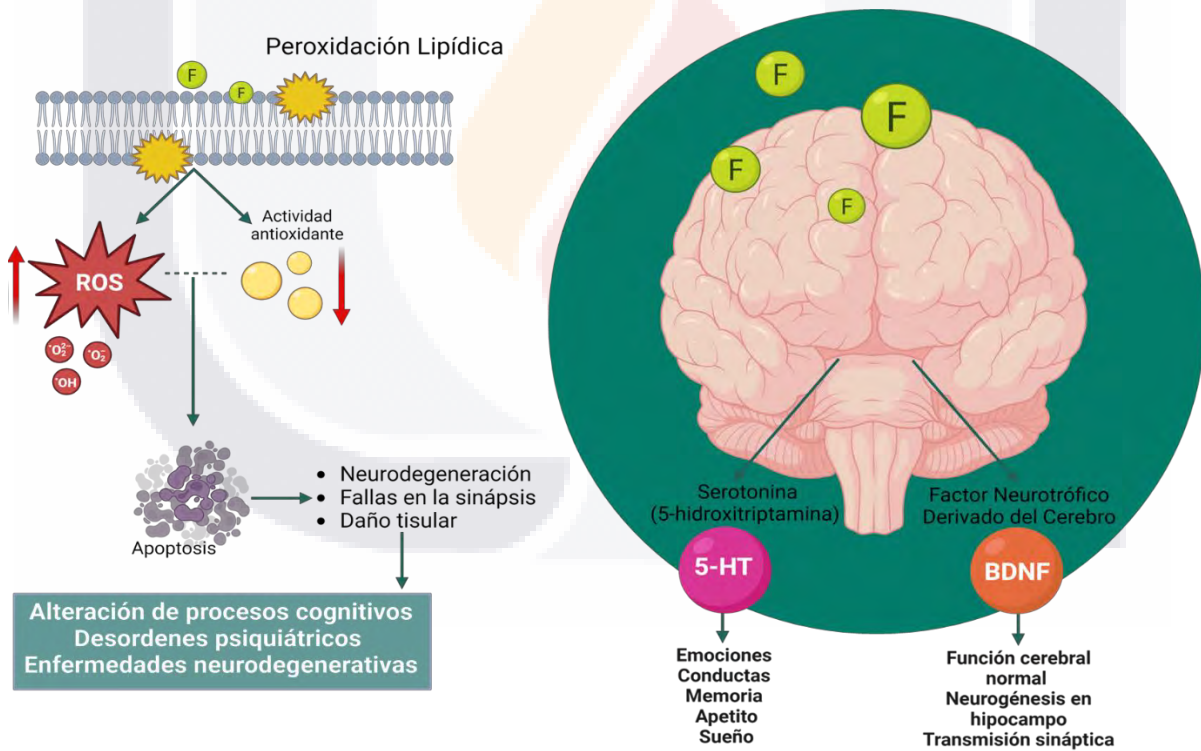
## **2.10 Marcadores de función neurológica**

Existen diferentes marcadores que pueden ayudar en el conocimiento de la función neurológica, uno de estos es la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), la cual es una monoamina biogénica que se forma a partir del triptófano hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa y posteriormente la descarboxilación por medio de triptófano descarboxilasa. En SNC esta se sintetiza y se almacena en neuronas presinápticas como las neuronas serotoninérgicas, glándula pineal y neuronas catecolaminérgicas; mientras que fuera del SNC se encuentra la mayor parte de la serotonina siendo entre el 90 al 95%, su síntesis se da en las células enterocromafines y plaquetas, las cuales tienen un nivel bajo de síntesis, pero gran capacidad de almacenamiento (10,27).

La serotonina tiene funciones como neurotransmisor, hormona y mitógeno, y sus efectos se dan tanto en el SNC como en el SNP e interfiere en varios de los procesos, pues todas las regiones del cerebro expresan múltiples receptores de serotonina, por lo que es capaz de modular emociones, conductas e incluso procesos relacionados con la memoria, apetito, regulación de los ciclos de sueño y comportamiento sexual. Trastornos del comportamiento como la ansiedad y la depresión están asociados con niveles bajos de serotonina en el SNC (10,27).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) es una proteína del SNC que regula procesos celulares involucrados en la función cerebral normal, se expresa por neuronas glutamatérgicas, células gliales y microglía. Entre sus funciones se encuentran el promover la neurogénesis en hipocampo, regula la transmisión sináptica y la potenciación a largo plazo en distintas regiones del cerebro. Un déficit en su señalización está relacionado con enfermedades como: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión y ansiedad (11).

Actualmente no existe una cura para la fluorosis; sin embargo, se usan alternativas para tratar las manifestaciones que se presentan como la suplementación con calcio, vitamina D, vitamina C y antioxidantes (23).



**Figura 2:** Neurotoxicidad causada por la fluorosis y los marcadores de la función neurológica (6,10,21,28).

### 2.11 Omega 3

Los ácidos grasos se clasifican según el número de enlaces dobles en sus cadenas de carbono, en monoinsaturados (MUFAs) cuando solo tienen un doble enlace y en poliinsaturados (PUFAs) cuando tienen dos o más enlaces. Los PUFAs, a su vez se clasifican según la ubicación del primer doble enlace en ácido alfa-linolénico (omega 3) y ácido linoleico (omega 6), los cuales no son sintetizados por los mamíferos por lo que se denominan ácidos grasos esenciales y deben obtenerse a través de la dieta. Las propiedades de cada uno son muy distintas, ya que el omega 6 se caracteriza por estar involucrado en diferentes etapas de la inflamación, en la constricción de vasos sanguíneos y agregación plaquetaria como mediador lipídico, estas funciones participan en la respuesta inflamatoria aguda en infecciones y heridas; mientras que el omega 3 tiene propiedades antiinflamatorias (29).

El omega 3 se metaboliza en el retículo endoplásmico de las células hepáticas generando ácido estearidónico (SDA) a partir de la desaturación del ácido alfa-linolénico, posterior a esto, mediante la elongación de dos carbonos a la cadena se produce ácido eicosatetraenoico (ETA), a continuación se agrega un doble enlace en el quinto carbono lo que provoca una desaturación para la síntesis del ácido eicosapentaenoico (EPA); el cual pasa por dos ciclos de elongación, el primero deriva en el ácido docosapentaenoico (DPA) y después en ácido tetracosanolpentaenoico, que tras una desaturación genera tetracosapentaenoico (THA) y finalmente la cadena se acorta dos carbonos en el peroxisoma por medio de una  $\beta$ -oxidación por la acción de la acetil coenzima A oxidasa, que resulta en ácido docosahexaenoico (DHA) (29,30).

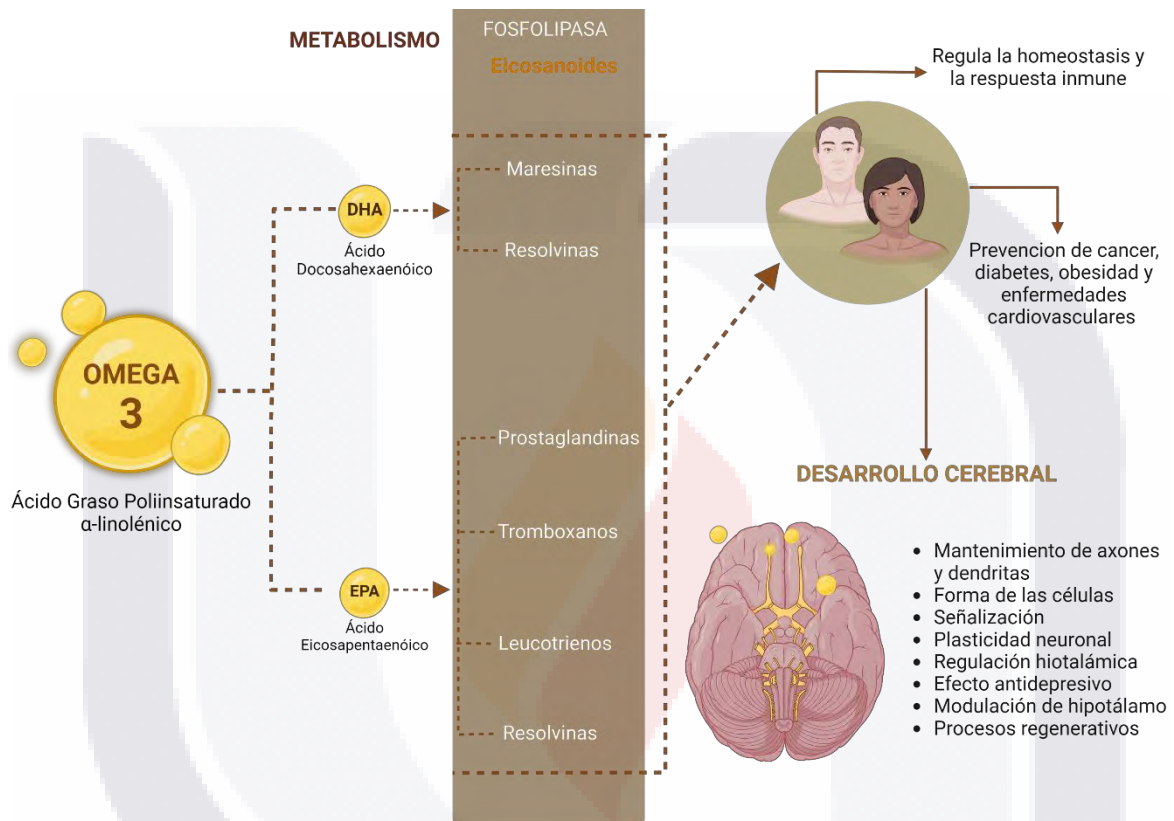
Una vez sintetizados el EPA y DHA se almacenan en fosfolípidos o glicéridos de forma estratificada, estos ácidos grasos están involucrados en la formación de eicosanoides, los cuales son lípidos mediadores de señalización bioactivos. Con la acción de los sistemas enzimáticos de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX), el EPA se metaboliza a resolvinas de la serie E (RvE), prostaglandinas y leucotrienos; mientras que el DHA en resolvinas de la serie D (RvD), protectinas y maresinas las cuales en conjunto se les conoce como mediadores pro-resolución especializados (SPM, por sus siglas en inglés) y participan en la resolución de la inflamación y tienen un rol terapéutico contra la neurodegeneración (Figura 3) (29–31).

