

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

## **DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES ÓSEAS Y  
FLUOROSIS DENTAL EN POBLACIÓN EXPUESTA A FLÚOR A TRAVÉS DEL  
AGUA DE CONSUMO “**

PRESENTA:

**M. C. LIZET DEL CARMEN JARQUÍN YÁÑEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA**

ASESORES:

**DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ**

**DR. JORGE ALEJANDRO ALEGRÍA TORRES**

San Luis Potosí, SLP. Enero 2019

PROYECTO REALIZADO EN:

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y CENTRO DE  
INVESTIGACIÓN APLICADA EN AMBIENTE Y SALUD, CIACYT-FACULTAD DE  
MEDICINA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL SS/IMSS/ISSSTE-  
CONACYT-234310**

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN  
DE VARIANTES POLIMÓRFICAS ASOCIADAS A LA EXPOSICIÓN A FLÚOR EN  
POBLACIÓN INFANTIL EXPUESTA A HIDROFLUOROSIS ENDÉMICA.**

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS**

**Becario No.486617-274085**

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS DEL PROGRAMA  
NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

## Productos generados durante la realización de esta investigación

### Artículos

1. **Jarquín-Yáñez L**, Mejía-Saavedra JJ, Molina-Frechero N, Gaona E, Rocha-Amador DO, López-Guzmán OD, et al. (2015). Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi; The Scientific World Journal: 647184. <https://doi.org/10.1155/2015/>
2. Escobar-García D, Mejía-Saavedra JJ, **Jarquín-Yáñez L**, Molina-Frechero N, Pozos-Guillén A (2016). Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis; Community Dentistry and Oral Epidemiology 44(2):162-168. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12201>
3. **Jarquín-Yáñez L**, Alegría-Torres JA, Castillo CG, Mejía-Saavedra JJ (2018). Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in Mexican children; Archives of Oral Biology 96:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.010>
4. **Jarquín-Yáñez L**, Mejía-Saavedra JJ, Calderón Hernández J, Alegría-Torres JA, Morales-Torres J, Abud-Mendoza C. Bone mineral density and nutritional status in child population of San Luis Potosi, Mexico; European Journal of Applied Physiology. [Enviado]
5. **Jarquín-Yáñez L**, Calderón Hernández J, Molina-Frechero N, González L, Mejía-Saavedra JJ. Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio en San Luis Potosí, México; Anales de pediatría. [Enviado]

### Informe Técnico

1. Disponible en: <https://www.conacyt.gob.mx/index.php/el-conacyt/convocatorias-y-resultados-conacyt/convocatorias-fondos-sectoriales-constituidos/convocatoria-ssa-imss-issste-conacyt/fichas-de-conclusion-salud/fich-concl-salud-14-01/17551-salud-234310-1/file>

### **Programa de Comunicación de Riesgos**

1. Daños a la salud por consumo de flúor a través del agua.

### **Tesis profesional para obtener el título de Licenciado en Nutrición**

1. Director de tesis: Dr. José de Jesús Mejía Saavedra, Codirector de tesis: **M.C. Lizet del Carmen Jarquín Yáñez**. Título de la tesis: Diagnóstico nutricional y diseño de un programa de alimentación y actividad física en niños pertenecientes a una población con hidrofluorosis endémica en el estado de San Luis Potosí.

Agradezco a todas las personas que formaron parte dentro de la elaboración de esta tesis: a los niños de las comunidades evaluadas, a sus padres, maestros y autoridades que me permitieron realizar este proyecto, ya que sin ellos no podría haber logrado mi objetivo.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Mejía Saavedra, la oportunidad que me dio de trabajar con él, ya que sin conocerme me acepto y me dio su confianza así como la libertad de trabajar y crear mis propias ideas.

Agradezco a la Dra. Jaqueline su disposición en todo momento y sobretodo el que me haya compartido su conocimiento y me haya hecho participe de él.

Agradezco al Dr. Alegría su contribución y tiempo dedicado así como su comprensión en todo momento.

Agradezco a la Dra. Nelly Molina que me haya aceptado en su equipo de trabajo y la confianza que me brindo.

Agradezco al Dr. Gregorio su apoyo en mi examen, así como a todos los maestros del PMPCA que contribuyeron en mi formación, en especial al Dr. Medellín.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo en el CIACYT por su colaboración, amistad y apoyo incondicional.

Agradezco a mi familia por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles: a mi esposo Néstor, a mi hija Naomy y a mi pequeño Nahum, por comprenderme y apoyarme y sobretodo tenerme paciencia y esperar siempre a que dejara la computadora. Agradezco a mi mama y a mis hermanos por ayudarme cuando más lo necesite.

# ÍNDICE

## RESUMEN GENERAL

## INTRODUCCIÓN GENERAL

## ANTECEDENTES

- La Reforma, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí
- Ojo Caliente, Santa María del Río, San Luis Potosí

## OBJETIVOS

- General
- Específicos

## METODOLOGÍA GENERAL

## REFERENCIAS

## PRIMER ARTÍCULO. -

- Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosí.

## **SEGUNDO ARTÍCULO. –**

- Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis.

## **TERCER ARTICULO. –**

- Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in Mexican children.

## **CUARTO ARTÍCULO. –**

- Bone mineral density and nutritional status in child population of San Luis Potosi, Mexico.

## **QUINTO ARTÍCULO. –**

- Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio en San Luis Potosí, México.

## **PROGRAMA DE COMUNICACIÓN DE RIEGOS**

- Daños a la salud por consumo de flúor a través del agua

## **DISCUSIÓN GENERAL**

## **REFERENCIAS**

## **CONCLUSIONES GENERALES**



**RESUMEN GENERAL**

La escasez del agua ha propiciado el desarrollo de grandes obras subterráneas para la explotación de los mantos acuíferos, los cuales en base a las características litológicas y estructurales de las rocas constituyen una fuente natural de flúor. Al ser este tipo de agua la principal fuente de abastecimiento de agua potable en varias regiones, la contaminación por flúor en agua destinada al consumo humano se ha convertido en un problema relevante a nivel mundial. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prevalencia de polimorfismos genéticos y su influencia sobre las enfermedades óseas y fluorosis dental en población infantil expuesta a flúor a través del agua de consumo en las comunidades de Ojo Caliente, Santa María del Río y La Reforma, Salinas de Hidalgo en el estado de San Luis Potosí. Para ello se diseñó un estudio transversal en el que se evaluaron 241 niños, 121 de Ojo Caliente y 120 de La Reforma. Se solicitaron muestras del agua de consumo y orina para la cuantificación de flúor a través del método potenciométrico con electrodo ion selectivo. Se evaluaron los polimorfismos rs412777 en el gen COL1A2, rs2234693 en el gen ESR1 y rs1256049 en el gen ESR2 a través de la técnica de PCR tiempo real. Se evaluó el valor de la densidad mineral ósea (DMO) de la región lumbar (L1-L4) y cadera izquierda, mediante un dispositivo de densitometría de rayos X de doble energía (DEXA) marca: "Hologic Model Discovery Wi" (S/N 85714) con software para infantes y pediátricos, cuyos resultados fueron interpretados en valores Z ajustados por edad, sexo, peso, talla y etnia. Se evaluó la fluorosis dental utilizando el índice de Thylstrup–Fejerskov (TF) y se incluyó la evaluación del estado nutricional basado en la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la ingesta de micronutrientes obtenida a través de un cuestionario de frecuencia de consumo validado para población mexicana. Así mismo, se implementó un programa de comunicación de riesgos en las poblaciones de

estudio. La concentración de flúor en el agua del grifo fue de  $2.36 \pm 0.02$  mg/L en la comunidad de Ojo Caliente y de  $4.56 \pm 0.07$  mg/L en la comunidad de La Reforma. En tanto que la concentración de flúor en el agua embotellada fue de  $0.14 \pm 0.04$  mg/L y  $0.47 \pm 0.05$  mg/L respectivamente. El factor de riesgo calculado para fluorosis dental fue de 2.0 para Ojo Caliente y 4.2 para La Reforma ya que la principal fuente de consumo de agua fue del grifo. El nivel de exposición a flúor fue de  $2.05 \pm 0.62$  mg/L en Ojo Caliente y  $2.99 \pm 0.99$  mg/L en La Reforma. Se presentaron 218 casos de DMO normal y 23 de DMO baja y el 100% de la población evaluada registró fluorosis dental. El 67% de la población presentó un estado nutricional normal, el 27% bajo peso, el 2% desnutrición moderada y el 4% desnutrición severa. Un consumo <50% de la IDR para calcio se presentó en el 38% del grupo de niños de 7-8 años y de 9-13 años y en el 60% de los de 14-15 años. El 10% de la población evaluada presentó un consumo <50% de la IDR para magnesio en el grupo de 7-8 años, el 18% en el de 9-13 años y el 30% en el de 14-15 años. El 17% de la población presentó un consumo >150% de la IDR para magnesio en los niños de 7-8 años, el 28% en los de 9-13 años y el 10% en los de 14-15 años. En tanto que para fósforo el 5% de los niños de 9-13 años y el 10% de los de 14-15 años presentaron un consumo <50% de la IDR, así como el 31% de los niños de 7-8 años, el 46% de los de 9-13 años y el 10% de los de 14-15 años presentaron un consumo >150% de IDR. La presencia del polimorfismo evaluado en el gen COL1A2 generó un OR=7.10 (IC: 3.96-12.70) para los niños que llevaron el polimorfismo independientemente de que este fuera homocigoto o heterocigoto de presentar fluorosis dental más severa (TF6,7,8,9), con respecto a los niños que no lo llevaron. De los 22 casos de DMO baja que contaron con el análisis para la identificación del polimorfismo, 10 presentaron el polimorfismo (7 casos con A/C y 3 casos

con C/C) y 12 no lo presentaron, por lo que no se encontró asociación. Los niveles de exposición a flúor fueron menores en los niños que presentaron DMO baja con respecto a los que presentaron DMO normal ( $2.12 \pm 0.78$  v/s  $2.56 \pm 0.96$ ,  $p < 0.05$ ). Los niños con los grados de fluorosis dental TF4 y TF5 presentaron menores concentraciones de flúor en orina ( $2.66$  mg/L) con respecto a los niños que presentaron los grados de severidad más altos: TF8 y TF9 ( $3.75$  mg/L) existiendo diferencias estadísticamente significativas. El estado nutricional se encontró asociado a la DMO: el valor Z promedio de los niños con desnutrición severa fue estadísticamente el más bajo y el único que representó DMO baja ( $-2.30 \pm 0.61$ ). El consumo de micronutrientes estuvo asociado al nivel de exposición a flúor: los niños que presentaron un consumo  $< 50\%$  de la IDR de calcio tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo mayor ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L,  $p < 0.05$ ) misma situación en el caso del magnesio ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  y  $1.90 \pm 0.67$  mg/L,  $p < 0.05$ ) y los niños que presentaron un consumo  $> 150\%$  de la IDR de fósforo tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo menor ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  y  $1.82 \pm 0.13$  mg/L,  $p < 0.05$ ). El uso del agua del grifo así como el nivel de exposición a flúor disminuyeron después del programa de comunicación de riesgos. En el presente trabajo se identificaron problemas de contaminación por flúor del agua de consumo, presencia del polimorfismo rs 412777 en el gen COLA2 y problemas nutricionales que estuvieron asociados a la fluorosis dental y DMO baja registrada en la población de estudio.

