

ARTÍCULOS ORIGINALES / *Originals*

## INFLAMACIÓN EN EL TEJIDO ÓSEO DE RATAS INDUCIDA POR FLUORURO DE SODIO.

Lucas R. Brun,<sup>1,3\*</sup> Stella M. Roma,<sup>1,2</sup> Fernando Pérez,<sup>2</sup> Alfredo Rigalli<sup>1,3</sup>

1) Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. 2) Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. 3) CONICET

### Resumen

El fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato de sodio (MFP) son compuestos que generan fluoruro, siendo capaces de aumentar la diferenciación y proliferación de precursores osteoblásticos. El NaF ha demostrado incrementar la densidad mineral ósea de la cadera y la columna vertebral, aunque todavía existen controversias en relación con la calidad del hueso neoformado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las modificaciones histopatológicas del hueso neoformado y los cambios morfométricos óseos bajo el tratamiento con NaF y MFP. Se utilizaron ratas hembras de 21 días de edad las que se dividieron en 3 grupos (n=8 por grupo): grupo control = 1 ml agua/día; grupo NaF = 80  $\mu$ mol NaF/día; y grupo MFP = 80  $\mu$ mol MFP/día. Se obtuvieron las

tibias y fémures para los siguientes análisis: 1. Análisis histomorfométrico a nivel del hueso trabecular (volumen óseo trabecular, espesor y ancho trabecular); 2. Análisis morfométrico de hueso cortical (área y ancho cortical, perímetro perióstico y endóstico); 3. Ensayo biomecánico de flexión a tres puntos; 4. Análisis histopatológico. Se halló que a nivel trabecular, tanto el NaF como el MFP mostraron aumento del volumen óseo. A nivel de la diáfisis ningún tratamiento modificó el ancho cortical y la carga de fractura a la flexión en ensayo a tres puntos no evidenció diferencias significativas entre los grupos. El análisis histopatológico de los huesos de ratas tratadas con NaF mostró trabéculas óseas de aspecto predominantemente inmaduro, numerosos osteoblastos activos, osteoclastos con mayor multinucleación y bandas de

\* Dirección postal: Laboratorio de Biología Ósea. Cátedra de Química Biológica. Santa Fe 3100, (2000) Rosario, SF, Argentina. Correo electrónico: [lbrun@unr.edu.ar](mailto:lbrun@unr.edu.ar)



fibrosis peritrabecular. Los animales tratados con MFP, por su parte, mostraron hueso en formación, de aspecto maduro, con un patrón más organizado. La falta de inflamación fue una característica distintiva respecto de huesos de ratas tratadas con NaF. La presencia de inflamación aguda en hueso de ratas tratadas con NaF podría explicar la falta de éxito en el tratamiento con esta droga.

**Palabras claves:** fluoruro de sodio; monofluorofosfato de sodio; tejido óseo; inflamación.

### Summary

#### **INFLAMMATION IN RAT BONE INDUCED BY SODIUM FLUORIDE.**

*Sodium fluoride (NaF) and sodium monofluorophosphate (MFP) are compounds that generate fluoride, being able to increase differentiation and proliferation of osteoblast. It has been demonstrated that NaF increases bone mineral density at the level of hip and spine, although there are still controversies regarding the quality of bone. The aim of this study was to evaluate the histopathological characteristics of bone tissue and bone morphometric differences under treatment with NaF and MFP. Experiments were carried out in female rats which were divided in 3 groups (n= 8 per group): control group = water 1 ml/day; NaF group = NaF 80 mmol/day, and MFP group = MFP 80 mmol/day. After that, the tibia and femur were obtained for the following analysis: 1. Histomorphometric analysis of trabecular bone (trabecular bone volume, trabecular thickness and trabecular width) 2. Morphometric analysis of cortical bone (cortical area, cortical width, periosteal and endosteal perimeter); 3. Biomechanical three-point bending test; 4. Histopathological analysis. NaF and MFP showed increased trabecular bone volume. At midshaft level the treatment did not modify the cortical*

*width and the fracture load in a three-point bending test showed no significant differences between groups. Histopathological analysis of the bones of rats treated with NaF showed an immature bone net, numerous active osteoblasts, osteoclasts with greater multinucleation and fibrosis peritrabecular. The animals treated with MFP showed bone with mature appearance and a more organized pattern. The lack of inflammation was a distinctive feature compared with bones of rats treated with NaF. The presence of acute inflammation in bone of rats treated with NaF could explain the lack of therapeutic success with this drug.*