El cerebro tiene una síntesis endógena baja de EPA y DHA, lo que sugiere que mantiene sus niveles a través del plasma atravesando por difusión simple la barrera hematoencefálica; sin embargo, las concentraciones de DHA en el cerebro son mayores que las de EPA, por lo que se cree que hay un mayor requerimiento de DHA en membrana neuronal, ya que tiene efectos en la modulación de las funciones de esta. El DHA tiene un mayor potencial para afectar la señalización celular modificando la composición de las balsas lipídicas, al unirse en estos dominios en la membrana y participa en la neurogénesis. Mientras que el EPA previene la reducción de la neurogénesis y la apoptosis, actuando contra las vías



relacionadas con la respuesta inmune innata, por lo que en conjunto tienen propiedades neuroprotectoras (12,13).

La deficiencia de omega 3 se ha relacionado con anomalías neurológicas entre las cuales se encuentran la depresión y la ansiedad, ya que se ven afectados los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos principalmente por el cambio en la estructura de la membrana lipídica de la célula y las funciones de los receptores en esta, resultando en una reducción de la neurotransmisión (14).



**Figura 3:** Metabolismo y funciones del DHA/EPA (13,29,30).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fluorosis endémica es un problema de salud pública que se presenta en todo el mundo, incluyendo México. La presencia y gravedad de la fluorosis está determinada por factores como la dosis y el tiempo de exposición a fluoruros, que son los responsables de la toxicidad (21,22).

El estado de Aguascalientes es una zona con alta prevalencia de fluorosis, presentando cifras de fluorosis dental superior al 50% en niños de entre 9 y 11 años de edad y con concentraciones de fluoruros en el agua potable superiores a las establecidas por la Organización Mundial de la Salud y la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) (1,20,22).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las principales manifestaciones de la fluorosis se dan a nivel dental y esquelético. En dientes, a manera de manchas en el esmalte causadas por la porosidad debido a la hipomineralización del esmalte. Los huesos son el principal sitio de acumulación de fluoruros ya que estos normalmente aumentan su fortaleza, al aumentar la absorción de calcio; sin embargo, si la deposición de fluoruros en huesos aumenta por una mayor ingesta de estos, los huesos se vuelven quebradizos por la formación de cristales de apatita. Esto puede causar osteoesclerosis, osteoporosis, osteomalacia, formación de exostosis y fracturas patológicas (21,23).

Existe un tercer grupo de manifestaciones en la fluorosis que están menos estudiadas que las dentales y esqueléticas, que son las que se dan en tejidos blandos conocidas como no esqueléticas. El mecanismo por el cual se dan no se conoce con claridad, sin embargo, existe la probabilidad de que se deba a la apoptosis celular causada por el estrés oxidativo. Debido a la unión de fluoruros con el calcio se genera una interrupción del metabolismo de calcio, proteínas, fosforilación oxidativa, glucólisis, coagulación y neurotransmisión. Esto en conjunto provoca la oxidación celular mediada por especies reactivas de oxígeno junto con la destrucción de antioxidantes. Las manifestaciones dadas por este proceso son principalmente en sistema nervioso (21,23).

El flúor puede penetrar en el cerebro y acumularse en sus tejidos, ya que es un componente normal en el líquido cefalorraquídeo; por lo que las altas concentraciones de este causan daños directos en este órgano y es posible que su ingesta excesiva cause efectos neurotóxicos con manifestaciones en la conducta (21).

El diagnóstico de la fluorosis no es muy común, debido a que no se reconoce de manera correcta y oportuna sus manifestaciones. Actualmente no existe una cura para la fluorosis, en su lugar se implementan tratamientos para reducir sus manifestaciones y/o complicaciones, como lo son la suplementación de calcio, vitamina C y vitamina D (23).

El mecanismo propuesto por el cual se dan las alteraciones neurológicas permite conocer los posibles efectos terapéuticos del ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA); ya que estos influyen en la actividad de los neurotransmisores y la transducción de señales de estos, así como sus propiedades antioxidantes que ayudan a disminuir el estrés oxidativo (29).

### **3.1 Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto del ácido DHA y el EPA sobre niveles de serotonina (5-HT) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); así como la presencia de conductas similares a la ansiedad en un modelo de fluorosis aguda en ratones BALB/c?



## 4. JUSTIFICACIÓN

La fluorosis es un problema de salud pública poco atendido y con alta incidencia en zonas endémicas de México, el cual causa problemas a distintos sistemas del cuerpo y que algunos de ellos a su vez desarrollan problemas a la salud irreversibles que afectan la calidad de vida de la población y a su vez generan un alto costo al sector salud, solamente para el tratamiento de sus manifestaciones, ya que actualmente no existe una cura establecida para la fluorosis. Se ha observado que la fluorosis tiene relación con problemas de salud mental de gran importancia. Esto aumenta la necesidad evidente de un tratamiento que logre atenuar las manifestaciones causadas por esta toxicidad.

La fisiopatología y los mecanismos por los cuales causa los daños anteriormente mencionados sugieren un posible tratamiento protector para la fluorosis por medio de la administración de DHA y EPA, los cuales, por sus propiedades ampliamente descritas, se sospecha de un posible efecto terapéutico que pueda atenuar los efectos deletéreos causados por el exceso de fluoruros.

El presente estudio se enfocó en evaluar los efectos que tiene la suplementación de DHA y EPA en las alteraciones neurológicas de un modelo murino expuesto a flúor de manera aguda.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del DHA y el EPA sobre los valores de 5-HT, BDNF y conductas similares a ansiedad y depresión en un modelo de fluorosis en ratones BALB/c.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analizar los efectos de la fluorosis aguda en pruebas de comportamiento de presencia de conductas de ansiedad y depresión en ratones BALB/c.
- Analizar los efectos de la exposición aguda al flúor sobre los niveles de 5-HT y BDNF en un modelo murino.
- Describir el efecto del DHA y EPA en un modelo murino con fluorosis aguda en pruebas de comportamiento de presencia de conductas de ansiedad y depresión en ratones BALB/c.
- Describir el efecto del DHA y EPA en un modelo murino con fluorosis aguda sobre los niveles de 5-HT y BDNF en un modelo murino.

## 6. HIPÓTESIS

### 6.1 Hipótesis de investigación

- El DHA y el EPA mejoran los niveles de 5-HT y BDNF sobre en un modelo murino de fluorosis aguda.
- El DHA y el EPA disminuyen la presencia de conductas similares a ansiedad y depresión en un modelo murino de fluorosis aguda.

## 6.2 Hipótesis nula

- El DHA y el EPA no mejoran los niveles de 5-HT y BDNF sobre en un modelo murino de fluorosis aguda.
- El DHA y el EPA no disminuyen la presencia de conductas similares a ansiedad y depresión en un modelo murino de fluorosis aguda.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Diseño del estudio

Diseño experimental exploratorio comparativo.

### 7.2 Población y lugar de estudio

Se utilizaron 40 ratones macho de la cepa BALB/c de 10 semanas de edad, adquiridos del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

### 7.3 Cálculo de tamaño de la muestra

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

### 7.4 Intervención propuesta

#### 7.4.1 Generalidades

Previo al inicio del estudio, los ratones llevaron un periodo de dos semanas de acondicionamiento al contacto humano, con el objetivo de limitar el estrés que puede generar dicha manipulación. Una vez concluido este periodo, el estudio se llevó a cabo en un periodo de 30 a 45 días consecutivos, se conformaron 4 grupos de 10 ratones los cuales fueron separados por grupo (Tabla 2). Todos los ratones tuvieron acceso libre a agua potable y una dieta estándar LabDiet 5001\* (24.1% de proteína y 15 ppm de fluoruros) a lo largo del experimento.