**Palabras clave:** Hidrofluorosis, Polimorfismos, Densidad mineral ósea, Fluorosis Dental, Estado nutricional, Micronutrientes

## **General Abstract**

Lack of water has originated the exploitation of aquifers, which, based on the lithological and structural characteristics of the rocks, constitute a natural source of fluoride. Since this type of water is the main source of drinking water supply in several regions, fluoride contamination in water intended for human consumption has become a relevant problem worldwide. The aim of this study was to evaluate the prevalence of genetic polymorphisms and their influence on bone diseases and dental fluorosis in children exposed to fluoride through drinking water in communities of Ojo Caliente, Santa María del Río y La Reforma, Salinas de Hidalgo in the state of San Luis Potosí. To this end, a cross-sectional study was designed in which 241 children were evaluated, 121 from Ojo Caliente and 120 from La Reforma. Samples of drinking water and urine were requested for the quantification of fluoride through the potentiometric method with selective ion electrode. The polymorphisms rs412777 in the COL1A2 gene, rs2234693 in the ESR1 gene and rs1256049 in the ESR2 gene were evaluated through the real-time PCR technique. The value of the bone mineral density (BMD) of the lumbar region (L1-L4) and left hip was evaluated using a double-energy X-ray densitometry (DEXA) device: "Hologic Model Discovery Wi" (S / N 85714) with software for infants and pediatrics, whose results were interpreted in Z values adjusted for age, sex, weight, height and ethnicity. Dental fluorosis was evaluated using the Thylstrup-Fejerskov index (TF) and included the evaluation of the nutritional status based on the World Health Organization (WHO) and the intake of micronutrients obtained through a validated consumption frequency questionnaire, for Mexican population. Likewise, a risk communication program was implemented in the study

populations. The concentration of fluoride in the tap water was  $2.36 \pm 0.02$  mg / L in the community of Ojo Caliente and  $4.56 \pm 0.07$  mg / L in the community of La Reforma. While the concentration of fluoride in bottled water was  $0.14 \pm 0.04$  mg / L and  $0.47 \pm 0.05$  mg / L respectively. The calculated risk factor for dental fluorosis was 2.0 for Ojo Caliente and 4.2 for La Reforma since the main source of water consumption was from the tap. The level of fluoride exposure was  $2.05 \pm 0.62$  mg / L in Ojo Caliente and  $2.99 \pm 0.99$  mg / L in La Reforma. There were 218 cases of normal BMD and 23 of low BMD, and 100% of the evaluated population registered dental fluorosis. 67% of the population had a normal nutritional status, 27% underweight, 2% moderate malnutrition and 4% severe malnutrition. A consumption <50% of the (Recommended daily intake) RDI for calcium occurred in 38% of the group of children aged 7-8 years and of 9-13 years and in 60% of those aged 14-15 years. 10% of the evaluated population had a consumption <50% of the RDI for magnesium in the group of 7-8 years, 18% in the group of 9-13 years and 30% in the group of 14-15 years. 17% of the population had a consumption > 150% of the RDI for magnesium in children of 7-8 years, 28% in those of 9-13 years and 10% in those of 14-15 years. While for phosphorus 5% of children aged 9-13 years and 10% of those aged 14-15 years had a consumption <50% of the RDI, as well as 31% of children aged 7-8 years , 46% of those aged 9-13 years and 10% of those aged 14-15 had a consumption > 150% of RDI. The presence of the polymorphism evaluated in the COL1A2 gene generated an OR = 7.10 (CI: 3.96-12.70) for the children who carried the polymorphism regardless of whether it was homozygous or heterozygous with more severe dental fluorosis (TF6,7,8,9 ), with respect to children who did not take it. Of the 22 cases of low BMD that had the analysis for the identification of the polymorphism, 10 presented the

polymorphism (7 cases with A / C and 3 cases with C / C) and 12 did not present it, so no association was found. The levels of exposure to fluoride were lower in children who presented low BMD with respect to those who presented normal BMD ( $2.12 \pm 0.78$  v / s  $2.56 \pm 0.96$ ,  $p < 0.05$ ). The children with the degrees of dental fluorosis TF4 and TF5 presented lower concentrations of fluoride in urine ( $2.66$  mg / L) with respect to the children who presented the highest degrees of severity: TF8 and TF9 ( $3.75$  mg / L) there being statistically differences significant. Nutritional status was found associated with BMD: the average Z value of children with severe malnutrition was statistically the lowest and the only one that represented low BMD ( $-2.30 \pm 0.61$ ). The consumption of micronutrients was associated with the level of fluoride exposure: children who had a consumption  $< 50\%$  of the RDI of calcium had a higher concentration of fluoride in urine compared to those who had a higher consumption ( $2.20 \pm 0.70$  v / s  $1.96 \pm 0.55$  mg / L,  $p < 0.05$ ) same situation in the case of magnesium ( $2.58 \pm 0.69$  v / s  $1.96 \pm 0.50$  and  $1.90 \pm 0.67$  mg / L,  $p < 0.05$ ) and children who had a consumption  $> 150\%$  of the phosphorus IDR had a higher concentration of fluorine in urine compared to those with lower consumption ( $2.43 \pm 0.59$  v / s  $1.82 \pm 0.54$  and  $1.82 \pm 0.13$  mg / L,  $p < 0.05$ ). The use of tap water as well as the level of fluoride exposure decreased after the risk communication program. In the present work, problems of fluoride contamination of drinking water, presence of the rs 412777 polymorphism in the COLA2 gene and nutritional problems that were associated with dental fluorosis and low BMD recorded in the study population were identified.

**Keywords:** Hydrofluorosis, Polymorphisms, Bone mineral density, Dental Fluorosis, Nutritional status, Micronutrients.



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **Generalidades del flúor**

El Flúor es un elemento químico, electronegativo, no metálico y gaseoso que pertenece al grupo de los halógenos, cuyo símbolo es F. En estado puro, es un gas de color amarillo claro, bastante tóxico y de olor irritante. Su número atómico es 9 y su peso atómico 19. Su característica más importante es su alta reactividad, razón por la cual es difícil encontrarlo libre en la naturaleza. Se puede encontrar en la atmósfera, suelos, agua y alimentos.

En el caso del agua, la incorporación de flúor se realiza cuando ésta atraviesa los subsuelos y por percolación disuelve diversos compuestos. Dando como resultado concentraciones de flúor en los acuíferos, las cuales incrementan en presencia de cesio, litio, cloro y bromo así como en las aguas termales y subterráneas (Ortega-Guerrero, 2009).

De esta manera, la principal fuente exógena de flúor en el organismo es el agua de bebida, sobre todo cuando la fuente de abastecimiento de agua proviene del subsuelo, sin olvidar que algunos alimentos también contribuyen al aporte de este mineral como el té y los alimentos de origen marino y en menor proporción carnes, huevos, cereales, verduras y frutas (Pérez-Llamas et al., 2010)

La principal vía de absorción del flúor en el organismo es la digestiva y se lleva a cabo por difusión simple, ocurre fundamentalmente en el intestino delgado (75-80%) y en menor proporción en el estómago (Pérez-Llamas et al., 2010). La absorción es rápida y depende del pH del entorno (Puche et al., 2007a). El flúor proveniente del agua de bebida, se absorbe casi en su totalidad (95-97%) y en una menor proporción el proveniente de la dieta (60-70%)

(Pérez-Llamas et al., 2010). Una vez absorbido, el flúor pasa a la sangre y de ahí se distribuye por todos los tejidos, fijándose específicamente en los mineralizados como los huesos y los dientes por los que tiene gran afinidad. Finalmente, la eliminación del flúor absorbido se realiza por vía renal (Puche et al., 2007a; Pérez-Llamas et al., 2010; OMS, 2011).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y a la Norma Oficial Mexicana NOM 201-SSA1-2002 complementada con la NOM-127-SSA1-1994, el límite permitido de flúor en el agua de consumo es de 1.5 mg/L (NOM, 1994; NOM, 2002; OMS, 2011). Cuando el flúor es ingerido por arriba de este nivel, puede provocar diversos padecimientos en los tejidos en los que se acumula como fluorosis esquelética y dental, fracturas óseas, trastornos gastrointestinales, alteraciones renales e inmunitarias (Hernández-Castro et al., 2010; Ahmed et al., 2013; Espinosa et al., 2014); así como afección en el desarrollo del cerebro y reducción del coeficiente intelectual (Serraj et al., 2012; Xingchen et al., 2018).

### **Acción del flúor sobre el componente óseo**

El hueso es un tejido mineralizado de composición heterogénea y estructura compleja, dinámico y vascularizado. Está formado por una matriz ósea que tiene un componente orgánico e inorgánico y por un conjunto celular (Murugan et al., 2005; Fernández-Tresguerres, 2006). La matriz orgánica está constituida por colágeno tipo 1 y en menor proporción por sustancia fundamental y proteínas no colágenas; la matriz inorgánica está formada por sales de calcio y fosfato organizadas en forma de cristales de hidroxapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] y el componente celular, que representa el 2% de la materia orgánica del hueso, está formado por los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos que son las células

responsables de la formación, mineralización, modelación y remodelación ósea (Fernández-Tresguerres, 2006; Ferrer et al., 2009).

Los osteoblastos son las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización, ya que segregan colágeno y otros materiales utilizados para la construcción del hueso. Un cierto número de osteoblastos quedan atrapados en las lagunas de la matriz pasando a ser osteocitos, los cuales constituyen la mayor parte del tejido óseo cuya función es mantener las actividades celulares del hueso como el intercambio de nutrientes y productos de desecho y finalmente los osteoclastos son las células responsables de la resorción ósea (Ferrer et al., 2009; Puche et al., 2007b).

Debido a su alta afinidad, dentro de la matriz inorgánica del hueso, se pueden encontrar en bajas proporciones otros iones, como magnesio, sodio, potasio, manganeso, fluoruro, carbonato, citrato y cloruro, adsorbidos a la superficie de los cristales de hidroxiapatita. Cuando el individuo consume alguno de estos elementos en cantidades excesivas, al ser adsorbidos a la superficie de los cristales de hidroxiapatita se pierde el equilibrio de formación y/o mineralización del hueso (Pérez-Llamas et al., 2010).

En el caso del flúor, aproximadamente el 50% del flúor absorbido cada día por un adulto sano de mediana edad, se asocia a tejido calcificado en las primeras 24 horas, mientras que el resto es excretado virtualmente por la orina. Esta distribución 50:50 cambia en gran medida a favor de una mayor retención en los niños y mayor excreción en el adulto mayor. La amplia retención por el esqueleto en desarrollo puede ser causada por un alto aporte sanguíneo,

más un área extensa de cristales de hidroxapatita a diferencia del hueso maduro. (Puche et al., 2007b)

El componente celular óseo vive en un medio ambiente de equilibrio entre el colágeno tipo I y el material inorgánico. Un desequilibrio entre ellos se traduciría en mayor rigidez y pérdida de flexibilidad si aumenta la hidroxapatita, o viceversa, si el desequilibrio favorece al colágeno (Ferrer et al., 2009). El 60% de este equilibrio depende del proceso de mineralización. Clínicamente, si el hueso es muy rígido se quiebra y si es muy elástico, se deforma. Las fibras colágenas tienen las propiedades de deformación, mientras que la apatita confiere resistencia y robustez. Por lo tanto, las fracturas óseas se deben principalmente a alteraciones en la orientación de las fibras colágenas y al desequilibrio en el proceso de mineralización (Ferrer et al., 2009; Viguet-Carrin et al., 2006). De ahí la importancia de mantener un límite en el consumo de flúor ya que el exceso en su consumo, altera el proceso de mineralización, lo que se traduce en un incremento de fracturas y/o deformación del hueso (Yunpeng-Ding, 2011).