**Key words:** sodium fluoride; sodium monofluorophosphate; bone tissue; inflammation.

### Introducción

El fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato de sodio (MFP) son compuestos que generan fluoruro, siendo capaces de aumentar la diferenciación y proliferación de precursores osteoblásticos<sup>1</sup> y por lo tanto útiles para el tratamiento de la osteoporosis.<sup>2,3</sup> El tratamiento con NaF o MFP produce aumento de la masa ósea; sin embargo, cuando se emplean dosis de flúor equivalentes el contenido de flúor óseo es mayor en animales tratados con MFP respecto de los animales tratados con NaF.<sup>4</sup> Asimismo se comprobó que, utilizando la mitad de la dosis de MFP, se alcanzan resultados similares que con el NaF. Esto indicaría que el MFP tendría el doble de biodisponibilidad de flúor,<sup>4,5</sup> atribuible a la absorción gástrica del MFP sin hidrolizar y, en consecuencia, una mayor cantidad de flúor ligado a proteínas.<sup>6</sup>

El NaF ha demostrado incrementar la densidad mineral ósea de la cadera y la columna vertebral, aunque todavía existen controversias en relación con la calidad del hueso neoformado.<sup>7</sup> El tejido óseo formado en presencia de fluoruro se encuentra escasamen-

te mineralizado y posee una organización histológica inadecuada, con alto contenido de osteoide,<sup>8</sup> con menor deformabilidad y mayor fragilidad.<sup>9</sup> Además el NaF presenta efectos adversos –como la gastritis– que dificultan la adhesión al tratamiento. Esto, junto al advenimiento de nuevas terapéuticas como los bisfosfonatos, provocó la disminución del uso del NaF en el tratamiento para la osteoporosis. Sin embargo, el flúor administrado como MFP a bajas dosis ha demostrado ser efectivo,<sup>10,11,12,13</sup> sin los efectos adversos del NaF.

El efecto del flúor sobre la masa ósea se comenzó a estudiar al detectar que personas que viven en zonas con mayor contenido de fluoruro en el agua de bebida presentan mayor densidad mineral ósea,<sup>14</sup> fenómeno que ha sido observado también en nuestro país.<sup>15</sup> En estos individuos, la ingesta continua de fluoruro no eleva la concentración plasmática de F, como cuando se administra en forma terapéutica.<sup>16,17</sup> En poblaciones donde el agua de bebida contiene 1 ppm de fluoruro, la frecuencia de fracturas femorales fue significativamente menor que en poblaciones con aguas sin fluoruro.<sup>18</sup> Esto sugiere que el fluoruro sería más activo sobre el tejido óseo en etapas tempranas de la vida y no tanto en la adultez, donde la eficacia en el tratamiento de la osteoporosis no ha podido ser confirmada.

El presente trabajo analiza la calidad del hueso formado bajo el tratamiento con NaF o MFP y sus efectos sobre la masa ósea, en ratas jóvenes normales, donde el mecanismo de acción del fluoruro a nivel del tejido óseo se puede estudiar sin la interferencia de una enfermedad.

### Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las modificaciones histopatológicas del hueso neoformado y los cambios morfométricos óseos bajo el tratamiento con NaF y MFP.

### Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas hembras de línea IIM/FM sublínea “m”<sup>19</sup> de 21 días de edad. Fueron alimentadas con dieta balanceada (calcio 1-1,2%, fosfato 0,5-0,9%, Gepasa, Argentina). Las ratas se mantuvieron con un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y temperatura de 24±1 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las guías de manejo y cuidado de animales.<sup>20</sup>

Los animales se dividieron en 3 grupos: grupo control (n=8) que recibió 1 ml agua/día; grupo NaF (n=8) que recibió 80 µmol NaF/día en 1 ml de agua; y grupo MFP (n=8) que recibió 80 µmol MFP/día en 1 ml de agua. En todos los casos la administración fue por vía orogástrica durante 30 días.

Después de 30 días de tratamiento las ratas fueron sacrificadas a través de una inyección intracardiaca de KCl bajo profunda anestesia general.

Se obtuvieron fémur y tibia derecha para realizar análisis morfométrico de hueso cortical e histomorfométrico a nivel del hueso trabecular. El fémur izquierdo se separó para realizar ensayo biomecánico de flexión a tres puntos para evaluar hueso cortical.