**Tabla 2:** *Protocolo experimental*

Grupo	Intervención	Periodo
Control	Sin intervención	30 días
DHA/EPA	Administración oral de DHA/EPA	45 días
NaF	Administración oral de fluoruro de sodio (NaF)	30 días
NaF + DHA/EPA	Administración oral de NaF + DHA/EPA	30 y 45 días

*DHA: Acido docosahexaenoico; EPA: Acido eicosapentaenoico; NaF: Fluoruro de sodio.*

El peso de los ratones de los 4 grupos se evaluó con una balanza analítica y se registró cada semana desde el inicio hasta el final del experimento.

#### 7.4.2 Estandarización de la dosis

La dosis administrada se estandarizó mediante la aplicación de una curva dosis-respuesta de acuerdo con los antecedentes de estudios previos en los cuales describen la metodología, con el fin de obtener resultados deletéreos en los órganos de interés, sin que este llegue a afectar los objetivos del proyecto.

### **7.4.3 Administración de fluoruro de sodio (NaF)**

La administración de flúor fue a manera de fluoruro de sodio por medio de una cánula intragástrica con una dosis de 12 mg por kilogramo de peso corporal disuelto en el agua destilada diariamente a lo largo del experimento y el volumen introducido fue de 1 ml/100 g de peso corporal mediante sonda, de acuerdo a la metodología señalada por Wei et al (12).

### **7.4.4 Administración de DHA y EPA**

Los grupos que recibieron el tratamiento con DHA/EPA por medio de una cánula intragástrica una dosis estipulada de 50 mg/kg, tomando en cuenta una dosis efectiva en el humano de 1.8-2.1 g/d de DHA y EPA (aceite de hígado de bacalao; Lysi); el volumen de ingesta diario fue de 50 microlitros, iniciando dos semanas previas a la ingesta de flúor y hasta el término de este (45 días).

### **7.4.5 Evaluación de conductas similares de ansiedad**

Posteriormente a los 30 días, a cada grupo se les aplicaron pruebas para evaluar la presencia de comportamiento similar a ansiedad y depresión. Las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo en una habitación tranquila y con iluminación. Los ratones se habituaron al entorno experimental durante dos horas antes de la evaluación.

#### *7.4.5.1 Prueba de campo abierto*

La Prueba de Campo Abierto (PCA) se utilizó para evaluar rasgos similares a la ansiedad en animales; usando The Panlab Infrared Actimeter, que está compuesto por una arena de 45 cm x 45 cm automatizada con dos marcos cuadrados con haces infrarrojos para la detección de la actividad, movimientos y levantamientos en dos patas del ratón. El material con el que el equipo está elaborado es aluminio y polipropileno. Durante la prueba los ratones se colocaron en el centro de la caja y se evaluó durante 5 minutos; en este tiempo se registraron las siguientes variables para analizarlas: los movimientos estereotípicos, la locomoción, distancia total, distancia recorrida en periferia, distancia recorrida en el centro y el número de veces que el ratón se erguía en dos patas. Entre cada experimento se limpió el equipo con etanol, antes del próximo ratón. Para la evaluación de la prueba se usó The Panlab software Actitrack (32).

#### *7.4.5.2 Laberinto elevado en cruz*

El Laberinto Elevado en Cruz (LEC) se utilizó para evaluar conductas similares a la ansiedad. Consta de un laberinto que se coloca a 61 cm sobre el suelo y se conforma de una plataforma central de 5 x 5 cm y cuatro brazos de 35 x 5 cm; dos de estos abiertos y dos cerrados por tres de los lados con paredes de 20 cm de alto. Los ratones se colocaron en el LEC y se evaluaron durante 5 minutos para registrar los siguientes comportamientos: tiempo que pasa en cada brazo, frecuencia de entrada a los brazos, número de erguimientos en dos patas y número de avistamientos hacia abajo. Entre cada experimento se limpió el equipo con etanol, antes del próximo ratón (33). Para la evaluación de esta prueba se usó el software Lince (34).

#### 7.4.5.3 Prueba de Nado Forzado

La Prueba de Nado Forzado (PNF) se usa en roedores para evaluar conductas similares a la depresión. Se realizó en un tanque cilíndrico de vidrio transparente, con dimensiones de 35 cm de alto, circunferencia de 49.4 cm y diámetro de 17.2 cm que no permitan que el ratón pueda salir durante la prueba. El volumen de agua se estableció de 20.5 cm como medida estándar en todas las pruebas considerando una altura en la que el ratón no toque el fondo del tanque con sus patas ni cola. El agua se mantuvo en un rango de temperatura de 23-25°C y se cambió entre cada ratón por agua limpia. La duración de la prueba fue de 7 minutos y se grabó con ayuda de una cámara apoyada en una estructura de metal inmóvil.

Una vez obtenido el video se analizaron los últimos 5 minutos de grabación, ya que durante los primeros dos, los ratones suelen estar muy activos y se podría considerar un sesgo en los resultados. La evaluación se realiza mediante los tiempos de inmovilidad, los de movilidad baja (considerado como los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote con la cabeza afuera del agua) y los de movilidad alta (35). Para la evaluación de esta prueba se usó The Panlab software Smart 3.0 (36).

#### 7.4.6 Evaluación de serotonina (5-HT) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Al finalizar las 6 semanas se sacrificaron a los ratones de los 4 grupos por medio de eutanasia por sobredosis anestésica, haciendo uso de pentobarbital sódico en una dosis de 100-150 mg/kg de peso, vía intravenosa o intraperitoneal. Para medir los niveles de 5-HT y BDNF, se extrajo cuidadosamente el hipocampo de los cerebros de los ratones de cada grupo; posteriormente se almacenaron a -80° C, se homogenizaron en un buffer de lisis utilizando un homogeneizador de tejidos y luego se incubaron a 4°C durante 1 minuto mientras se agitaban. Se centrifugaron los homogeneizados y se recolectaron los sobrenadantes. Las concentraciones totales de 5-HT y BDNF se midieron mediante un kit ELISA (Serotonin Research ELISA (ab133053, ABCAM), BDNF Research ELISA (LS-F2404, Biocompare) respectivamente, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

#### 7.5 Operacionalización de variables

Las variables que se usaron para el análisis estadístico del protocolo experimental se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA	INDICADOR
<b>Prueba de Campo Abierto</b>			
Movimientos estereotípicos	Cuantitativa	Razón	cm <sup>2</sup> /s
Locomoción	Cuantitativa	Razón	cm <sup>2</sup> /s
Distancia total recorrida	Cuantitativa	Razón	cm

Distancia recorrida en periferia	Cuantitativa	Razón	%
Distancia recorrida en centro	Cuantitativa	Razón	%
Número de erguimientos	Cuantitativa	Intervalo	Frecuencia
<b>Laberinto Elevado en Cruz</b>			
Número de entradas brazo abierto	Cuantitativa	Intervalo	Frecuencia
Número de entradas brazo cerrado	Cuantitativa	Intervalo	Frecuencia
Tiempo en brazo abierto	Cuantitativa	Razón	s
Tiempo en brazo abierto	Cuantitativa	Razón	s
Tiempo en centro	Cuantitativa	Razón	s
Número de erguimientos	Cuantitativa	Intervalo	Frecuencia
Número de abistamientos	Cuantitativa	Intervalo	Frecuencia
<b>Prueba de Nado Forzado</b>			
Actividad total	Cuantitativa	Razón	cm <sup>3</sup> /s
Tiempo inmóvil	Cuantitativa	Razón	%.
Tiempo de movilidad baja	Cuantitativa	Razón	%.
Tiempo de movilidad alta	Cuantitativa	Razón	%.
<b>Hipocampo</b>			
Serotonina (5-HT)	Cuantitativa	Razón	ng/ml
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	Cuantitativa	Razón	pg/ml

*m: metros; cm/s: centímetros por segundo; s: segundos; ng/ml: nanogramos por mililitro; pg/ml: picogramos por mililitro.*

## 7.6 Plan de análisis de resultados

Se realizó un análisis estadístico comparativo para determinar si DHA/EPA tienen un efecto terapéutico en un modelo de fluorosis en ratones BALB/c. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk; mientras que la homocedasticidad se evaluó con la prueba de Levene. Dependiendo la normalidad y homocedasticidad de los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) o Kruskal Wallis, con sus respectivas pruebas post hoc de Tukey y Dunn, utilizando los programas estadísticos R versión 4.1.2 "Bird Hippie" y Prisma versión 8.0 tomando en cuenta un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto de investigación se realizó con la aprobación del comité de ética para el uso de animales en la docencia y la investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos, bajo condiciones estándar de temperatura, humedad y con libre acceso a comida y agua. (Ad Libitum). Cumpliendo con los lineamientos que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio."(37).