Otra patología ósea relacionada al consumo de flúor es la osteoporosis (OP), cuya asociación se la ha dado tanto a su origen (Arana Ochoa, 2007; Puche et al., 2007b; Buelvas Acevedo et al., 2010) como a su tratamiento dependiendo de la dosis consumida (De Luis Román et al., 2004).

La OP es un trastorno esquelético caracterizado por una disminución de la resistencia ósea que predispone a un mayor riesgo de fracturas, debido al aumento de la resorción ósea y la pérdida de formación de densidad mineral ósea (DMO) (Ferrer, 2009; Neyro Bilbao et al.,

2011), lo cual está aparentemente regulado por numerosos genes y otros factores externos, como la dieta, la actividad física, el peso, el tabaco, el alcohol, los fármacos, etc. Generalmente no tiene síntomas iniciales y se detecta cuando se produce la primer fractura, siendo más frecuente en el antebrazo, cadera y vértebras (Ferrer et al., 2009). También se le llama “Enfermedad de los huesos porosos” ya que pese a que la composición del hueso es la misma, durante la osteoporosis se presenta menor cantidad ósea (Mataix Verdú et al., 2009).

La etiología de la osteoporosis comprende dos aspectos, la deficiencia de calcio por un lado y la falta de estrógenos por el otro. En el caso del calcio, cuando éste se elimina a una velocidad mayor de la que se absorbe aparece una osteoporosis, de la misma manera que aparecerá si disminuye el proceso de absorción de calcio en el intestino y el depósito en los huesos. Esto se debe a que cuando no existe calcio suficiente en la sangre, el organismo debe obtener el calcio a partir del hueso, que es el principal almacén de este nutriente, ya que el cuerpo no permitirá que la cantidad de calcio en sangre descienda por debajo de su nivel normal. La continua disminución de las reservas de calcio durante mucho tiempo, da como resultado un progresivo desgaste óseo. (Mataix Verdú et al., 2009).

El consumo de flúor por arriba de los límites permisibles provoca la disminución de la absorción de calcio en los huesos, posiblemente como resultado de la competencia de estos cationes durante las reacciones químicas en el proceso de formación ósea (Riobó-Serván, 2013). La deficiencia de calcio en los huesos también es vista, cuando el ion fluoruro forma cristales de hidroxifluorapatita por sustitución del grupo hidroxilo de la hidroxiapatita del hueso y origina zonas con aumento de la densidad ósea y con formación de hueso altamente

mineralizado, lo cual demanda la presencia de mayores cantidades de calcio (Zanchetta et al., 2001).

Sin embargo, es importante mencionar que también la presencia de vitamina D en el organismo facilita la absorción de calcio y que cuando esta se ingiere en cantidades por arriba de los límites normales (niños: 4.4-6.0 mg/dL, adultos: 4.4-5.3 mg/dL) y por tiempo prolongado, también destruye la matriz proteica del hueso por liberación excesiva de calcio en orina, dando como resultado una descalcificación ósea, característica principal de la osteoporosis (Pérez-Llamas et al., 2010; Yeste et al., 2011). El consumo excesivo de sal (la OMS recomienda 5g diarios) es otro factor que interviene en la disminución de calcio en los huesos ya que por cada 2.3g de incremento de sodio excretado en orina, se excretan conjuntamente de 24-40 mg de calcio, debido a que ambos comparten el mismo sistema de transporte en el túbulo proximal (Mataix et al., 2009; Heaney, 2006). De manera que la situación se complica al considerar un consumo excesivo de flúor sumado a estas últimas dos agravantes.

La fluorosis esquelética es otra enfermedad asociada al consumo excesivo y prolongado de flúor, en donde éste estimula el reclutamiento y proliferación de los osteoblastos o impide la resorción ósea al formar un mineral tisular menos soluble (Hidalgo-Gato et al., 2007). El hueso que se forma por absorción de flúor presenta áreas de alta densidad y mineralización, unidas a áreas con matriz pobremente mineralizada las cuales corresponden al hueso que ya estaba mineralizado, esto se debe a que el flúor no difunde en grandes cantidades en los cristales de hidroxiapatita preformados en el hueso ya mineralizado, sino que se incorpora en los cristales

de hidroxapatita del hueso en mineralización reciente. De ahí la presencia de un hueso de aspecto moteado con zonas de baja densidad mineral (pero con matriz bien organizada) y halos hipomineralizados alrededor de las lagunas moteadas, lo cual finalmente se traduce en fractura, al formar un hueso frágil. La causa de la existencia de estas zonas de hipomineralización es poco clara, pero en parte podrían deberse a una deficiencia de calcio secundaria a la gran demanda producida por el nuevo hueso formado por la acción del flúor (Zanchetta et al., 2001).

Las dosis de 2-5 mgF por día pueden causar etapas pre-clínicas y clínicas. La etapa preclínica por lo regular es asintomática con aumento apenas detectable de la DMO. La etapa clínica I se caracteriza por dolores esporádicos, endurecimiento de las articulaciones y osteoesclerosis de la pelvis y la columna. La etapa clínica II presenta dolores articulares crónicos, síntomas artríticos, calcificación de ligamentos y osteoesclerosis agravada con o sin osteoporosis de huesos largos. La etapa avanzada involucra limitación del movimiento articular, calcificación de ligamentos de cuello y columna vertebral, osteoporosis, deformidades invalidantes de la columna y articulaciones, compresión de la medula espinal y daños neurológicos (Puche et al., 2007b).

### **Detección de enfermedades óseas**

Los medios diagnósticos de detección de las enfermedades óseas comprenden, rayos X simples en los cuales se pueden apreciar fracturas, aumento de la DMO, encorvamientos y calcificación de las articulaciones, características propias de la fluorosis esquelética. Sin embargo, debe existir una pérdida de 30-40% de la masa mineral ósea para que se detecte



radiográficamente una osteopenia (disminución de la DMO, que no es considerada como osteoporosis), por lo que no es un método muy útil (Berrocal Kasay, 2001).

Las radiografías panorámicas u ortopantografías se pueden utilizar como herramientas complementarias o auxiliares para determinar la presencia de algunas enfermedades óseas como la osteoporosis a través de signos y síntomas presentes en el sistema estomatognático (número de dientes, índice panorámico mandibular, amplitud mandibular cortical en la región mentoniana, grado de reabsorción de la cresta alveolar y clasificación morfológica de la corteza mandibular inferior). Este tipo de radiografías hace visible la pérdida de DMO en el hueso maxilar principalmente a nivel alveolar, la cual se ha relacionado con la pérdida ósea de la osteoporosis (Espinoza et al., 2012).

El ultrasonido mide la atenuación ultrasónica de la banda ancha y la velocidad del sonido a través del hueso. Es un método seguro, no causa radiación y es rápido; los instrumentos son portátiles lo cual permite su uso para campañas de despistaje de osteoporosis. Los equipos existentes miden la DMO a nivel del calcáneo (hueso del talón). El ultrasonido es un método útil para determinar qué partes tienen DMO baja, las cuales deben ser evaluadas posteriormente con una densitometría ósea completa como el sistema DEXA (absorciometría de rayos X de energía dual) para obtener el resultado definitivo (Berrocal Kasay, 2001).

La tomografía axial computarizada (TAC) mide selectivamente la DMO del hueso trabecular (separando el hueso cortical del análisis) y excluye otros depósitos cálcicos extraóseos como osteofitos y calcificación de la aorta y a diferencia del sistema DEXA mide la DMO de manera volumétrica (y no como superficie de área como hace DEXA). Sin embargo sus limitaciones

son que no se puede evaluar fémur proximal y la dosis de radiación con respecto al sistema DEXA es mayor, además existe una mejor correlación entre la DMO y el riesgo de fracturas medido por DEXA que la medición hecha por TAC (Berrocal Kasay, 2001).

La OMS decidió utilizar en el año 1994, las determinaciones de la DMO con DEXA (método de referencia por su alta precisión-exactitud [85 a 95%] y reproducibilidad [-1 a 3%]), para definir el hueso normal, la osteopenia y la osteoporosis, estableciendo criterios diagnósticos de osteoporosis a partir de valores densitométricos concretos como punta de referencia para el diagnóstico, pronóstico e inicio de tratamiento. Según la definición de la OMS, el 95% de las mujeres jóvenes tienen unos valores de DMO situados entre -2 y 2 desviaciones estándar (DE) (OMS, 1994).

Los resultados DEXA de acuerdo a la OMS se expresan en términos de DMO (g/cm<sup>2</sup>) utilizando valores T que reflejan las DE que alejan el valor de un paciente adulto (mayor de 30 años) con respecto a la media de la población de referencia (mismo género con masa ósea máxima) (Berrocal Kasay, 2001).

La Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) es otra institución que avala el uso del equipo DEXA como referencia para el diagnóstico de osteoporosis y predicción de fracturas (Lorente et al., 2012; Lewiecki et al., 2004). Esta propone un diagnóstico con el puntaje Z en poblaciones menores a 20 años, debido a la comparación con una población de la misma edad, talla, peso, sexo y etnia a diferencia del puntaje T. Considerando, un valor  $Z > -1.0$  como DMO normal y  $\leq -2.0$  como DMO baja para la edad cronológica u osteoporosis en

caso de estar acompañada de historia clínica de fractura (Baim et al., 2008; Gordon et al., 2008).

Existen dos equipos DEXA, uno central que mide la DMO de la región lumbar y cadera y uno periférico (p-DEXA) que mide la DMO en la muñeca, los dedos de la mano, la pierna o el talón. Así mismo, el examen de DEXA también puede evaluar el riesgo de desarrollar fracturas.

La presencia de los síntomas clínicos de las enfermedades óseas deben ser sujetas a valoración, ya que no siempre determinan la presencia de la enfermedad, deben acompañarse de estudios complementarios (presencia de contaminantes en el organismo, deficiencias nutricionales, etc.), cuestionarios y radiografías entre otras cosas. Algunos de los síntomas clínicos que se pueden presentar son: dolor y/o afecciones musculares en el caso de las fracturas; inmovilidad, pérdida de masa muscular, deformaciones óseas y problemas neurológicos en el caso de la fluorosis esquelética y pérdida de la estatura, malestar general, dolor e inmovilidad provocado por las fracturas, en el caso de la osteoporosis (Ferrer, 2009; Neyro-Bilbao et al., 2011; Puche et al., 2007b).

### **Fluorosis dental**

La fluorosis dental es una afección endémica característica de zonas donde el suelo y las aguas de consumo tienen excesiva cantidad de flúor (2 mg o más por litro), que se caracteriza por un defecto en la formación del esmalte, debido a la ingesta excesiva de flúor durante el período de desarrollo de los dientes (Hidalgo et al., 2007; Azpeitia et al., 2008). Los niveles altos de flúor pueden perturbar el buen funcionamiento de las células que forman el esmalte

(odontoblastos) y por lo tanto impiden que el esmalte madure normalmente (Medina et al., 2010).