### Determinaciones a nivel del hueso trabecular

La tibia derecha se fijó en el formol *buffer* 10%, se descalcificó en EDTA 10% y se incluyó en parafina. Se obtuvieron secciones longitudinales de 5 µm de espesor con microtomo (Leitz Wetzlab, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E). Todas las determinaciones histomorfométricas<sup>21</sup> se realizaron en el tejido óseo trabecular, en un área de 2 mm<sup>2</sup> y a 1 mm del cartílago de crecimiento. Las observaciones se efectuaron con un microscopio óptico (Olympus, Japón), se obtuvieron imágenes digitales con una cámara fotográfica adaptada (Olympus, China) y se analizaron con el *software* ImageJ 1.40 (National Institute of Health, Maryland, USA). Se determinaron: Volumen total (TV, µm<sup>2</sup>), área



de hueso trabecular (BV,  $\mu\text{m}^2$ ) y superficie de hueso trabecular (BS,  $\mu\text{m}$ ). Con ello se calculó: volumen óseo trabecular (BV/TV, %) [ $\text{BV} \times 100 / \text{TV}$ ], espesor trabecular (Tb.Th,  $\mu\text{m}$ ) [ $2 / (\text{BS} / \text{BV})$ ] y número de trabéculas (Tb.N, 1/mm) [ $(\text{BV} / \text{TV}) / (\text{Tb.Th})$ ].

### Determinaciones a nivel del hueso cortical

Se realizaron secciones transversales de 500  $\mu\text{m}$  de la diáfisis femoral derecha, con una sierra de baja velocidad (IsoMet, Buehler Ltd, Illinois, USA). Se obtuvo una imagen digital a 4x con una cámara fotográfica (Olympus, China) adaptada a un microscopio óptico (Olympus, Japón) y las determinaciones se efectuaron sobre dicha imagen con el software ImageJ 1.40 (National Institute of Health, Maryland, USA). Se midieron de manera directa las siguientes variables: área de sección transversal (CS.Ar,  $\text{mm}^2$ ), área medular (Me.Ar,  $\text{mm}^2$ ), área cortical (CB.Ar,  $\text{mm}^2$ ), perímetro perióstico (Ps.Pm, mm), perímetro endóstico (Ec.Pm, mm) y ancho cortical (Ct.Wi, mm).<sup>21,22</sup> El área cortical se calculó como la diferencia entre el área de sección transversal y el área medular.

### Medidas biomecánicas

Se determinó la carga de fractura en ensayo de flexión a tres puntos del fémur izquierdo con un equipo servohidráulico Instron 4411 (Instron Corp, Norwood, MA, USA). La distancia de los puntos de apoyo fue de 11 mm, la fuerza de presión vertical se realizó a una velocidad constante de 0,254 mm/s.

### Análisis histopatológico

Se utilizó tibia derecha con idéntica preparación a la descrita para las mediciones a nivel del hueso trabecular. El examen de los cortes fue realizado por un médico patólogo, sin conocimiento previo del tratamiento que recibieron los animales. Se realizó un estudio cualitativo considerando la microarquitectura de las trabéculas óseas, distribución y aspecto microscópico de osteoblastos, osteocitos

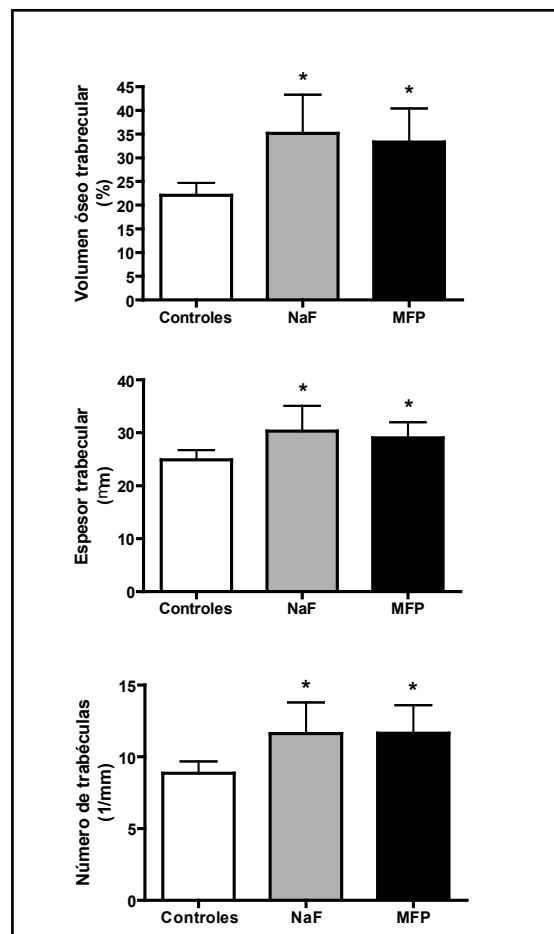
y osteoclastos, presencia de fibrosis y signos de inflamación.

### Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) con post test de Newman-Keuls (GraphPad Prism 2.0. GraphPad Software, San Diego, CA USA). Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### Resultados

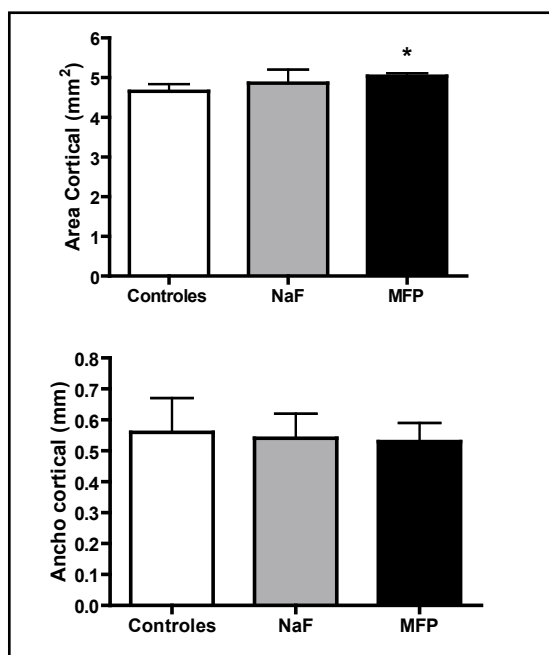
A nivel trabecular, tanto el NaF como el MFP mostraron aumento del volumen óseo trabecular a expensas de un incremento en el ancho y del número de trabéculas (Figura 1).



**Figura 1.** Volumen de hueso trabecular, espesor trabecular y número de trabéculas a nivel de la metafisis de la tibia (\* indica diferencia significativa respecto del grupo control).

A nivel de la diáfisis femoral, si bien ningún tratamiento modificó el ancho cortical, el MFP incrementó el área cortical (Figura 2), a expensas de un mayor perímetro endóstico y perióstico (datos no mostrados). La modificación de las variables mencionadas se reflejaron en un aumento del momento de inercia (C:  $4,58 \pm 0,02 \text{ mm}^4$ , NaF:  $5,34 \pm 0,65 \text{ mm}^4$  y MFP:  $5,92 \pm 0,07 \text{ mm}^4$ ).

La carga de fractura a la flexión en ensayo a tres puntos no evidenció diferencias significativas entre los grupos tratados y control (C:  $89,5 \pm 4,8 \text{ N}$ , NaF:  $82,3 \pm 5,9 \text{ N}$  y MFP:  $85,3 \pm 7,2 \text{ N}$ ).



**Figura 2.** Área y ancho cortical de la diáfisis femoral (\* indica diferencia significativa respecto del grupo control).

El análisis histopatológico de los huesos de ratas tratadas con NaF exhibió trabéculas óseas de aspecto predominantemente inmaduro, con lagunas osteocíticas voluminosas ocupados por osteocitos dispuestos al azar, de manera desalineada. Por fuera de las trabéculas, se observaron numerosos osteoblastos activos (Figura 3A) con citoplasmas abundantes, dispuestos en hileras dobles

y bandas de fibrosis peritrabecular (Figura 3B). Otro dato de jerarquía, fue la presencia recurrente de osteoclastos, con mayor multinucleación y citoplasmas vacuolados (Figura 3A). Además, como rasgo destacable se evidenció la existencia de múltiples focos de inflamación aguda, con áreas edematosas, necrosis abundante y leucocitos polimorfonucleares en cariorrexis. En algunos animales existía una interfase marcada de inflamación, entre el tejido hemocitopoyético y el hueso neoforado, que adquirió características de hueso ebúrneo (Figura 3C).