### 9. RECURSOS PARA EL ESTUDIO

- **Recursos Humanos.** Técnicos del laboratorio de investigación en nutrición
- **Recursos materiales.** Cajas de acrílico y tapas de acero inoxidable para ratón, bebederos, alimento LabDiet 5001, fluoruro de sodio, aceite de hígado de bacalao, cánula de acero inoxidable, jeringas, guantes de látex, báscula, campo abierto automatizado, laberinto elevado en cruz de acrílico, cilindro de vidrio, tubos eppendorf, tubos falcón, ultracongelador, centrifuga, ultrasonicador, kits de ELISAS, lector de microplacas de ELISA.
- **Recursos Financieros.** Financiamiento proporcionado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes. No existe conflicto de interés

### 10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

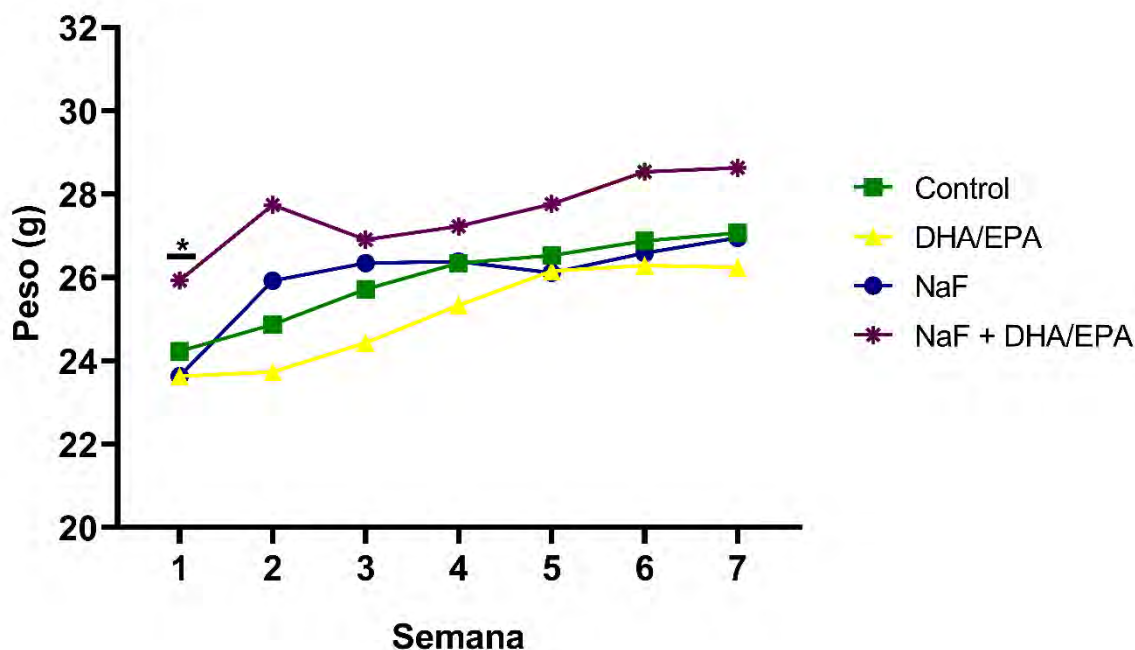
Actividad	ene-22	feb-22	mar-22	abr-22	may-22	jun-22	jul-22	ago-22	sep-22	oct-22	nov-22	dic-22	ene-23	feb-23	mar-23	abr-23	mav-23	jun-23	jul-23	ago-23	sep-23	oct-23	nov-23	dic-23
Revisión bibliográfica	■	■																						
Establecimiento de objetivos			■																					
Primer borrador de protocolo				■	■																			
Someter el protocolo al comité de ética					■																			
Estandarización de la técnica						■	■																	
Estandarización de la dosis								■	■															
Inicio de protocolo											■	■												
Primer informe de avances												■												
Pruebas de conducta													■											
Sacrificios													■	■										
Procesamiento de muestras															■									
Análisis de pruebas de conducta																■	■							
Segundo informe de avances																		■						
Estructurar bases de datos																			■	■				
Análisis estadístico																					■			
Descripción de los resultados																						■	■	
Informe final																								■



## 11. RESULTADOS

### 11.1 Registro semanal del peso de los ratones

Se registró por semana el peso individual de los ratones de cada grupo, para la administración de las dosis de NaF y DHA/EPA (Figura 4). El primer pesaje se les realiza a los ratones con 8 semanas de edad para finalizar con 14 semanas de edad conforme el periodo experimental transcurre; el peso de los grupos en el primer pesaje se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos DHA/EPA y NaF contra el grupo NaF + DHA/EPA. Los pesajes 1 y 2 corresponden a las semanas de adaptación para el grupo Control y el grupo NaF; mientras que para los grupos que se les administró con DHA y EPA, el primer pesaje coincide con el inicio de dicha administración. El tercer pesaje coincide con el inicio de la administración de NaF para los grupos NaF y NaF + DHA/EPA en el que los grupos no tuvieron diferencias estadísticas significativas. En el séptimo y último pesaje de los grupos no se tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

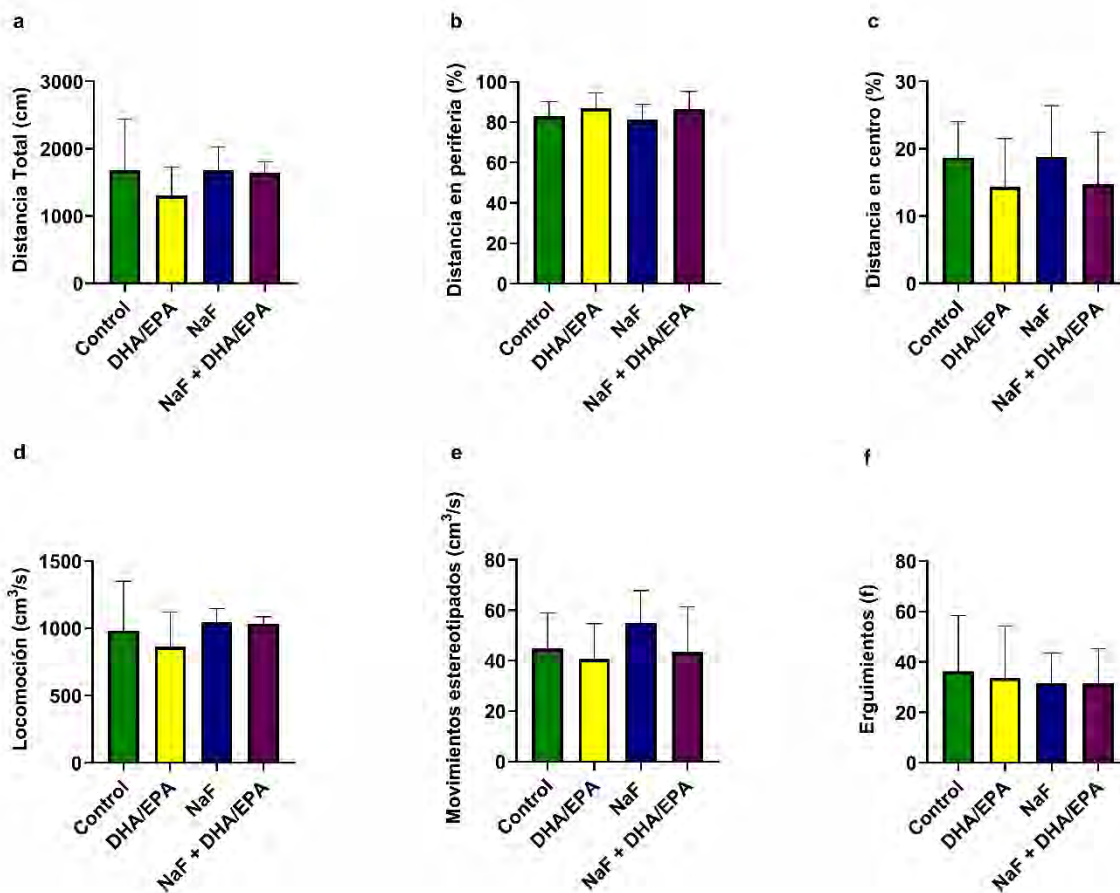


**Figura 4:** Registro semanal del peso de los ratones por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA). Se observa diferencia estadísticamente significativa en la semana 1 entre los grupos DHA/EPA y NaF + DHA/EPA; así como entre los grupos NaF y NaF + DHA/EPA; en la semana 2 existe diferencia significativa entre los grupos DHA/EPA y NaF + DHA/EPA, al igual que en los grupos NaF y NaF + DHA/EPA. Análisis estadístico con prueba ANOVA. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo. \* $p < 0.05$ .