Durante la formación del diente, la incorporación de flúor se realiza fundamentalmente a través de la pulpa, la cual contiene vasos sanguíneos. El flúor ingerido pasa de la sangre a la pulpa, en donde la célula formadora del esmalte, el ameloblasto; se encuentra formando una matriz proteica que posteriormente se calcificará. Si por alguna razón, durante esta etapa del desarrollo se ingieren cantidades excesivas de flúor, éste interferirá con el metabolismo del ameloblasto (McDonagh et al., 2000); facilitando la formación de cristales de fluorapatita e hidroxifluorapatita, por sustitución de uno o dos iones de la molécula de hidroxiapatita; la cual conforma el 96% de la superficie del esmalte (López et al., 2006; Vieira et al., 2003).

La sustitución de los cristales de hidroxiapatita genera un desorden de mineralización, en donde las secciones del diente, pueden volverse hipermineralizadas o hipomineralizadas; aumentando la porosidad del esmalte, lo que se conoce como fluorosis dental e incluso afectando la erupción dentaria, ya que se ha reportado que entre más flúor se ingiera, más se demora el diente en hacer erupción (Hidalgo-Gato et al., 2007; Vieira et al., 2003).

Las características clínicas de la fluorosis dental relacionadas con la exposición varían con la dosis y el tiempo: a bajas concentraciones durante el periodo formativo del esmalte, producen en él cierto grado de porosidad. Cuando la exposición es moderada, la porosidad se encuentra solamente en la capa más externa del esmalte, aunque podría estar involucrada la superficie completa. A medida que aumenta la exposición, el grado de porosidad y la superficie del esmalte involucrado aumentan. En casos severos, la fluorosis afecta la función

dental, al producirse fosas que se unen entre sí formando zonas susceptibles a fracturas (Medina et al., 2010).

La fluorosis dental puede confundirse con algunas opacidades e hipoplasias del esmalte. Estas son defectos del desarrollo de los tejidos duros del diente, que se presentan antes de la erupción del mismo como resultado de un trastorno en la formación de la superficie del esmalte. Por lo general, se asocian con una disminución localizada del espesor del esmalte pudiéndose presentar en forma de hoyos, surcos o ausencia total o parcial de esmalte en una superficie considerable de la dentina, observando un esmalte translúcido y opaco. Aunque existen otras características particulares, por lo regular las opacidades e hipoplasias del esmalte, se diferencian de la fluorosis dental en que estas se presentan en forma unilateral, mientras que la fluorosis se presenta en forma bilateral en los dientes análogos (Medina et al., 2010).

### **Detección de la fluorosis dental**

Para el diagnóstico de la fluorosis dental se han diseñado dos índices el de Dean y el de Thylstrup- Fejerskov (TF):

Los criterios y claves del índice de Dean son: 0-Normal. La superficie del esmalte se encuentra en buen estado lisa, brillante y de color blanco a crema pálido. 1-Dudosa. El esmalte muestra translucidez, puntos blancos y manchas dispersas. 2-Muy ligera. Se presentan zonas blancas y opacas que afectan a menos del 25% de la superficie del esmalte. 3-Ligera. Las zonas blancas y opacas son mayores las de la clave 2, pero abarca menos del 50% de la superficie dental. 4-

Moderada. El esmalte presenta desgaste y un color pardo. 5-Severa. El desgaste ocupa una mayor superficie dental que en la clave anterior, afectando la forma general del diente con zonas excavadas y aspecto corroído. (OMS, 2003; Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, 2003).

El índice TF es más sensible en la detección de la fluorosis dental, con clasificaciones individuales de los órganos dentarios dentro de diez categorías. En este índice, el grado 0 nos indica un esmalte sano; los grados 1 a 4, manchas sobre la superficie del esmalte, las cuales aumentan conforme aumenta el nivel. En los grados 5 al 9 se observa destrucción del esmalte, en donde el grado 5 representa un esmalte moteado con orificios de menos de 2mm de diámetro, los cuales se fusionan en el grado 6 formando bandas de menos de 2mm de profundidad. En los grados 7, 8 y 9 existe una destrucción de la superficie del esmalte de un 25%, 50% y 100% (Thylstrup et al., 1978).

### **Susceptibilidad genética a enfermedades óseas y fluorosis dental**

A pesar de que existe una fuerte asociación entre la exposición al fluoruro y los efectos fluoróticos, existen varios estudios que han reportado una correlación baja entre ellos (Vieira et al., 2005; Dawson et al., 2009; Everett et al., 2002; Raghavan et al., 2014). Sugiriendo la presencia de alteraciones genéticas asociadas, como los polimorfismos.

Una alteración genética es una condición patológica en el genoma, el cual está constituido por un conjunto de genes. Un gen es un segmento de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de un ARN (Alberts et al., 2002; González-Lamuño

et al., 2008). Cuando existen variaciones en la secuencia genética de los individuos, estamos en presencia de las mutaciones, estas pueden ser originadas por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como por factores ambientales (Checa, 2007). Pueden tener efectos deletéreos y causar enfermedades o dar lugar a lo que se conoce como polimorfismos (Checa, 2007).

El término polimorfismo, se asocia a una variación común en una población más o menos estable y no es causa directa de una patología; las diferentes formas de los polimorfismos son más frecuentes que las mutaciones; ya que tienen una frecuencia de uno de sus alelos superior al 1% en la población, (Checa, 2007; Torrades, 2002). Básicamente existen dos tipos de polimorfismos, los que derivan de la sustitución de un nucleótido por otro y los que derivan de la inserción, deleción o cambios en el número de secuencias repetidas de ADN. Los más frecuentes son los primeros, que son conocidos como SNP (polimorfismo de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) (Checa, 2007).

Los SNP se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. Algunos SNP desempeñan un papel biológico importante en el desarrollo de enfermedades comunes, debido a que constituyen SNP funcionales, los cuales pueden afectar al gen, al ARN mensajero de genes que sintetizan proteínas y a las mismas proteínas (Ramírez-Bello et al., 2013). La gran mayoría de los SNP tienen dos alelos, los cuales están representados por una sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o silvestre y alelo raro o mutante. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede

tener uno de tres genotipos: homocigoto (alelos idénticos) para el alelo más frecuente, heterocigoto (alelos diferentes), u homocigoto para el alelo menos frecuente (Checa, 2007).

En la actualidad, los polimorfismos son utilizados como marcadores de algunas enfermedades; ya que la presencia de éstos, puede ser la causa de riesgo para el desarrollo o progresión de alguna enfermedad (Checa, 2007).

Como es sabido, la DMO a cualquier edad es el resultado de dos variables: la cantidad de hueso acumulado durante el crecimiento y el ritmo de pérdida de hueso a lo largo de los años, los cuales tienen lugar durante la infancia y son controlados entre otras cosas por factores genéticos (Justin et al., 2002).

Los factores hereditarios desempeñan un papel importante en el riesgo de osteoporosis. Estudios en gemelos, han reportado que el 70-80% de las diferencias encontradas en la DMO, medidas en la columna lumbar y cuello femoral, es atribuible a factores genéticos. Varios estudios han encontrado relación significativa entre el componente hereditario y el riesgo de fractura en mujeres blancas (Nelson et al., 2000). Además los genes que codifican para el colágeno tipo 1 (COLIA1 y COLIA2) y sus polimorfismos también parecen intervenir en la regulación genética de la DMO. Se han comunicado diferencias significativas entre diferentes etnias en la prevalencia del polimorfismo Sp1-COLIA1, lo que podría explicar la susceptibilidad racial de la osteoporosis de la raza caucásica frente a la africana y la asiática (Lei et al., 2003).

Los ES desempeñan un papel importante en el funcionamiento y mantenimiento del esqueleto, al actuar sobre la inducción de las células osteoblásticas del estroma y regular la



producción de varias citocinas como la interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el receptor activador del factor nuclear kappa-b (RANK) y la osteoprotegerina (OPG) (Cheung et al., 2003). De manera que cuando las concentraciones de ES disminuyen hasta cierto valor, aumentan las citocinas estimuladoras de los osteoclastos, se produce menor cantidad de OPG y más RANKL (ligando RANK) proosteoclastogénico. La mayor generación de osteoclastos induce una mayor apoptosis de los osteocitos, lo que equivale en la práctica a una mayor actividad de las BMU (unidad multicelular básica *por sus siglas en inglés*), que excavan grandes agujeros en el hueso deteriorando su microestructura y resistencia ósea. Por lo que la presencia de polimorfismos en los genes que codifican para los receptores de estrógeno sugieren la causa de ciertas condiciones óseas relacionadas con el metabolismo (Ba et al, 2011).

En el caso de la fluorosis dental se sugiere la presencia de polimorfismos en genes relacionados con la formación y metabolismo óseo, debido a la similitud en la constitución y formación del hueso con el diente (Willing et al., 2003; Dawson et al., 2009). Tal es el caso de los polimorfismos en los genes receptores de estrógeno ESR1 y ESR2 ya que como se mencionó anteriormente, el estrógeno y sus receptores son esenciales para el desarrollo sexual y funciones reproductivas, pero también juegan un rol en otros tejidos como los huesos, sugiriendo que la asociación entre los polimorfismos en estos genes y el desarrollo de la fluorosis dental es debido a que estos receptores también juegan un papel importante en la diferenciación de las células que forman los dientes (Ba et al, 2011; Ferrer et al., 2005).

Otro gen candidato en la fluorosis dental es el COL1A2, ya que este gen es expresado por los odontoblastos durante la etapa de formación de la corona de los órganos dentarios, motivo

por el cual la dentinogénesis imperfecta tipo I, se encuentra asociada a la presencia de defectos en este gen (Huang et al., 2008; López Jordi et al., 2010). Además, debido al proceso de inducción recíproca, se sabe que la formación del esmalte, no continúa hasta que se inicia la mineralización de la dentina (Bordoni, 2010). Por lo tanto, cualquier alteración en la formación de dentina, provocada por la presencia de un polimorfismo a nivel del gen COL1A2, generará una alteración en la formación del esmalte; ya que existe una clara y dependiente relación en el proceso de formación de ambos tejidos.

## **ANTECEDENTES**

Dentro del estado de San Luis Potosí existen varias comunidades que poseen concentraciones de flúor en el agua de consumo por encima del límite permitido por la norma oficial mexicana (NOM-127) de 1.5 mg/L, entre ellas están la comunidad de Ojo Caliente, Santa María del Río y La Reforma, Salinas de Hidalgo (COEPRIS, 2012).

La comunidad de Ojo Caliente se localiza en la parte sur del estado de San Luis Potosí a una altura de 1750 metros sobre el nivel del mar (msnm). Su población está conformada por 1389 habitantes. En la localidad hay 660 hombres y 729 mujeres. La relación mujeres/hombres es de 1.105. La tasa de fecundidad de la población femenina es de 2.88 hijos por mujer. El porcentaje de analfabetismo entre los adultos es del 4.68% (3.94% en los hombres y 5.35% en las mujeres) y el grado de escolaridad es de 6.51 (6.54 en hombres y 6.49 en mujeres). En Ojo Caliente el 0.5% de los adultos habla alguna lengua indígena. En la localidad se encuentran 336 viviendas, de las cuales el 1.22% disponen de una computadora (CONAPO, 2010; INEGI, 2010). El abasto de agua en la comunidad de Ojo Caliente se realiza por medio de pozos profundos los cuales, para el año 2012 registraron una concentración de flúor en el agua de 2.56 mg/L y 2.12 mg/L (COEPRIS, 2012).