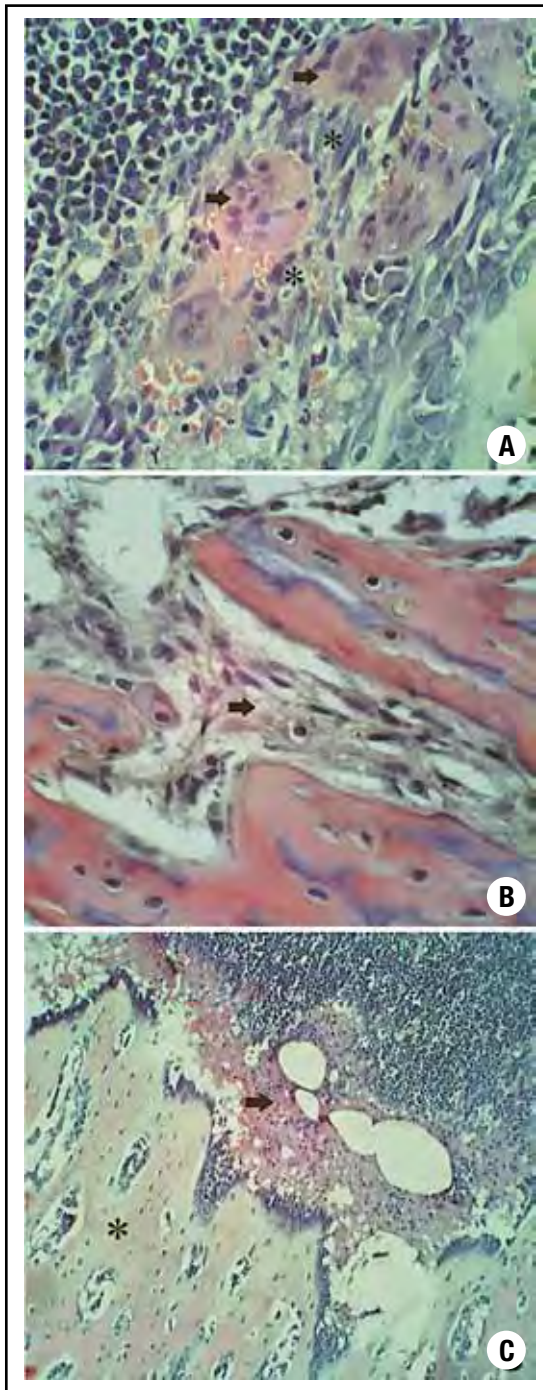
Los animales tratados con MFP, por su parte, mostraron hueso en formación, de aspecto maduro, con un patrón más organizado (Figura 4A), y con osteoblastos dispuestos en capas continuas de una célula de espesor (Figura 4B). La falta de inflamación y fibrosis fue una característica distintiva respecto de huesos de ratas tratadas con NaF.

### Discusión

Es conocido que el fluoruro al actuar sobre los osteoblastos aumenta la masa ósea de manera dosis dependiente.<sup>23,24</sup> En este trabajo tanto el NaF como el MFP mostraron un aumento del volumen óseo trabecular a expensas de un incremento en el ancho y del número de trabéculas. El análisis morfométrico del tejido cortical reveló que ningún tratamiento modificó el ancho cortical, mientras que el MFP incrementó el área cortical a expensas de un mayor perímetro endóstico y perióstico. La fuerza de fractura a la flexión realizada al 50% de la diáfisis del fémur no mostró diferencias entre los grupos tratados y control. Estos datos en conjunto sugieren que el fluoruro actuaría predominantemente a nivel del tejido trabecular, sin efectos importantes sobre el tejido cortical.

La calidad del hueso formado por el estímulo del fluoruro es discutida y atribuido a una falta de mineralización adecuada.<sup>25</sup> El análisis histopatológico de los huesos de ratas tra-