### 11.2 Conductas similares a la ansiedad en Prueba de Campo Abierto

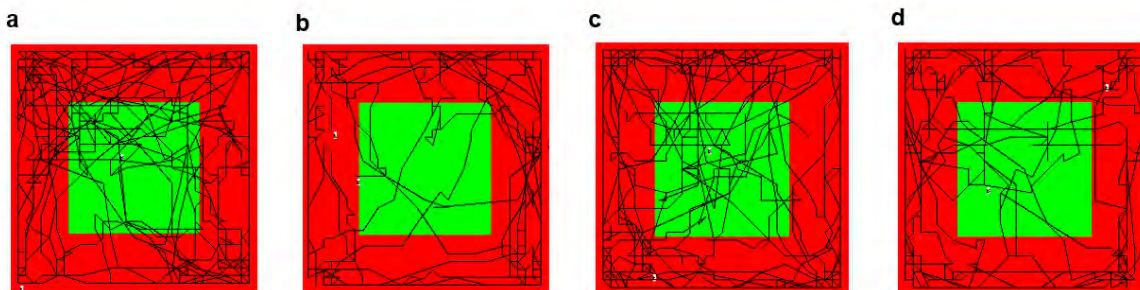
Al finalizar el periodo experimental la primera prueba de conducta que se aplicó a los grupos fue la PCA en la que se midieron las variables de distancia total recorrida (cm), porcentaje de distancia recorrida en la periferia del campo (%), porcentaje de distancia recorrida en el centro del campo (%), la locomoción de los ratones en el campo (cm<sup>3</sup>/s), los movimientos estereotipados que realizaban los ratones durante la prueba (cm<sup>3</sup>/s) y el número de veces que los ratones se erguían en dos patas (Figura 5). Ninguno de los resultados de esta prueba mostró diferencia entre los grupos.



**Figura 5:** Resultados de la prueba de campo abierto por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA); a: Distancia total, b: Distancia en centro, c: Distancia en periferia, d: Locomoción, e: Movimientos estereotipados y f: Levantamientos. No hay diferencia significativa estadística entre los grupos para ninguna de las variables. Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y desviación estándar (b, c, e y f) y Kruskal Wallis con datos presentados como mediana y rango intercuartílico (a y d). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

Para variables como distancia en periferia, los datos obtenidos son bastante similares entre los grupos; sin embargo, se pueden observar ciertas tendencias en otras variables como en la distancia total recorrida en las que el grupo DHA/EPA

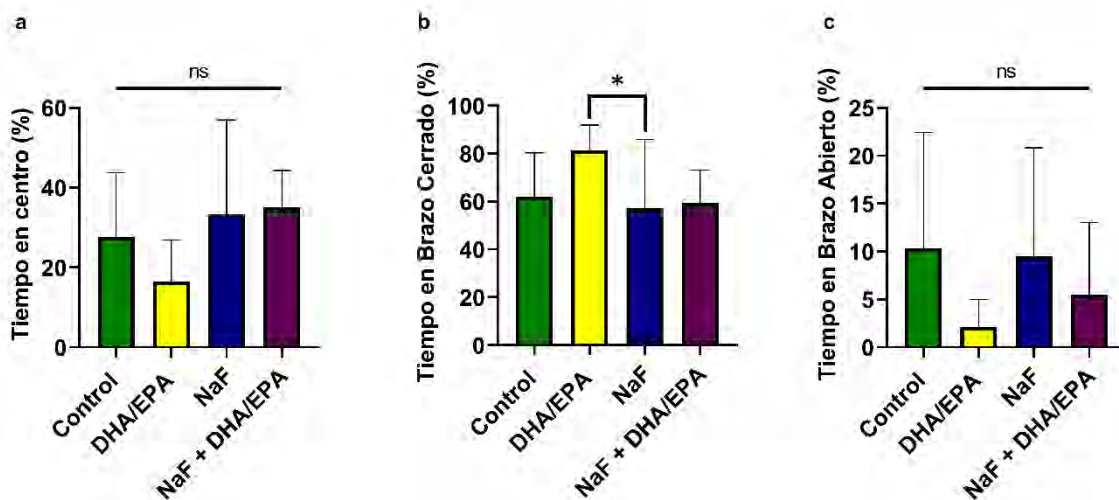
obtuvo valores menores al resto de los grupos, así como en la distancia en centro, en donde al igual que el grupo NaF + DHA/EPA tuvieron un menor porcentaje de recorrido en esta zona, este comportamiento también se puede observar en el mapeo de los recorridos en el campo (Figura 6). Por otro lado, los movimientos estereotipados fueron mayores en el grupo NaF que en el resto de los grupos, mientras que el mismo grupo realizó un menor número de erguimientos.



**Figura 6:** Recorridos en la prueba de campo abierto por grupo. a: Control, b: DHA/EPA, c: NaF y d: NaF + DHA/EPA. Imágenes generadas por The Panlab software Actitrack.

### 11.3 Conductas similares a la ansiedad en Prueba de Laberinto Elevado en Cruz

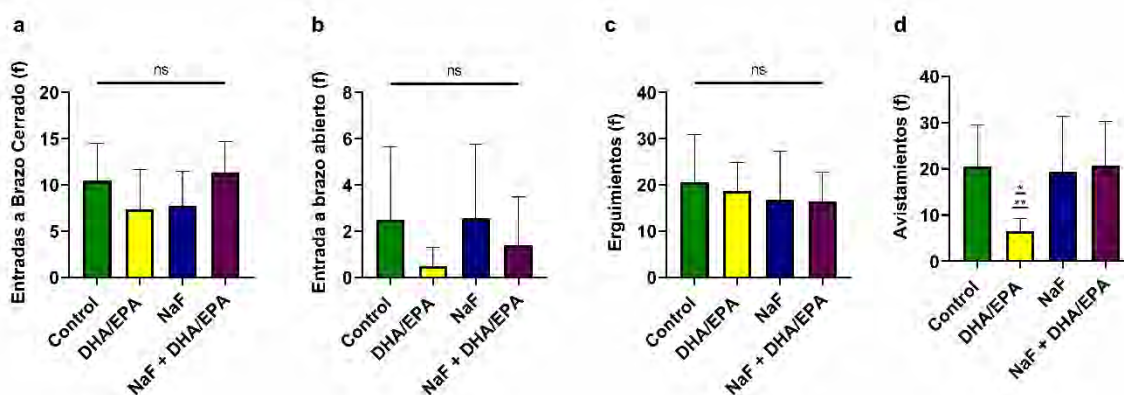
Pasadas 24 horas, se realizó el LEC de la cual se obtuvieron variables como: tiempo en centro (%), tiempo en brazo cerrado (%), tiempo en brazo abierto (%), número de entradas a brazo cerrado, número de entradas a brazo abierto, número de erguimientos en dos patas (f) y el número de avistamientos hacia abajo que realizó el ratón (f) (Figura 7 y 8).



**Figura 7:** Resultados de posición en laberinto elevado en cruz por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA); a: Tiempo en centro, b: Tiempo en brazo cerrado, c: Tiempo en brazo abierto. No hay diferencia estadísticamente significativa en las variables de tiempo en centro (a) y tiempo en brazo abierto (c). Existe diferencia estadísticamente significativa en el tiempo en brazo cerrado (b) entre los grupos DHA/EPA y NaF ( $p < 0.05$ ).

Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y desviación estándar y prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

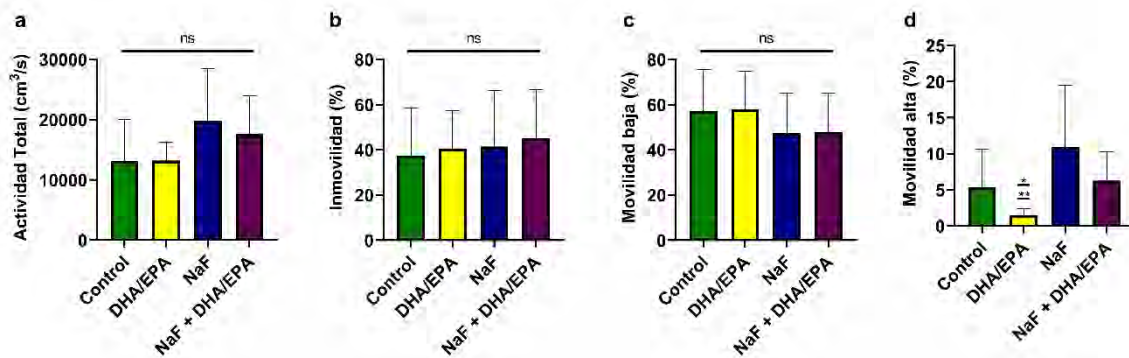
No hubo diferencia entre los grupos en el tiempo que pasaron en el centro o el brazo abierto del laberinto, a diferencia del brazo cerrado en el grupo DHA/EPA permaneció 81.42% del tiempo de la prueba en dicho brazo, en comparación con los ratones del grupo NaF los cuales pasaron un 57.12 % ( $p 0.0488$ ). En los eventos medidos como conductas similares a la ansiedad, no se obtuvo diferencia en las variables de entradas a los distintos brazos o levantamientos en los grupos; por otro lado, la media del número de avistamientos hacia abajo fue menor en el grupo de DHA/EPA con 6.50, en comparación con 20.50 del grupo Control ( $p 0.0114$ ), 19.44 del grupo NaF ( $p 0.0214$ ) y 20.70 del NaF + DHA/EPA ( $p 0.0081$ ).