La localidad de La Reforma está situada al noroeste del estado de San Luis Potosí, en la región denominada Altiplano Potosino, a una altura 2040 msnm, la población total de la comunidad es de 855 personas. La relación mujeres/hombres es de 1.179. La tasa de fecundidad de la población femenina es de 3.32 hijos por mujer. Hay 44 analfabetos de 15 y más años, 12 de los jóvenes entre 6 y 14 años no asisten a la escuela, de la población a partir de los 15 años 19 no tienen ninguna escolaridad y 325 tienen una escolaridad incompleta. Un total de 9 de

la generación de jóvenes entre 15 y 24 años de edad han asistido a la escuela y la mediana escolaridad entre la población es de 6 años. (INEGI, 2013; CONAPO, 2010). El abasto de agua en la comunidad de La Reforma se realiza por medio de un pozo profundo y una purificadora, los cuales registraron una concentración de flúor de 4.54 mg/L y 1.5 mg/L respectivamente. El 84% de la población utiliza el agua de tubería para beber y el 100 % para cocinar. Dentro del estudio realizado en la comunidad se registró una media de exposición a flúor de  $3.14 \pm 1.09$  mg/L, siendo los niños de mayor edad (11 y 12 años) los que registraron los niveles más altos de exposición (Jarquín-Yáñez, 2014).

En relación a la prevalencia de enfermedades óseas, no se localizó ningún estudio de DMO en niños dentro del estado de San Luis Potosí. En 2002 se reportó un estudio transversal, con muestreo no probabilístico de derechohabientes mujeres mayores de 40 años del Instituto Mexicano del Seguro Social, en donde los resultados de densitometría periférica de acuerdo con la OMS fueron: normal 279 casos (43 %), osteopenia 270 casos (41 %) y osteoporosis 105 casos (16 %). Por grupo etáreo, 62 % de la muestra fue menor de 50 años y en este subgrupo la prevalencia de osteoporosis fue de 4 % y de osteopenia de 34 % (Mendoza-Romo et al., 2002). En 1995 se realizó un estudio piloto de fluorosis esquelética en la ciudad de San Luis Potosí en población adulta, registrando medias de flúor en orina de 5.04 y 3.76 mg/L y una prevalencia del 8.3% de fluorosis esquelética en la población evaluada (Calderon et al., 1995).

En lo que respecta a la fluorosis dental, dentro de un estudio realizado en 2013 acerca de su prevalencia en localidades mexicanas ubicadas en 27 estados y el Distrito Federal se reportó una prevalencia del 27.9%, observando una diferencia estadísticamente significativa entre los

estados. La prevalencia más baja se detectó en Morelos (3.2%) y la más alta en Durango (88.8%). Los índices comunitarios de fluorosis dental (ICF) más bajos se encontraron en Colima, Yucatán y Morelos y los más altos se observaron en Durango, Zacatecas, Aguascalientes y San Luis Potosí, lo que indica que en estos estados la fluorosis es un problema de salud pública (Betancourt-Lineares et al., 2013). En un estudio realizado en la comunidad de La Reforma, Salinas de Hidalgo, la presencia de fluorosis dental se registró en el 100% de los niños evaluados, de los cuales el 4.5% presentaron el nivel moderado, mientras que el resto (95%) presentó el nivel severo en base al índice de Dean. De acuerdo al índice TF los niños que presentaron el menor daño al esmalte TF4 y TF5, constituyeron el 30% de la población evaluada y los niños que presentaron una severidad mayor constituyeron el 70%, de los cuales el grupo con TF6 y TF7 representaron el 45% y el grupo TF8 y TF9 el 25%, presentándose los grados de mayor severidad en los niños de mayor edad (11 y 12 años), los cuales presentaron los niveles más altos de exposición (Jarquin-Yáñez, 2014).

En cuanto a la susceptibilidad genética en la comunidad de La Reforma, Salinas de Hidalgo, se registró la presencia del polimorfismo rs412777 en el gen COL1A2 en el 47.5% de la población evaluada. Sin embargo no se encontró correlación entre la presencia del polimorfismo y la fluorosis dental. Esto último probablemente por el tamaño de la n (80 niños de 6 a 12 años) y por los altos niveles de exposición a flúor registrados en la población evaluada ( $3.1 \pm 1.0$  mg/L) (Jarquín-Yáñez, 2014).

## **OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la prevalencia de polimorfismos genéticos y su influencia sobre las enfermedades óseas y la fluorosis dental en población infantil expuesta a flúor a través del agua de consumo en las comunidades de Ojo Caliente, Santa María del Río y La Reforma, Salinas de Hidalgo en el estado de San Luis Potosí.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar la concentración de flúor en el agua de consumo y las muestras de orina de la población infantil de Ojo Caliente y La Reforma.
2. Examinar la presencia de los polimorfismos rs412777 en el gen COL1A2, rs2234693 en el gen ESR1 y rs1256049 en el gen ESR2 en la población infantil seleccionada.
3. Evaluar la densidad mineral ósea en la población infantil de Ojo Caliente y La Reforma.
4. Determinar la prevalencia de fluorosis dental en la población infantil de Ojo Caliente y La Reforma.
5. Establecer el nivel de asociación entre las variables.



## **METODOLOGIA GENERAL**

Se diseñó un estudio transversal analítico en el que se evaluaron 241 niños, 121 de Ojo Caliente y 120 de La Reforma, residentes desde el nacimiento en su comunidad. Se realizaron las gestiones necesarias con las autoridades competentes y los participantes con el fin de explicar los objetivos del estudio, metas y metodología a seguir. Se les explicó que el estudio era gratuito, anónimo y voluntario y que cumplió con los requisitos del comité de Bioética de la Facultad de Medicina. Así mismo, se les solicitó la firma del consentimiento informado. Posteriormente se solicitaron muestras del agua de consumo y orina para la cuantificación de flúor a través del método potenciométrico con electrodo ion selectivo. Se realizó la extracción de sangre periférica bajo estrictas normas de higiene y seguridad para la evaluación de los polimorfismos rs412777 en el gen COL1A2, rs2234693 en el gen ESR1 y rs1256049 en el gen ESR2 a través de la técnica de PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) tiempo real. Los participantes fueron trasladados a la ciudad de San Luis Potosí a la Unidad de Investigaciones Reumatológicas A.C., Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para la evaluación de la DMO (densidad mineral ósea), la cual se evaluó de la región lumbar (L1-L4) y cadera izquierda, mediante un dispositivo DEXA (densitometría de rayos X de doble energía) marca: “Hologic Model Discovery Wi” (S/N 85714) con software para infantes y pediátricos, cuyos resultados fueron interpretados en valores Z ajustados por edad, sexo, peso, talla y etnia, cuyo diagnóstico se realizó tomando en cuenta la clasificación de la ISCD (Sociedad Internacional de Densitometría Clínica). La fluorosis dental se evaluó utilizando el índice de TF (Thylstrup–Fejerskov) bajo las normas de higiene y seguridad adecuadas. Dentro de la presente tesis se incluyó la evaluación del estado nutricional basado en los requerimientos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) a través de la obtención del peso y la talla con la menor

cantidad de ropa posible. La evaluación de la ingesta de micronutrientes también fue incluida en el análisis estadístico de los datos y fue obtenida a través de un cuestionario de frecuencia de consumo validado para población mexicana propuesto por el INSP (Instituto Nacional de Salud Pública). Así mismo, se implementó un programa de comunicación de riesgos en las poblaciones de estudio de acuerdo a la metodología de Backer (Backer, 1990). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software RStudio-0.99.902.023.

## **REFERENCIAS**

1. Ahmed I, Sohail S, Hussain M, Khan N, Khan MH (2013). MRI features of spinal Fluorosis: Results of an endemic community screening. Pak J Med Sci;29(1):177-180. doi: <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.291.3200>
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002), Molecular biology of the cell. 4a ed, Garland Science, New York.
3. Arana Ochoa JJ (2007). Fluorosis y deporte. A propósito de un caso. Archivos de Medicina del Deporte; XXIV(119):210-212
4. Azpeitia M, Rodríguez M, Sánchez M (2008). Prevalencia de fluorosis dental en escolares de 6 a 15 años de edad. Rev. Med Inst Mex Seguro Soc; 46(1):67-72.
5. Ba Y, Zhang H, Wang G, Wen S, Yang Y, Zhu J et al. (2011). Asociación de la fluorosis dental con polimorfismos en el gen receptor de estrógenos en niños de China. Biol Trace Element Res; 143:87-96.
6. Baim S, Leonard MB, Bianchi ML (2008). Official positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. J Clin Densitom; 11(1):6–21.
7. Berrocal Kasay A (2001). Evaluación de la masa ósea. Revista Peruana de Reumatología; 7(2).
8. Betancourt-Lineares A, Irigoyen-Camacho MA, Mejía-González A, Zepeda-Zepeda M, Sánchez-Pérez L (2013). Prevalencia de fluorosis dental en localidades mexicanas ubicadas en 27 estad. Revista de Investigación Clínica; 65(3):237-247.
9. Bordoni N. (2010). Odontología Pediátrica 1ra ed., Ed. Panamericana. Buenos Aires.

10. Buelvas Acevedo M, Causil Buelvas M (2010). Flúor versus salud. *Ped Rur Ext*; 40(379):107-110.
11. Calderon J, Romieu I, Grimaldo M, Hernández H, Diaz-Barriga F (1995). Endemic fluorosis in San Luis Potosi, Mexico. Identification of risk factors associated with occupational exposure to fluoride. *Fluoride*; 28(4):203-208.
12. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (2003). Manual para el uso de fluoruros dentales en la República Mexicana. Publicada en el diario oficial de la federación el 23 de julio de 2003.
13. Checa Caratachea M A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*; 20(3): 213-221.
14. Cheung J, Mak YT, Papaioannou S, Evans BA, Fogelman I, Hampson G (2003). La interleucina-6 (IL-6), IL-1, receptor activador del factor nuclear kappa B ligando (RANKL) y la producción por las células osteoblásticas osteoprotegerina humanos: Comparación de los efectos de 17-beta estradiol y el raloxifeno. *J Endocrinol*; 177:423-433.
15. CONAPO Consejo Nacional de Población (2010). Índice poblacional por localidades. San Luis Potosí. Revisado el 12 de marzo del 2015.
16. Dawson DV, Xiao X, Levy SM, Santiago-Parton S, Warren JJ, Broffitt B et al. (2009). Candidate gene associations with fluorosis in the early permanent dentition. Abstract No. 0009; IADR Meeting, Toronto.
17. De Luis Román DA, Aller De la Fuente R, De Luis J, Pérez JL, González M (2004). Papel del flúor en la osteoporosis. *Endocrinol Nut*; 51(7):426-432.