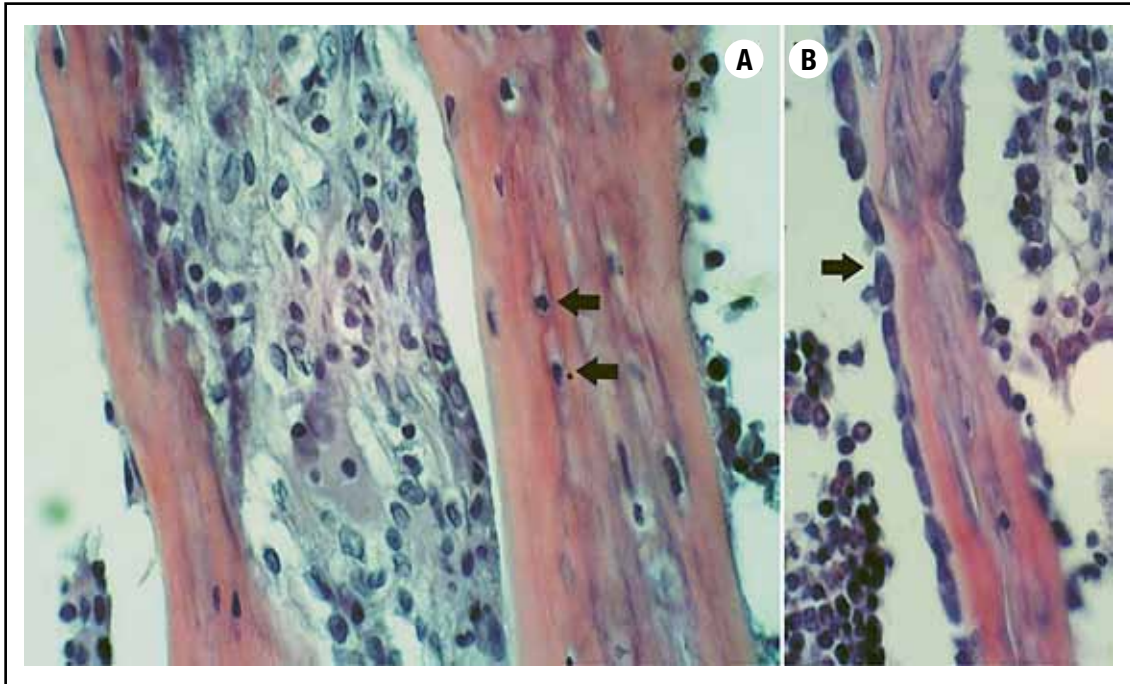
**Figura 3.** Tejido óseo hallado luego del tratamiento con NaF. **A)** Presencia de numerosos osteoclastos multinucleados y con citoplasmas vacuolados (flechas), entremezclados con abundantes células fusiformes (asteriscos). En el sector derecho de la fotografía se observan osteoblastos activos dispuestos en triple hilera; H&E, 450x. **B)** Bandas de fibrosis peritrabecular (flecha); H&E, 450x. **C)** Área de inflamación (flecha) ubicada entre el tejido hemocitopoyético y el hueso de aspecto ebúrneo (asterisco); H&E, 250x.

tadas con NaF evidenció trabéculas óseas de aspecto predominantemente inmaduro, circundadas por bandas de fibrosis y la presencia recurrente de osteoclastos, con mayor multinucleación y citoplasmas vacuolados. Además, como rasgo destacable se evidenció la existencia de múltiples focos de inflamación aguda. Todos estos hallazgos son indicativos de la formación de tejido óseo de menor calidad y podrían dar respuesta a la falta de efectividad del fluoruro, cuando se emplea como terapéutica en la osteoporosis postmenopáusia. Los animales tratados con MFP, por su parte, mostraron hueso en formación de aspecto maduro, con una microarquitectura más organizada. La falta de inflamación y fibrosis en los animales tratados con MFP fue una característica distintiva respecto de ratas tratadas con NaF.

Es conocido que las enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea, enfermedad celíaca y colitis ulcerosa –entre otras– producen pérdida de masa ósea. Por otra parte, la expresión de RANKL se incrementa por citoquinas proinflamatorias, glucocorticoides, deficiencia de estrógenos y aumento de PTH. Se ha observado que varias citoquinas tienen un efecto estimulatorio de la expresión de RANKL: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 e IL-17; mientras que existen otras como IFN- $\gamma$ , IL-4 y TGF- $\beta$  que mayoritariamente poseen un efecto inhibitorio de la osteoclastogénesis.<sup>26</sup>

Se ha demostrado que el fluoruro es citotóxico; sin embargo, los mecanismos celulares por los cuales se induciría este efecto sobre el tejido óseo son todavía desconocidos. En estudios realizados en fibroblastos humanos, el fluoruro aumentó las actividades de las caspasas 3, 8 y 9 y como consecuencia, el nivel de apoptosis de los mismos. Simultáneamente decrecieron los niveles de Bcl-2, involucrado en procesos anti-apoptóticos.<sup>27</sup>