**Figura 8:** Resultados de evento en laberinto elevado en cruz por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA); a: Entrada a brazo cerrado, b: Entrada a brazo abierto, c: Levantamientos, d: Asomarse abajo. No hay diferencia estadísticamente significativa en las variables de entrada a brazo cerrado (a), Entrada a brazo abierto (b) o levantamientos (c). Existe diferencia estadísticamente significativa en el número de veces que el ratón se asomó hacia abajo (d) entre los grupos DHA/EPA en comparación con el grupo Control, NaF ( $p < 0.05$ ) y NaF+ DHA/EPA ( $p < 0.01$ ). Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y desviación estándar y prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

#### 11.4 Conductas similares a depresión en Prueba de Nado Forzado

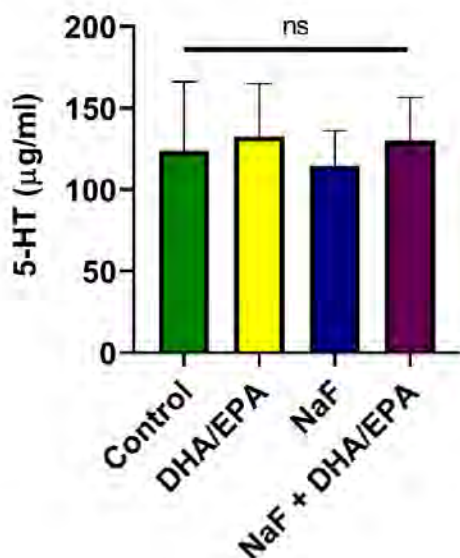
En la prueba de FST se midió la actividad total ( $\text{cm}^3/\text{s}$ ), el tiempo de inmovilidad (%), el tiempo de movilidad baja (%) y el tiempo de movilidad alta (%) (Figura 9). En las variables de actividad total, tiempo de inmovilidad y tiempo de movilidad baja no se observaron diferencias entre los grupos; caso contrario en la media de porcentaje de tiempo de movilidad alta durante la prueba, en este el grupo DHA/EPA tuvo 1.48 % el cual fue menor en comparación con el grupo NaF que tuvo 10.94 % ( $p 0.0012$ ) y el grupo de NaF + DHA/EPA con 7.12 % ( $p 0.0337$ ).



**Figura 9:** Resultados de la prueba de nado forzado por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA); a: Actividad Total, b: Inmovilidad, c: Movilidad baja, d: Movilidad alta. No hay diferencia significativa estadística entre los grupos para las variables de actividad total, inmovilidad y movilidad baja. Existe diferencia estadísticamente significativa en la variable de movilidad alta entre los grupos DHA/EPA y NaF ( $p < 0.01$ ) y los grupos DHA/EPA y NaF + DHA/EPA ( $p < 0.05$ ). Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y desviación estándar (b y c), Kruskal Wallis con datos presentados como mediana y rango intercuartílico (a y d) y prueba de comparación múltiple de Dunn. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

### 11.5 Evaluación de los niveles de 5-HT en hipocampo

Se evaluaron los niveles de 5-HT ( $\mu\text{g/ml}$ ), en los cuales no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, a pesar de que el grupo NaF presenta  $115.0 \mu\text{g/ml}$ , lo que es menor que el resto de los grupos (Control  $123.7 \mu\text{g/ml}$ , DHA/EPA  $132.6 \mu\text{g/ml}$ , NaF + DHA/EPA  $130.1 \mu\text{g/ml}$ ) (Figura 10).

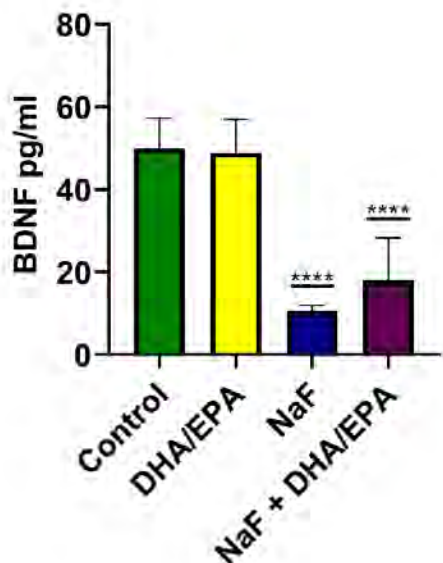


**Figura 10:** Resultados de los niveles de 5-HT por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA). No hay diferencia significativa estadística entre los grupos. Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y error estándar,  $n=5$ . Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.



### 11.6 Evaluación de los niveles de BDNF en hipocampo

Se evaluaron los niveles de BDNF (pg/ml) en hipocampo y se encontraron niveles de 10.65 pg/ml en el grupo NaF y 18.01 en el grupo NaF + DHA/EPA; ambos fueron menores a los del grupo Control de 49.97 pg/ml ( $p < 0.0001$ ) y el grupo DHA/EPA de 48.01 pg/ml ( $p < 0.0001$ ) como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11:** Resultados de los niveles de BDNF por grupo. (Control, DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA). Existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, NaF y NaF + DHA/EPA ( $p < 0.0001$ ) y los grupos DHA/EPA, NaF y NaF + DHA/EPA ( $p < 0.0001$ ). Análisis estadístico con prueba ANOVA con datos presentados de media y desviación estándar. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

## 12. DISCUSIONES

En la presente investigación se evaluó el efecto de la administración de NaF en ratones macho adultos de la cepa BALB/c; así como el posible efecto protector del DHA y EPA sobre conductas similares a la ansiedad y depresión aplicando pruebas de conducta.

La PCA es una de las más usadas para analizarlos comportamientos en los roedores; los cambios que se presentan en movimientos estereotipados y la locomoción pueden indicar alteraciones en los procesos neurológicos, ya que los animales con conductas similares a ansiedad tienden a moverse menos en el campo y aumentar los movimientos estereotipados (38). El tiempo que pasan en la periferia o en el centro del campo también es medido en esta prueba debido a que los ratones que cuentan con una tendencia natural conocida como tigmotaxis, la cual se caracteriza por la preferencia a permanecer cerca de las paredes en un campo abierto, ya que usando su sentido del tacto y el olfato construyen una representación espacial del ambiente, esta se ve afectada en estados ansiosos (39) los ratones con

comportamientos similares a la ansiedad prefieren permanecer en la periferia y evitar el centro; sin embargo, existen discrepancias respecto a lo que esto representa, ya que se piensa que los roedores tienen una aversión a los espacios abiertos para evitar a depredadores (38,40,41).

Una revisión realizada para evaluar la capacidad de la prueba para medir comportamientos similares a la ansiedad mediante el uso de la PCA concluyó que es un buen modelo cuando se pretende medir la ansiedad ante una situación estresante, más no resulta de la misma manera cuando se pretende medir un comportamiento ansioso patológico (42). Los resultados de la PCA no tuvieron diferencias significativas en las distintas variables medidas entre los grupos, por lo que la información no nos da información suficiente respecto al efecto de la administración de NaF y DHA/EPA en conductas similares a ansiedad.

La prueba de LEC también es usada para medir comportamientos similares a la ansiedad en roedores, de la misma manera se basa en la aversión a los espacios abiertos y elevados, que a la vez se compara con la curiosidad innata de explorar espacios novedosos del animal, que se refleja en el tiempo que pasa el ratón en los brazos tanto abiertos, como cerrados del laberinto, en teoría los ratones menos ansiosos pasan más tiempo explorando los brazos abiertos y los ratones con conductas similares a la ansiedad pasan más tiempo en los brazos cerrados (33).

Los resultados de esta prueba mostraron que el grupo DHA/EPA permaneció más tiempo en los brazos cerrados respecto al grupo al que se le administró NaF; así como el número de avistamientos hacia abajo fue menor en el grupo suplementado con DHA/EPA, en comparación con los demás grupos; esto podría representar mayores niveles de ansiedad en el grupo suplementado con DHA/EPA; sin embargo, existen estudios que relacionan este comportamiento con la naturaleza nocturna de los roedores y su preferencia a permanecer en espacios oscuros, el realizar la prueba en un lugar con luz brillante puede alterar los niveles basales de ansiedad de los ratones (43). Otros estudios en los que ratones con dietas deficientes en omega 3 tienden a pasar más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los ratones con una dieta adecuada; así como otros estudios reportan lo contrario. Un estudio realizado por Shoji y Tsuyoshi (44) comparó el tiempo que ratones los pasaban en los brazos abiertos entre un grupo el cual hacía la prueba por primera vez y un grupo que al que se le reaplicaba la prueba, en los cuales observaron que el segundo grupo presentaba un menor porcentaje de tiempo en brazo abierto; al realizar pruebas de los niveles de cortisol en sangre, se descartó que este comportamiento se debiese al estrés y se relacionó con una conducta de aprendizaje espacial cual y detección de peligro en los brazos abiertos. Las variaciones de los resultados pueden deberse a las condiciones en las que se realiza la prueba (43).

Así mismo, se complementaron estas pruebas con la aplicación de la prueba de nado forzado en la cual se evalúa la estrategia que usa el roedor ante una situación de presencia de estrés en la que no hay escape y si actúan de una manera

activa o pasiva. El uso de esta prueba para detectar comportamientos similares a la depresión, se basa la medición de la actividad del ratón durante la prueba, el intentar trepar en las paredes del cilindro o nadar se considera actividad elevada o de escape; mientras que el mínimo movimiento para mantener la cabeza fuera del agua o el flotar es una actividad pasiva. Tomando en cuenta esto múltiples estudios han hecho uso de este modelo evaluando la efectividad de fármacos antidepresivos, en los que se observó que los animales en este tipo de tratamiento mostraban un mayor tiempo de actividad elevada (45).