18. Espinosa R, Alonso C, Martínez C, Bayardo R (2014). Prevalencia de fluorosis dental en la zona metropolitana de Guadalajara. *Revista de Operatoria dental y biomateriales*; 3(1).
19. Espinoza J, González R, Montilla J, Paredes K (2012). Radiografía panorámica como método de detección temprana de osteoporosis en mujeres post-menopáusicas: artículo de revisión. *Acta Odontológica Venezolana*; 50:1.
20. Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C et al. (2002). Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res*;81:794–798
21. Fernández-Tresguerres I, Alobera Gracia M A, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo*; *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11:E471-E451.
22. Ferrer A, Agreda M (2005). Prevalencia de caries y fluorosis dental y evaluación de los factores de riesgo asociados. Distrito Víctor Larco Herrera, Dpto. La Libertad. Tesis Uladech.
23. Ferrer J, Caeiro Rey JR, Cano Sánchez A, Checa Vizcaíno MA, Gómez Alonso C, Guañabens Gay N, NoguésSolán J et al. (2009). Aspectos fundamentales de la calidad ósea. Doctoractive S.L. *Calidad Ósea en la Menopausia. Guía clínica de la Asociación Española para el Estudio de la Menopausia. Barcelona – España.*
24. González-Lamuño D, García Fuentes M. (2008). Enfermedades de base genética. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2008; 31 (Supl. 2): 105-126

25. Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO (2008). Dual energy x-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the International Society of Clinical Densitometry pediatric official positions. *J Clin Densitom*; 11(1):43–58.
26. Heaney RP (2006). La función del sodio alimentario en la osteoporosis. *J Am Coll Nutr*;25(3):271S-276S
27. Hernández-Castro B, Vigna-Pérez M, Doníz-Padilla L, Ortiz- Pérez MD, Jiménez-Capdeville E, González-Amaro R, et al. (2010). Effect of fluoride exposure on different immune parameters in humans. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 1-9 doi:10.3109/08923973.2010.491081.
28. Hidalgo I, Duque J, Mayor F, Zamora J (2007). Fluorosis dental: no solo un problema estético. *Rev.Cubana Estomatol*; 44 (4).
29. Hidalgo-Gato I, Duque de Estrada-Riverón J, Mayor-Hernández F, Zamora-Díaz JD (2007). Fluorosis dental: no solo un problema estético. *Revista Cubana de Estomatología*; 44(4).
30. Huang H, Ba Y, Cui L, Cheng X, Zhu J, Zhang Y et al. (2008). COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calciotropic hormone levels, and dental fluorosis. *CommunityDent Oral Epidemiol*;36(6):517-522
31. INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2013). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Salinas, San Luis Potosí, 2009*. Revisado el 14 de marzo del 2015.
32. Jarquín-Yáñez L (2014). Prevalencia de fluorosis dental y presencia de polimorfismos genéticos en una comunidad afectada por contenido de flúor en el agua de consumo.

Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales, UASLP, México.

33. Justin Tortolani P, McCarthy EF, Sponseller PD (2002). Déficit de densidad mineral ósea en Niños. *J Am Acad Orthop Surg (Ed Esp)*; 2:123-132.
34. Kurt-Sirin O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, Seyhan MF, Isbir T, Can A (2014). Combined effects of collagen type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Gene*; 540:226–231.
35. Lei SF, Deng, Liu XH, Huang QR, Qin Y, Zhou Q, et al. (2003). El polimorfismo de genes candidatos de la densidad mineral ósea en cuatro poblaciones y la comparación con otra población de diferentes etnias chinas. *J Bone Miner Metab*; 21:34-42.
36. Lewiecki EM, Watts NB, Mcclung MR, Petak SM, Bachrach LK, Shepherd JA, Downs RW (2004). Position statement. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Endocrinol Metab*; 89(8):3651-3655.
37. López Jordi M C, Amaral Schiaffino R, Kalil S (2010). Proteolisis enzimática del colágeno dentinario. *Odontoestomatología*; XII:14.
38. López-Molina MI, Hernández-López M (2006). Flúor, aplicaciones preventivas y terapéuticas. *Spin cero cuadernos de ciencia*;10
39. Lorente RM, Azpeitia J, Arévalo N, Muñoz A, García JM, Gredilla J (2012). Dual energy X-ray absorptimetry: Fundamentals, methodology, and clinical applications. *Radiology*; 54(5):410-423.



40. Mataix Verdú J, Llopis Gonzalez J, Carazo Marin E (2009). *Minerales*. Ed Nutrición para educadores, 2nd ed. Madrid: Diaz de Santos S.A., 163-171.
41. McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, et al. (2000). Systematic review of water fluoridation. *Br. Med. J*; 321:855-859.
42. Medina Y, Agreda M, Simancas Y (2010). Prevalencia de fluorosis dental, opacidades e hipoplasia del esmalte en niños en edad escolar. *Acta Odontológica Venezolana*; 48:3.
43. Mendoza-Romo M A, Escalante-Pulido J M, Martínez-Zúñiga R, Ramírez-Arriola M C (2002). Osteoporosis en mexicanas mayores de 40 años. Determinación por densitometría periférica. *Rev Med IMSS*; 41(3):193-202.
44. Modificación a la Norma Oficial Mexicana; NOM-127-SSA1-1994 (2000). Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *Diario oficial de la Federación*.
45. Murugan R Ramakrishna A (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*; 65:2385-23406.
46. Nelson DA, Barondess DA, Hendrix SL, Beck TJ (2002). Geometría de sección transversal, la fuerza del hueso, y la masa ósea en el fémur proximal en mujeres posmenopáusicas de raza blanca y negra. *J Bone Miner Res*; 15(1):992-997.
47. Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A, Palacios Gil-Antuñano S (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Rev OsteoporosMetab Miner*; 3(2):105-112.

48. Norma Oficial Mexicana: NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. Diario oficial de la Federación
49. Organización Mundial de la Salud (OMS) (1994). Evaluación del riesgo de fractura y su aplicación a la detección de la osteoporosis posmenopáusica: informe de un Grupo de Estudio de la OMS. Órgano Mundial de la Salud Tech Rep Ser; 843:1-12.
50. Organización Mundial de la Salud (OMS) (1997). Encuestas de salud bucodental. Métodos básicos, 4ta Edición. Ginebra. Última Modificación 2003.
51. Ortega-Guerrero MA (2009). Presencia, distribución, hidrogeoquímica y origen de arsénico, fluoruro y otros elementos traza disueltos en agua subterránea, a escala de cuenca hidrológica tributaria de Lerma-Chapala, México. Rev. Mex. Cienc. Geol.; 26:143-161.
52. Perez-Llamas F, Garaulet-Aza M, Hernández AG, Zamora-Navarro S (2010). Calcio, fósforo, magnesio y flúor. Metabolismo óseo y su regulación. En AG Hernández (Ed), Tratado de nutrición. Tomo I Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. (2a. Ed., pp. 897-925). Granada, España: Medica Panamericana.
53. <sup>a)</sup> Puche RC, Rigalli A (2007). Metabolismo del flúor. Actualizaciones en Osteología; 3(1):10-12.
54. <sup>b)</sup> Puche RC, Rigalli A (2007). Fluorosis esquelética. Actualizaciones en Osteología; 3(1):50-52.
55. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP)

y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Gaceta Médica de México. 2013;149:220-8

56. Raghavan R, Bipin N, Abraham A (2014). Prevalencia de fluorosis dental y el contenido de fluoruro del agua potable en las zonas rurales del distrito de Malappuram, Kerala. Int J MedSci. Salud Pública;3(1):27-30
57. Riobó-Serván P (2013). Patologías asociadas a la nutrición. Prevalencia, prevención y tratamiento nutricional. Salud ósea y patologías asociadas. En G Varela (Ed), Libro Blanco de la nutrición en España. 1a. Ed., pp. 341. España: Fundación Española de la Nutrición (FEN).
58. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
59. Seraj B, Shahrabi M, Shadfar M, Ahmadi R, Fallahzadeh M, Farrokh Eslamloo H, et al. (2012). Effect of high water fluoride concentration on the intellectual development of children in Makoo/Iran. J Dent; 9:221–229.
60. Thylstrup A, Fejerskov O (1978). Clinical appearance and surface distribution of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological change. Community Dent Oral Epidemiol; 6:315-328.
61. Torrades S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. OFFARM: 21(5).
62. Vieira A, Hancock R, Limeback H, Schwartz M, Grynpas M (2003). How does fluoride concentration in the tooth affect apatite crystal size? J Dent Res; 82 : (11):909-913.

63. Vieira AP, Hancock R, Eggertsson H, Everett ET, Grynblas MD (2005). Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. *Calcif Tissue Int*; 76(1):17-25.
64. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*; 17:319-336.
65. Willing MC, Torner JC, Burns TL, Janz KF, Marshall T, Gilmore J et al. (2003). Gene polymorphisms, bone mineral density and bone mineral content in young children: the Iowa bone development study. *Osteoporos Int.*:14(8):650-658.
66. World Health Organization (WHO) (2011). *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4th ed.; Geneva, Switzerland; 94-373.
67. Yeste D, Carrascosa A (2011). Patología del metabolismo del calcio. *Protoc diagn ter pediatr*;1:177-192
68. Yu X, Chen J, Li Y, Liu H, Hou Ch, Zeng Q et al. (2018). Threshold effects of moderately excessive fluoride exposure on children's health: A potential association between dental fluorosis and loss of excellent intelligence. *Environment International*; 118:116-124.
69. Yunpeng Ding (2011). The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *Journal of Hazardous Materials*; 186:1942-1946.
70. Zanchetta JR, Talbot JR (2001). Tratamiento. In: J.R Zanchetta, ed., *Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento*, 2nd ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 396-397.

**PRIMER ARTÍCULO. - Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosí.**

## Research Article

# Association between Urine Fluoride and Dental Fluorosis as a Toxicity Factor in a Rural Community in the State of San Luis Potosi

Lizet Jarquín-Yañez,<sup>1</sup> José de Jesús Mejía-Saavedra,<sup>1</sup>  
Nelly Molina-Frechero,<sup>2</sup> Enrique Gaona,<sup>2</sup> Diana Olivia Rocha-Amador,<sup>3</sup>  
Olga Dania López-Guzmán,<sup>4</sup> and Ronell Bologna-Molina<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Center of Applied Research in Environment and Health, CIACYT, School of Medicine, Autonomous University of San Luis Potosi, 78100 San Luis Potosi, SLP, Mexico

<sup>2</sup>Division of Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University, 04960 Mexico City, MEX, Mexico

<sup>3</sup>Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, 36050 Guanajuato, GTO, Mexico

<sup>4</sup>School of Chemical Sciences, Durango Unit, Juarez University of the State of Durango, 3400 Durango, DGO, Mexico

<sup>5</sup>Department of Research, School of Dentistry, Juarez University of the State of Durango, 34000 Durango, DGO, Mexico

Correspondence should be addressed to Nelly Molina-Frechero; [investigacion.odontologia-ujed@hotmail.com](mailto:investigacion.odontologia-ujed@hotmail.com)

Received 6 July 2014; Revised 7 December 2014; Accepted 19 January 2015

Academic Editor: Benedetto Terracini

Copyright © 2015 Lizet Jarquín-Yañez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Objective.** The aim of this study is to investigate urine fluoride concentration as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi, Mexico. **Materials and Methods.** A sample of 111 children exposed to high concentrations of fluoride in drinking water (4.13 mg/L) was evaluated. Fluoride exposure was determined by measuring urine fluoride concentration using the potentiometric method with an ion selective electrode. The diagnosis of dental fluorosis was performed by clinical examination, and the severity of damage was determined using Dean's index and the Thylstrup-Fejerskov (TF) index. **Results.** The range of exposure in the study population, evaluated through the fluoride content in urine, was 1.1 to 5.9 mg/L, with a mean of  $3.14 \pm 1.09$  mg/L. Dental fluorosis was present in all subjects, of which 95% had severe cases. Higher urine fluoride levels and greater degrees of severity occurred in older children. **Conclusions.** The results show that dental fluorosis was determined by the presence of fluoride exposure finding a high positive correlation between the severity of fluorosis and urine fluoride concentration and the years of exposure suggested a cumulative effect.