Las respuestas inflamatorias siempre van acompañadas de la generación de estrés oxidativo y viceversa. Las especies reactivas



**Figura 4.** Hueso esponjoso de tibia de rata tratada con MFP. **A)** Trabéculas de aspecto maduro con osteocitos alineados (flechas); H&E, 250x. **B)** Trabéculas revestidas por osteoblastos activos distribuidos en hilera única (flecha); H&E, 400x.

del oxígeno (ROS) se producen, en su gran mayoría, en la cadena respiratoria cuando la cantidad de oxígeno es muy grande y existe un mal funcionamiento de la misma. En la actualidad es abundante y contradictoria la información que existe sobre los efectos del fluoruro sobre la producción de ROS y las enzimas involucradas en el metabolismo de las mismas. En ratas que ingirieron agua con 25 ppm de fluoruro, las actividades de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), así como las concentraciones de grupos sulfhidrilos y de glutatión decrecieron, mientras que la concentración de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, indicadoras de peroxidación lipídica) aumentaron.<sup>28</sup> En trabajos realizados con hombres que padecían fluorosis, se encontraron niveles elevados de TBARS y una disminución en la actividad de CAT y de la enzima glutatión-

S-transferasa (GST).<sup>29</sup> En pollos alimentados con dietas altas en contenido de fluoruro, las actividades de superóxido dismutasa y GPx disminuyeron marcadamente con un consecuente aumento en los niveles de TBARS.<sup>30</sup> En la mayoría de los trabajos, el fluoruro ejerce su acción en una manera dependiente de la dosis utilizada. Concentraciones de fluoruro 25-105  $\mu\text{mol/l}$  estimulan la actividad mitocondrial de osteoblastos aumentando los niveles de estrés oxidativo y de enzimas antioxidantes; mientras que concentraciones superiores a 600  $\mu\text{mol/l}$ , inhiben la proliferación celular y la actividad de las enzimas.<sup>31,32</sup> Por otra parte se ha demostrado que la administración crónica de MFP puede aumentar los niveles de alfa-macroglobulina, una proteína involucrada en el control de proteinasas y, como consecuencia, en la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado un efecto



beneficioso de la administración de MFP en el progreso de la pancreatitis experimental en ratas.<sup>33,34</sup> El aumento de estructuras químicas con reactividad con anticuerpo anti-alfa-macroglobulina ha sido demostrado en ratas tratadas con MFP.<sup>22</sup> El aumento local de esta antiproteinasa podría ser una de las causas de la falta de efecto inflamatorio en ratas tratadas con MFP.

Las diferencias histológicas halladas con los tratamientos con NaF y MFP confirmarían que tienen un mecanismo de acción diferente. La presencia de inflamación aguda en hueso de ratas tratadas con NaF podría explicar la falta de éxito en el tratamiento de la osteoporosis humana con esta droga. Se están realizando

medidas de enzimas antioxidantes, marcadores de estrés oxidativo y consumo de oxígeno en animales intactos, tejidos y mitocondrias con concentraciones de flúor similares a las halladas *in vivo* durante el tratamiento con NaF.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por CONICET (PIP 462). Agradecemos a Lorena Brance y Brenda Fina por la revisión del manuscrito y a laboratorios Gador S.A. por la utilización del Instron 4411.

(Recibido: diciembre de 2011. Aceptado: enero de 2012)

#### Referencias

- 1 Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science* 1983; 222: 330-2.
- 2 Briançon D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am* 1981; 12: 629-48.
- 3 Resch H, Libanati C, Talbot J, et al. Pharmacokinetic profile of a new fluoride preparation: sustained-release monofluorophosphate. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 7-11.
- 4 Rigalli A, Ballina JC, Beinlich AD, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetic differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 762-6.
- 5 Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996; 46: 531-3.
- 6 Rigalli A, Cabrerizo MA, Beinlich AD, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 651-5.
- 7 Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 802-9.
- 8 Vigorita VJ, Suda MK. The microscopic morphology of fluoride induced bone. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 177: 274-82.
- 9 Stein JD, Granik G. Human vertebral bone: relation of strength, porosity and mineralization to fluoride content. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 189-94.
- 10 Rubin CD, Pak CY, Adams-Huet B, Genant HK, Li J, Rao DS. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2325-33.
- 11 Reginster JY, Meurmans L, Zegels B, et al. The effect of sodium monofluorophosphate



- plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; 129: 1-8.
- 12 Vestergaard P, Jorgensen NR, Schwarz P, Mosekilde L. Effects of treatment with fluoride on bone mineral density and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2008; 19: 257-68.
- 13 Ringe JD, Setnikar I. Monofluorophosphate combined with hormone replacement therapy in postmenopausal osteoporosis. An open-label pilot efficacy and safety study. *Rheumatol Int* 2002; 22: 27-32.
- 14 Bernstein DS, Sadowsky N. Prevalence of osteoporosis in high and low fluoride areas in North Dakota. *JAMA* 1966; 198: 499-504.
- 15 De la Sota M, Puche RC, Rigalli A, Fernández LM, Benassati S, Boland R. Modificaciones en la masa ósea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahía Blanca con alta ingesta espontánea de flúor. *Medicina* 1997; 57: 417-20.
- 16 Waterhouse C, Taves D, Munzer A. Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption. *Clin Science* 1980; 58: 145-52.
- 17 Rigalli A, Ballina JC, Beinlich A, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative mass increasing activity of both compounds in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 762-6.
- 18 Simonen O, Laitinen O. Does fluoridation of drinking water prevent bone fragility and osteoporosis? *Lancet* 1985; 2: 432-3.
- 19 Font MT, Garroq O, Martínez SM, et al. The imbred IIM/Fm stock. *Rat Newslett* 1991; 25: 28-9.
- 20 Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. www.ccac.ca
- 21 Parfitt AM, Drezner AK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. *JBMR* 1987; 2: 595-609.
- 22 Brun LR, Pera L, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 1-6.
- 23 Rich C, Ensink J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature* 1961; 191: 184-5.
- 24 Balena R, Kleerekoper M, Foldes JA, et al. Effects of different regimens of sodium fluoride treatment for osteoporosis on the structure, remodeling and mineralization of bone. *Osteoporos Int* 1998; 8: 428-35.
- 25 Carter DR, Beaupré GS. Effects of fluoride treatment on bone strength. *J Bone Miner Res* 1990; 5: S177-84.
- 26 Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 2009; 201: 309-20.
- 27 Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, et al. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicol* 2008; 243: 340-7.
- 28 Inkielewicz I, Rogowska M, Krechniak J. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to fluoride and ethanol. *Fluoride* 2006; 39: 53-9.
- 29 Kalyanalakshmi P, Vijayabhaskar M, Dhananjaya Naidu M. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status of adult males with skeletal fluorosis in Andhra Pradesh, India. *Fluoride* 2007; 40: 42-5.
- 30 Chen T, Cui H, Cui Y, Bai C, Gong T. Decreased antioxidant activities and oxidative stress in the spleen of chickens fed on high-fluorine diets. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30: 1282-6.
- 31 Jin XQ, Xu H, Shi HY, Zhang JM, Zhang HQ. Fluoride-induced oxidative stress of osteoblasts and protective effects of baicalein against fluoride toxicity. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116: 81-9.
- 32 Xu H, Wang CH, Zhao ZT, Zhang WB, Li GS. Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem* 2008; 123: 109-15.



- 33 Di Loreto VE, Roma SM, Menoyo I, Rigalli A. Effect of the administration of monofluorophosphate on alpha-macroglobulin levels and the clinical course of pancreatitis in rats. *Arzneimittelforschung* 2008; 58: 136-40.
- 34 Roma SM, Di Loreto VE, Rigalli A. Effect of the treatment with monofluorophosphate on survival and tissular damage in rats with pancreatitis. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2010; 40: 130-5.
- 

*La Argentina no tendrá un destino nacional si acepta ser un país mediocre.*

FELIPE DE LA BALZE

*Todavía es múltiple e inmediata la adhesión a lo que detestamos, a la vez que dispersa y morosa la adhesión a lo que buscamos (...) Uno podría pensar que en pocos sitios como en la Argentina es más aplicable aquella observación de Foucault de que, así como para Aristóteles el hombre era un animal viviente con capacidad para la política, el hombre moderno es un animal cuya política amenaza a su modalidad como ser viviente.*

ENRIQUE VALIENTE NOAILLES