En los resultados de esta investigación se encontró diferencia en el porcentaje del tiempo de movilidad alta en donde el grupo DHA/EPA tuvo un menor tiempo respecto a los grupos NaF + DHA/EPA y el grupo NaF que fue el grupo con mayor actividad. La validez de la prueba para medir conductas similares a la depresión se ha entrado en controversia en años recientes, una revisión realizada por Commons *et al.* (46) en el 2017 sugirió que la prueba puede presentar sesgos al medir de mejor manera la estrategia para afrontar el estrés de los roedores ante una situación sin escape, lo que implicaría una gama más amplia de trastornos neuroconductuales. Modelos implementados en trastorno del espectro autista en roedores, han reportado un comportamiento alterado en respuesta al estrés agudo causado por la prueba de nado forzado, aumentando el tiempo de actividad elevada en la prueba (46). Este tipo de reportes permiten ampliar la aplicación de la prueba implementando nuevos términos que resulten más precisos en el tema de trastornos neuroconductuales, es importante mencionar que, en los resultados de esta prueba en el tiempo de movilidad alta, el grupo que fue expuesto al daño más el tratamiento fue el más cercano al grupo control, revirtiendo los cambios mostrados en el grupo al que se le provocó la toxicidad.

Respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de conducta realizadas, en los que el grupo de ratones suplementado con DHA/EPA presenta menos actividad o incluso aparenta tener un menor interés por explorar, existen múltiples estudios en lo que se reporta un aumento en la locomoción en animales con dietas deficientes de ácidos grasos omega 3, lo que sugiere que los roedores suplementados con omega 3 tienen una mayor capacidad de habituación a los nuevos espacios, por lo que tienden a deambular menor en la prueba de campo abierto, en comparación a grupos control o con dietas deficientes de dichos ácidos grasos (43).

La administración de NaF en los ratones causó cambios en el comportamiento, en esta investigación se hizo uso de tres pruebas de conducta para determinar la existencia de un daño conductual causado por la neurotoxicidad, los resultados obtenidos, no permiten tener una conclusión clara respecto al daño causado por el exceso de flúor; así como el posible efecto protector con la administración profiláctica y concomitante de DHA/EPA. Existen distintos factores que pudieron intervenir en los resultados, algunos ya se han expuesto; sin embargo, falta hacer mención del tiempo de duración del protocolo, en esta investigación se planteó una toxicidad aguda con un tiempo de administración del agente de 30 días,



lo que podría ser poco tiempo para presentar cambios conductuales importantes en los animales; ya que en el estudio realizado por Li *et al.* (47) evaluaron de la conducta en ratones expuestos a 68 mg de ion de flúor durante 90, 120 y 150 días y reportaron la existencia de alteraciones conductuales relacionadas con ansiedad y depresión importantes tras un periodo de 120 días. En este mismo estudio se implementaron múltiples pruebas de conducta para determinar el efecto del flúor en conductas similares a la ansiedad (prueba de reconocimiento de objetos novedosos, prueba de exploración luz/oscuridad, prueba de emergencia y prueba de laberinto en cero elevado) y conductas similares a la depresión (prueba de nado forzado y la prueba de suspensión de la cola), con las cuales puede enriquecerse el protocolo en futuras investigaciones (47).

En el estudio realizado por Chalon (48), se observó que una dieta deficiente de omega 3 durante 60 días en ratas, afectó principalmente la corteza frontal del cerebro la cual está implicada en la cognición, la motivación, la recompensa y la emoción, así como un desequilibrio en la función dopaminérgica y serotoninérgica, mismo que se relaciona con efectos conductuales implicados en la motivación, la respuesta a la recompensa y la capacidad de aprendizaje. Por su parte Umezawa *et al* (49). compararon una dieta rica en omega 3 contra una deficiente de manera crónica, en donde observaron que los ratones con deficiencia presentaron un mayor grado de hiperactividad y mayor actividad exploratoria. En general la deficiencia de omega 3 se ha visto relacionada con cambios en la fluidez de la membrana, la densidad de las vesículas en el hipocampo, así como modificaciones en la expresión y transcripción de genes.

Por otro lado, Adkins y Brunst (3) realizaron una revisión en la que evaluaron la neurotoxicidad de flúor, en la que encontraron que al igual que la deficiencia de omega 3, la exposición a NaF causa hiperactividad en los roedores; además de que existe una disminución en la memoria espacial, lo que podría explicar el aumento en la actividad exploratoria en las pruebas de conducta. Otra alteración que se ha reportado con la fluorosis ha sido la alteración en la fisión y fusión mitocondrial, que a su vez se relaciona con disminución en la autofagia y aumento de la de apoptosis; además la función mitocondrial participa en la salud mental, ya que juega un rol en la neurogénesis y la neuroplasticidad. Otra revisión realizada por Ren *et al.* (50) reveló que la mayor acumulación de fluoruros en el cerebro se da en hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo, esta acumulación es dependiente del tiempo y la dosis; estas zonas están relacionadas con funciones de aprendizaje, memoria, emociones y comportamiento. La falta de diferencias en los comportamientos en esta investigación podría deberse a el periodo de tiempo de la administración, ya que la mayoría de los estudios que reportan cambios implementaron una administración crónica y no aguda.

Debido a las múltiples controversias que existen en la aplicación de pruebas de conducta para determinar si existe un daño neurológico derivado de la administración de un agente; así como los distintos factores que pueden interferir en los resultados; es indispensable completar estos modelos con pruebas más

concretas que ayuden a complementar la información y tener una mejor interpretación de los datos.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de serotonina y factor neurotrófico derivado del cerebro, marcadores relacionados con el funcionamiento neurológico, la serotonina está implicada en la modulación del proceso neuropsicológico y regulando gran parte del comportamiento y la emociones (27); mientras que el BDNF regula el desarrollo y mantenimiento de la función normal del cerebro promoviendo la neurogénesis en el hipocampo, lo que mejora la actividad sináptica del SNC, que a su vez interfiere en procesos de memoria y comportamiento (11). Los resultados obtenidos en los niveles de 5-HT en hipocampo no mostraron diferencias entre los grupos, aunque puede observarse una tendencia en la que el grupo al que se le administró NaF tiene niveles más bajos, en comparación a los grupos Control, DHA/EPA y NaF + DHA/EPA, siendo estos dos últimos incluso más altos que el Control. Niveles bajos de serotonina en pacientes con diagnóstico de depresión han sido descritos en múltiples estudios, por lo que su medición es de utilidad para evaluar el funcionamiento neurológico relacionado con este trastorno (51). En el estudio realizado por Cao *et al.* en 2021, evaluaron el efecto de la administración de 24 mg/kg de NaF durante 8 semanas en ratones, se midieron los niveles de serotonina en la corteza del cerebro de los ratones y se encontró una notable disminución de las concentraciones de serotonina en el grupo con fluorosis respecto al grupo control; cabe mencionar que en este estudio la dosis aplicada de NaF, así como la duración del protocolo fue mayor que en esta investigación (52). A pesar de las tendencias mostradas en los niveles de serotonina en el hipocampo, no se pueden realizar inferencias debido a la falta de diferencias significativas en los grupos. En otros estudios se ha visto que la deficiencia de omega 3 reduce el proceso de neurotransmisión del sistema serotoninérgico afectando la fluidez de la membrana y las funciones receptoras relacionadas, resultando en una afectación en la estructura y función del cerebro (14).

Otro marcador que se midió en el hipocampo para evaluar el funcionamiento neurológico en el modelo fue el BDNF, en esta prueba los niveles encontrados en los grupos presentaron diferencias significativas importantes. El grupo Control y el grupo DHA/EPA tuvieron niveles de BDNF mayores en comparación a los grupos NaF y NaF + DHA/EPA, lo que es consistente con el estudio realizado por Niu *et al.* en el que midieron el efecto de distintas concentraciones de NaF en el agua bebible de ratones durante 60 días y reportaron una menor expresión de la proteína de BDNF en hipocampo a medida que la dosis de NaF aumentaba (53). Li *et al.* evaluaron la expresión de mRNA de BDNF y el receptor de serotonina 1A (5-HT1A) en ratones con fluorosis y reportaron una disminución en la expresión de mRNA de BDNF en el hipocampo y un aumento en la expresión de los receptores 5-HT1A tras 120 días de exposición a NaF. Los niveles de BDNF están relacionados con la presencia de ansiedad y depresión en algunos pacientes, por lo que la disminución de los niveles en el hipocampo de los ratones en esta investigación, sugieren que el daño causado por la fluorosis a nivel neurológico podría tener implicaciones en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los cambios conductuales presentados (47). La administración de NaF junto con DHA/EPA aumentó ligeramente los niveles de BDNF, más no lo suficiente para ser significativo.

El hipocampo juega un rol importante en el correcto funcionamiento neurológico en patologías como ansiedad y depresión, ya que interviene en funciones relacionadas con la plasticidad neuronal y la transmisión sináptica, por lo que las alteraciones en este representan un daño neurológico importante. En esta investigación se mostró una alteración en los niveles de BDNF causado por la administración de NaF; sin embargo, el tratamiento planteado con DHA/EPA, no logró restaurar los niveles a la normalidad.