## 1. Introduction

There are contaminants in the environment in constant interaction with us that can affect our health through exposure to them. Drinking water can transmit numerous diseases caused by different pollutants; two of the most common chemicals in water that are capable of causing health problems are fluoride and arsenic. Fluoride ( $F^-$ ) is a toxic agent that causes adverse health effects, such as dental and skeletal fluorosis, reproductive and neurological effects, and endocrine disorders [1, 2].

In 1936, it was shown that the increase of fluoride content in water causes dental fluorosis, which is an alteration of tooth

enamel that can be observed as spots ranging from whitish to dark brown color and that, in severe cases, leads to the loss of tooth enamel [3]. Research suggests that fluoride affects enamel formation by making it porous. Skeletal fluorosis is a condition associated with the accumulation of fluoride in bone, resulting in brittle bones that are susceptible to tensile forces [4].

Furthermore, studies conducted in recent years suggest that fluoride is a neurotoxic agent, as research conducted in populations exposed to  $F^-$  (with water concentrations higher than 3 mg/L) supports the hypothesis that  $F^-$  decreases the intelligence quotient (IQ) of children [5, 6].

Groundwater fluoride contamination is present in 17 states in central and southwestern Mexico; in San Luis Potosi, fluoride is found naturally in high concentrations in water extracted from deep underground wells that are used for human consumption [7–9]. In a study over a decade ago there were already reports in the literature of the existence of high concentrations of fluoride in water in municipal wells in the state of San Luis Potosi with fluoride levels detected of 4.0 mg/L [10].

Dental fluorosis is a public health problem that affects the child population during the period of hard tissue formation. Its prevalence in San Luis Potosi is higher than normal; a rate of 69% was found in populations with water fluoride levels lower than 0.7 mg/L and a rate of 98% in populations with fluoride levels of 2 mg/L [10]. However, water cannot be considered the only source of fluoride exposure. Fluoride-iodized salt, certain beverages such as soda and fruit juices, and toothpaste are other factors that contribute to exposure [11].

As the main source of fluoride is drinking water, the community of La Reforma, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosi, is at high risk of developing diseases because it exceeds the permissible limit of fluoride in drinking water of 1.5 mg/L established by the NOM-127-SSA1-1994 [12]. Having waters with high fluoride concentration of 4.13 mg/L, as reported by COEPRIS [13] (State Commission for Protection against Health Risks), this community has one of the highest fluoride concentrations in the state. In addition, the high degree of marginalization in the community results in poor access to high-quality bottled water [14]. Moreover, the dry climate in the region [15] requires heightened water consumption.

High concentrations of fluoride in the community water prompted this study, the aim of which is to evaluate urine fluoride concentration as a toxicity factor of dental fluorosis in a rural community in the state of San Luis Potosi, Mexico.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Population.** The study was conducted in the community of La Reforma, Salinas de Hidalgo, in the state of San Luis Potosi, Mexico; this is an area with people of low-socioeconomic status. The community was selected due to having fluoride levels in its drinking water of 4.13 mg/L (COEPRIS, 2012) [13], which is higher than both the Mexican standard (1.5 mg/L) [12] and the level recommended by the World Health Organization (1 mg/L) [2]. The total population from 6 to 12 years were selected (one hundred and eighty school children).

The study was free, anonymous, and voluntary, and it complied with all requirements of the Bioethics Committee of the School of Medicine of the Autonomous University of San Luis Potosi.

A questionnaire was applied to the children's mothers to collect information regarding exposure to fluorides and collect information about the origin of the drinking water and if this water was used for food preparation.

The inclusion criteria were as follows: having obtained the informed consent of parents or guardians, being born and raised in the study area, having permanent dentition,

and providing a sufficient amount of urine to be analyzed. The exclusion criterion was the presence of kidney diseases. Because not all children met the requirements of the study, only 111 children who met the criteria were ultimately incorporated into the study.

The subjects were male 52.3% and female 47.7%, mean age  $9.14 \pm 1.98$  years. The children were divided into three age groups: 6 and 7 years old (35), male 51.4 and female 48.6%; 8–10 years old (37), male 45.9 and female 54.1; and 11–12 years old (39), male 59 and female 41%.

To confirm fluoride levels in the drinking water in the community, drinking water samples provided by the participants were analyzed; in these samples, a mean fluoride level of  $4.54 \pm 0.46$  mg/L was recorded.

**2.2. Urine Samples.** The collection of urine samples from each of the participants was performed in plastic containers previously washed with 10%  $\text{HNO}_3$ , collecting the first morning urine. To quantify the fluoride ions, the potentiometric method with an ion selective electrode according to method 3808 of the US National Institute for Occupational Safety and Health [16] (NIOSH) was used. A calibration curve was constructed from 0.1 to 10.0 mg/L. Samples were mixed with total ion strength adjustment buffer (TISAB) in a 1:1 ratio for quantification. Finally, the fluoride concentration of the sample was determined by interpolation of the potential in the calibration curve. As a quality control, SRM 2671<sup>a</sup> "Fluoride in Freeze-Dried Urine" (NIST) reference material was used with a recovery of  $97 \pm 6\%$ . The correction for urine dilution was performed based on specific gravity [17].

**2.3. Clinical Evaluation.** Clinical dental examination was performed according to the requirements outlined by WHO for national oral health surveys, 1997 [18], taking 10 minutes as reference time duration for the basic examination of a child. The test area was prepared with the required hygiene and safety measures, using previously sterilized instruments and having easy access to sterilization procedures and using a plane mirror and a periodontal probe.

The diagnosis of the degree of dental fluorosis was performed by applying Dean's index (DI) [18, 19] and the Thylstrup-Fejerskov index (TF) [20], which is more sensitive for individual classifications of dental organs in ten categories. A score of zero indicates healthy enamel; scores of one to four indicate spots on the enamel surface, which increase as the score increases. Enamel destruction is observed in scores five to nine, where score five represents mottled enamel with holes smaller than 2 mm in diameter, which are fused in score six to form bands less than 2 mm deep. Scores of seven, eight, and nine represent the destruction of 25%, 50%, and 100% of the enamel surface.

Interexaminer and intraexaminer calibration were performed by two examiners ( $>0.89$  Kappa). The community index of dental fluorosis was obtained by multiplying the number of children in each Dean's score by their weightings, adding the results and dividing by the number of children examined.

TABLE 1: Sample in number and percentage for groups of age and mean of dental fluorosis using TF index.

	Male	Female
Ages 6-7		
Number	18	17
Percentage	51.4	48.6
TF (95% CI)	5.5 (4.95-6.0)	5.94 (5.33-6.56)
Ages 8-10		
Number	17	20
Percentage	45.95	54.1
TF (95% CI)	6.59 (5.9-7.3)	7.0 (6.5-7.5)
Ages 11-12		
Number	23	16
Percentage	58.97	41.03
TF (95% CI)	7.04 (6.48-7.6)	7.0 (6.2-7.8)

TF: Thylstrup-Fejerskov index.  
CI: confidence interval.

2.4. *Statistical Analysis.* Data collected from oral clinical assessment and urine fluoride levels were transferred into a Microsoft EXCEL database, which was then analyzed in SPSS version 21. Variables were assessed using univariate analysis to obtain percentages and distributions. Means, standard deviations, and confidence intervals were analyzed. Frequency distribution by age group and analysis of variance between the TF dental fluorosis index and the age groups were performed. To establish the correlation between urine fluoride concentration and severity of dental fluorosis, the Spearman correlation coefficient was used.

### 3. Results

The minimum level of fluoride in urine was 1.1 mg/L, which was present in only two children in the group with ages of 6 and 7 years. The maximum exposure level was 5.9 mg/L, which was also present in two children but with ages of 9 and 11 years. The mean urine fluoride concentration of the population was  $3.14 \pm 1.09$  mg/L.

Table 1 shows the severity of dental fluorosis in the tree age groups with confidence intervals.

The urine fluoride concentration was classified into four levels: 1 to 2 mg/L, 2.01 to 3 mg/L, 3.01 to 4 mg/L, and >4 mg/L.

Figure 1 shows the distribution of the urine fluoride levels of the children, noting that at the ages of 6 to 7 years, fluoride excretion ranged between 2.01 and 3 mg/L (48.6%), with a low prevalence of high fluoride concentrations (5.7%). In the age group of 8-12 years, the prevalence of high fluoride concentrations increased, and the prevalence of low fluoride concentrations (1 and 2 mg/L) decreased.

The information collected through questionnaire reported that 100% of population used tap water for cooking and 83.8% for drinking.

All children examined showed dental fluorosis; only 5% of the children had a moderate score, while the rest (95%) had a severe score based on Dean's index. According to the TF, the

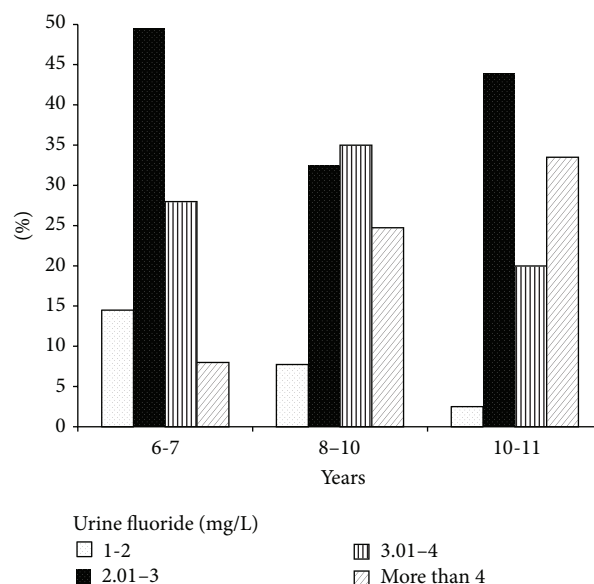


FIGURE 1: Urine fluoride concentration in children in the study area by age group as percentage.

score TF4 occurred in 4.5% of the population, TF5 in 25.2%, TF6 in 16.2%, TF7 in 28.8%, TF8 in 16.2%, and TF9 in 9%.

Children with TF4 and TF5 constituted 30% of the study population, TF6 and TF7 45%, and TF8 and TF9 25%.

At the ages of 6 and 7 years, TF4 and TF5 predominated at 57.14%, with a predominance of TF5 in 48.6%; TF6 and TF7 predominated in 76% of children aged 8 to 12 years, while the levels of greater severity, such as TF8 and TF9, were observed in 50% of the children at the ages of 11 and 12 years. This result is somewhat related to the exposure level, as children with higher urine fluoride levels were 8 and 12 years old. There were significant differences between age groups and the corresponding severity of dental fluorosis  $P < 0.000$  (Figure 2).

In relation to the presence of fluoride in urine and the severity of dental fluorosis, Figure 3 shows urine fluoride levels with mean values of  $2.66 \pm 0.89$  (95% CI 2.35-2.98) in the 33 children with TF4 and TF5,  $3.11 \pm 1.06$  (95% CI 2.81-3.41) in the 50 children with TF6 and TF7, and  $3.75 \pm 1.10$  (95% CI 3.32-4.18) in the 28 children with TF8 and TF9, with a high positive correlation between the severity of fluorosis and the urine fluoride concentration  $r = 0.99$  and  $**P < 0.01$ .

### 4. Discussion

The concentration of fluoride in drinking water in this community was found to be higher than both the Mexican standard (1.5 mg/L) and the level suggested by the WHO (1 mg/L), with a mean level of  $4.54 \text{ mg/L} \pm 0.46$ , which is even higher than the level reported in the same area in 2012 by COEPRIS [13], most likely due to the depletion of the aquifer.