### **13. CONCLUSIONES**

La fluorosis es un problema de salud pública a nivel mundial para el cual no se han buscado soluciones preventivas, por lo que es necesario encontrar maneras de proteger a la población de los daños neurológicos con los que se le relaciona. En el modelo de fluorosis aguda implementado en esta investigación ocasionó algunos cambios conductuales en los que los ratones mostraron hiperactividad que podrían relacionarse con conductas similares a la ansiedad, existe información que relaciona la neurotoxicidad causada por el flúor con dichas alteraciones. Por otro lado, existió una disminución en los niveles de BDNF tras la exposición a NaF, lo cual confirma un daño en la función del hipocampo causada por el flúor reportado en la bibliografía. El tratamiento con DHA/EPA no logró restaurar los niveles de BDNF; mientras que en algunos comportamientos tuvo un efecto contrario al NaF; lo que sugiere un efecto protector.

La exposición aguda de NaF no parece ser suficiente para mostrar cambios conductuales en los ratones, por lo que se sugiere que en futuros estudios se implemente una administración crónica del agente; así como complementar con más pruebas de conductuales más sensibles a cambios en comportamientos similares a ansiedad y depresión con modelos de toxicidad agudos. La capacidad de aprendizaje y la memoria son otras funciones que se reportan alteradas en estudios previos de fluorosis, sería interesante evaluarlas; ya que la administración con DHA/EPA tiene efectos benéficos en las mismas funciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Compendium of WHO and other UN guidance on health and environment 2022 update.
2. NOM\_127\_SSA1\_1994.
3. Adkins EA, Brunst KJ. Impacts of fluoride neurotoxicity and mitochondrial dysfunction on cognition and mental health: A literature review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 May 5];18(24):12884. Available from: /pmc/articles/PMC8700808/
4. Pramanik S, Saha D. The genetic influence in fluorosis. Vol. 56, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 157–62.
5. Johnston NR, Strobel SA. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. Vol. 94, *Archives of Toxicology*. Springer; 2020. p. 1051–69.
6. Wei W, Pang S, Sun D. The pathogenesis of endemic fluorosis: Research progress in the last 5 years. Vol. 23, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 2333–42.
7. Dec K, Łukomska A, Maciejewska D, Jakubczyk K, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, et al. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. Vol. 177, *Biological Trace Element Research*. Humana Press Inc.; 2017. p. 224–34.
8. Goschorska M, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Metryka E, Skórka-Majewicz M, Chlubek D. Potential role of fluoride in the etiopathogenesis of alzheimer's disease. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
9. Tauil CB, Rocha-Lima AD, Ferrari BB, da Silva FM, Machado LA, Ramari C, et al. Depression and anxiety disorders in patients with multiple sclerosis: Association with neurodegeneration and neurofilaments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2021;54(3):1–6.
10. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Nov 6];31(3):187–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471139/>
11. Colucci-D'amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2022 Nov 6];21(20):1–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33096634/>

12. Borsini A, Nicolaou A, Camacho-Muñoz D, Kendall AC, Di Benedetto MG, Giacobbe J, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect against inflammation through production of LOX and CYP450 lipid mediators: relevance for major depression and for human hippocampal neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2021 Nov 1;26(11):6773–88.
13. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. Vol. 7, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2015.
14. Janssen CIF, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. Vol. 53, *Progress in Lipid Research*. 2014. p. 1–17.
15. Adkins EA, Brunst KJ. Impacts of fluoride neurotoxicity and mitochondrial dysfunction on cognition and mental health: A literature review. Vol. 18, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI; 2021.
16. Afonso M, Buzalaf R, Whitford GM. Fluoride and the Oral Environment. Vol. 22, *Monogr Oral Sci*. Basel, Karger. 2011.
17. ¿Qué es el fluoruro y para qué sirve? [Internet]. Available from: <http://ods.od.nih.gov/HealthInformation/RecursosEnEspanol.aspx>.
18. Cantoral A, Luna-Villa LC, Mantilla-Rodriguez AA, Mercado A, Lippert F, Liu Y, et al. Fluoride Content in Foods and Beverages From Mexico City Markets and Supermarkets. *Food Nutr Bull*. 2019 Dec 1;40(4):514–31.
19. Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: An updated review. Vol. 18, *Environmental Health: A Global Access Science Source*. BioMed Central Ltd.; 2019.
20. NOM\_127\_SSA1\_1994.
21. Perumal E, Paul V, Govindarajan V, Panneerselvam L. A brief review on experimental fluorosis. Vol. 223, *Toxicology Letters*. 2013. p. 236–51.
22. Dávila OG. Dental fluorosis in children from aguascalientes, mexico: A persistent public health problem. *Water (Switzerland)*. 2021 Apr 2;13(8).
23. Patil MM, Lakhkar BB, Patil SS. Curse of Fluorosis. *The Indian Journal of Pediatrics* 2018 85:5 [Internet]. 2018 Jan 3 [cited 2022 Aug 7];85(5):375–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12098-017-2574-z>
24. Gao Q, Liu YJ, Guan ZZ. Oxidative stress might be a mechanism connected with the decreased  $\alpha 7$  nicotinic receptor influenced by high-concentration of fluoride in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2008;22(4):837–43.



25. Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. In: *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. S. Karger AG; 2014. p. 18–25.
26. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. Vol. 309, *Neuroscience*. Elsevier Ltd; 2015. p. 1–16.
27. Berger M, Gray JA, Roth BL. The Expanded Biology of Serotonin. <https://doi.org/10.1146/annurev.med60042307110802> [Internet]. 2009 Mar 25 [cited 2022 Nov 6];60:355–66. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
28. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 1995 [cited 2022 Nov 29];17(2):169–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7760776/>
29. Shahidi F, Ambigaipalan P. 37 The Annual Review of Food Science and Technology is online at food. *Annu Rev Food Sci Technol* [Internet]. 2018;9:16–7. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317->
30. Saini RK, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. *Life Sci* [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2022 Dec 4];203:255–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29715470/>
31. Chamani S, Bianconi V, Tasbandi A, Pirro M, Barreto GE, Jamialahmadi T, et al. Resolution of Inflammation in Neurodegenerative Diseases: The Role of Resolvins. *Mediators Inflamm*. 2020;2020.
32. slu P. IR ACTIMETER [Internet]. Available from: [www.panlab.com](http://www.panlab.com)
33. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 69–74.
34. Gabin B, Camerino O, Anguera MT, Castañer M. Lince: Multiplatform Sport Analysis Software. *Procedia Soc Behav Sci*. 2012;46:4692–4.
35. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(58).
36. slu P. Leaflet LF0701F EXAMPLE OF APPLICATIONS SMART 3.0 : Simply Powerful! Both amazingly Advanced and Powerful, still the most User-Friendly Video-Tracking on the market! Focus your time and effort on your research, don't waste it with complex tools! [Internet]. Available from: [www.panlab.com](http://www.panlab.com)
37. NOM-062-ZOO-1999\_220801.



38. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 99–103.
39. Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. Vol. 61, *Behavioural Brain Research*. 1094.
40. Carola V, Olimpico FD', Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice [Internet]. Vol. 134, *Behavioural Brain Research*. 2002. Available from: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)
41. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. Vol. 463, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier; 2003. p. 3–33.
42. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. Vol. 463, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier; 2003. p. 3–33.
43. Fedorova I, Salem N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Oct;75(4–5):271–89.
44. Shoji H, Miyakawa T. Effects of test experience, closed-arm wall color, and illumination level on behavior and plasma corticosterone response in an elevated plus maze in male C57BL/6J mice: a challenge against conventional interpretation of the test. *Mol Brain*. 2021 Dec 1;14(1).
45. Bogdanova O V., Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. Vol. 118, *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc.; 2013. p. 227–39.
46. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. Vol. 8, *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society; 2017. p. 955–60.
47. Li X, Zhang J, Niu R, Manthari RK, Yang K, Wang J. Effect of fluoride exposure on anxiety- and depression-like behavior in mouse. *Chemosphere*. 2019 Jan 1;215:454–60.
48. Chalon S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Oct;75(4–5):259–69.
49. Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T. BRAIN RESEARCH Dietary  $\alpha$ -linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). 1995.

50. Ren C, Li HH, Zhang CY, Song XC. Effects of chronic fluorosis on the brain. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2022 [cited 2024 May 5];244:114021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114021>
51. Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. Vol. 38, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014. p. 173–92.
52. Cao Q, Wang J, Hao Y, Zhao F, Fu R, Yu Y, et al. Exercise Ameliorates Fluoride-induced Anxiety- and Depression-like Behavior in Mice: Role of GABA. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Oct 18];200(2):678–88. Available from: <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/article/10.1007/s12011-021-02678-2>
53. Niu R, Chen H, Manthari RK, Sun Z, Wang J, Zhang J, et al. Effects of fluoride on synapse morphology and myelin damage in mouse hippocampus. *Chemosphere*. 2018 Mar 1;194:628–33.