Urine fluoride concentration ranged from 1.1 to 5.9 mg/L, with the lowest levels of exposure in children aged six to seven years, a period in which children are growing and with increased retention of fluoride in hard tissues, such as teeth



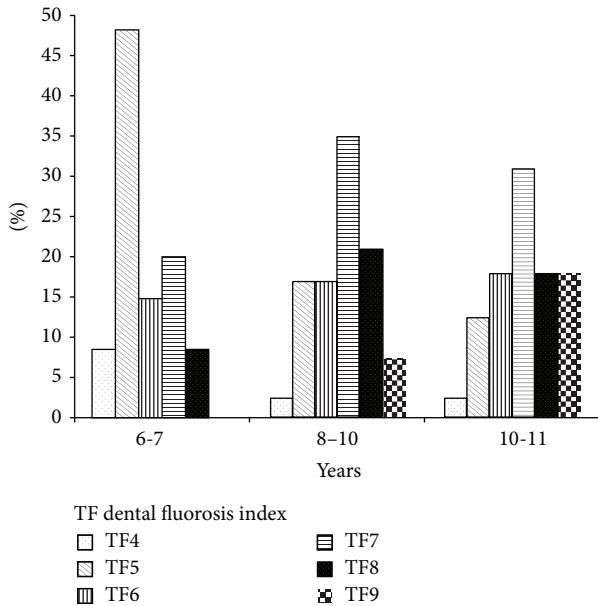


FIGURE 2: Distribution of dental fluorosis according to the TF index by age group as percentage.

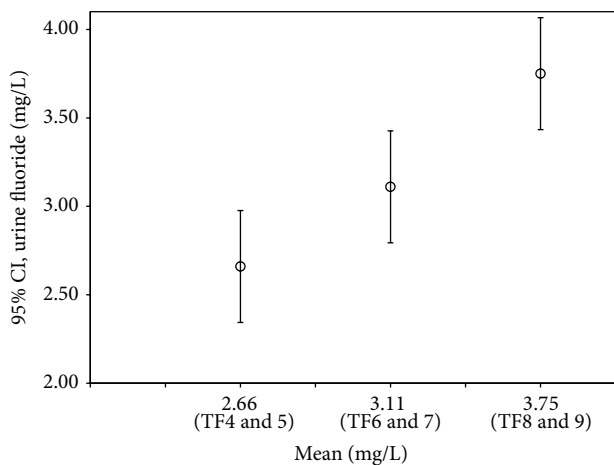


FIGURE 3: Urine fluoride levels and their relation to dental fluorosis scores.

and bones. Most fluoride exposure occurred in the older group.

The study conducted by Grimaldo et al. [8] in the city of San Luis Potosi determined risk factors associated with human fluoride exposure through drinking water; preparing food with tap water was one of them. This risk factor was also present in this study; as the location was a rural area of high marginalization, 83.8% of the study population used tap water for drinking, and 100% used it for cooking.

The children with higher urine fluoride levels (more than 4 mg/L) were aged 8 and 12 years. This result is possibly due to the longer exposure time and the cumulative effect of fluoride stored in bones and teeth, particularly in growing organisms due to the greater fluoride retention in children's bones, which

is caused by high blood flow and a large area of hydroxyapatite crystals unlike mature bone.

Due to the fluoride water concentration in the area, dental fluorosis in this study was severe in 95% of the study population, in agreement with the results of the study conducted by Grimaldo et al. [9] in 1997 in the city of San Luis Potosi. These authors reported a prevalence of dental fluorosis in 96% of children aged 11 to 13 years in an area with a mean fluoride concentration of 3.29 mg/L. In contrast, in the current study, the prevalence was 100% at a higher fluoride concentration in drinking water and in younger children. Our study determined not only the prevalence of dental fluorosis but also the exposure level and the assessment of the degree of severity of dental fluorosis according to the TF index.

The degrees of greater severity of dental fluorosis TF8 and TF9 occurred in a higher percentage in children aged 11 and 12 years, most likely due to longer exposure to fluoride and the presence of a greater number of permanent teeth.

Fluorosis is irreversible, as the teeth remain fragile and susceptible to rupture, and prosthetic dental treatments that stop tooth destruction are expensive; thus, patients and their families often cannot afford them, leading to the loss of teeth and consequent effects on the individual's quality of life.

The present work showed the limitations of a cross-sectional study. For accuracy, the urine collection should be done over a period of 24 hours.

Our results show the close relationship between fluoride exposure caused by high intake of fluoride through drinking water and the severity of dental fluorosis, which affects the quality of life of the population studied. There is a need for further studies in this community to identify other factors that are exacerbating exposure.

**Conflict of Interests**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

**References**

- [1] CDC, *Review of Fluoride: Benefits and Risks*, Department of Health and Human Services, Washington, DC, USA, 1991.
- [2] OMS, *Guidelines for Drinking Water Quality: Recommendations*, vol. 1, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 3rd edition, 2004.
- [3] A. K. Mascarenhas, "Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature," *Pediatric Dentistry*, vol. 22, no. 4, pp. 269-277, 2000.
- [4] R. Puche and A. Rigalli, "Fluorosis esquelética," *Actualizaciones en Osteología*, vol. 3, pp. 50-52, 2007.
- [5] Y. Lu, Z. R. Sun, L. N. Wu, X. Wang, W. Lu, and S. S. Liu, "Effect of high-fluoride water on intelligence in children," *Fluoride*, vol. 33, no. 2, pp. 74-78, 2000.
- [6] D. Rocha-Amador, M. E. Navarro, L. Carrizales, R. Morales, and J. Calderón, "Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water," *Cadernos de Saude Publica*, vol. 23, no. 4, pp. S579-S587, 2007.
- [7] Secretaria de Salud, *Manual Para el Uso de Fluoruros Dentales en la República Mexicana*, Secretaria de Salud, 2006.

- [8] M. Grimaldo, V. H. Borja-Aburto, A. L. Ramirez, M. Ponce, M. Rosas, and F. Diaz-Barriga, "Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride," *Environmental Research*, vol. 68, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [9] M. Grimaldo, F. Turrubiartes, J. Milan, A. Pozos, C. Alfaro, and F. Díaz-Barriga, "Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. III. Screening for fluoride exposure with a geographic information system," *Fluoride*, vol. 30, no. 1, pp. 33–40, 1997.
- [10] J. P. Loyola-Rodríguez, A. J. Pozos-Guillén, and J. C. Hernández-Guerrero, "Bebidas embotelladas como fuentes adicionales de exposición a flúor," *Salud Pública de México*, vol. 40, no. 5, pp. 438–441, 1998.
- [11] G. Gutiérrez-Trujillo, S. Flores-Huerta, I. H. Fernández-Gárate et al., "Estrategia de prestación y evaluación de servicios preventivos," *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 44, supplement 1, pp. S3–S21, 2006.
- [12] Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización," Diario Oficial de la Federación.
- [13] "Comisión Estatal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COEPRIS)," San Luis Potosí, S.L.P., México, March 2014, <http://www.coeprisslp.gob.mx/>.
- [14] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), *Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos*, Salinas, San Luis Potosí, Mexico, 2009.
- [15] Consejo Nacional de Población (CONAPO), *Índice de Marginación por Localidad*, Consejo Nacional de Población (CONAPO), San Luis Potosí, Mexico, 2010.
- [16] National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), "Fluoride in urine," in *Manual of Analytical Methods*, vol. 11, pp. 8308-1–8308-3, US Department of Health and Human Services, 3rd edition, 1984.
- [17] T. E. Barber and G. Wallis, "Correction of urinary mercury concentration by specific gravity, osmolality, and creatinine," *Journal of Occupational Medicine*, vol. 28, no. 5, pp. 354–359, 1986.
- [18] World Health Organization, *Oral Health Survey-Basic Methods*, WHO, Geneva, Switzerland, 3rd edition, 1987.
- [19] R. G. Rozier, "Epidemiologic indices for measuring the clinical manifestations of dental fluorosis: overview and critique," *Advances in Dental Research*, vol. 8, no. 1, pp. 39–55, 1994.
- [20] A. Thylstrup and O. Fejerskov, "Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes," *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, vol. 6, no. 6, pp. 315–328, 1978.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



**SEGUNDO ARTÍCULO. - Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis.**

# Collagenase 1A2 (*COL1A2*) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis

Diana Escobar-García<sup>1</sup>, Jesús Mejía-Saavedra<sup>2</sup>, Lizet Jarquín-Yáñez<sup>2</sup>, Nelly Molina-Frechero<sup>3</sup> and Amaury Pozos-Guillén<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México,

<sup>2</sup>Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud (CIACYT-Facultad de Medicina) Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México,

<sup>3</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México

Escobar-García D, Mejía-Saavedra J, Jarquín-Yáñez L, Molina-Frechero N, Pozos-Guillén A. Collagenase 1A2 (*COL1A2*) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis. Community Dent Oral Epidemiol 2016; 44: 162–168. © 2015 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

**Abstract – Objectives:** The aim of this study was to evaluate the putative association between the presence of the *COL1A2* gene A/C polymorphism and the severity of dental fluorosis in a sample exposed to high concentrations of fluoride. **Methods:** A cross-sectional study was carried out that included 80 children residing in a community with high concentrations of fluoride in the drinking water. To determine whether the presence of this polymorphism and dental fluorosis are associated, the presence of the dental fluorosis was considered to be a response variable, while fluoride concentration in water and urine was designated as independent variables. In addition, the children's parents completed questionnaires with general information about drinking and cooking with tap water, consumption of milk and soft drinks, and other putative risk factors. **Results:** Individuals with the polymorphism had nonsignificant odds (OR = 2.24; 95% CI = 0.55–9.02) of having dental fluorosis at higher exposures to fluoride. This finding was similar in individuals without the polymorphism (OR = 1.65; 95% CI = 0.44–6.17). **Conclusions:** The presence of polymorphism in the *COL1A2* gene was not associated with the severity of dental fluorosis.

**Key words:** *COL1A2*; dental fluorosis; polymorphisms

Amaury Pozos Guillén, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava #2, Zona Universitaria, C.P. 78290; San Luis Potosí, S.L.P. México  
Tel.: 52 (444)8262357 X 5134  
Fax: 52 (444)8139743  
e-mail: apozos@uaslp.mx

Submitted 8 January 2015  
accepted 9 October 2015

Environmental fluoride only exists in combination with other elements due to its marked electronegativity. In humans, one of the forms of exposure is via tap water with a high concentration of fluoride (1), and it is absorbed mainly in the gastrointestinal tract (2). The concentration of fluoride in aquifers depends on several factors, as follows: (i) the concentration of fluoride in existing minerals, (ii) the rates of decomposition, dissociation, and dissolution of the mineral, (iii) the length of time the groundwater is in the aquifer and (iv) the kinetics of reaction among the metals in the aquifer, with the previous characteristics being different for each aquifer (3).

Consuming water with concentrations of fluoride above those recommended by the World

Health Organization (WHO) (1.5 mg/l) (4) can cause, in childhood, the accumulation of fluoride in calcium-rich tissues, which may affect hard tissues (bones and teeth) (5).

Dental fluorosis is a public health problem in some countries (6), especially in those dependent on groundwater for their drinking water supply, such as India, Argentina, and Mexico (3, 7), among others. Dental fluorosis is an irreversible disorder that affects people whose main intake of high fluoride occurs during tooth formation, enamel secretion and subsequent pre-eruptive maturation, and consuming high fluoride concentrations at this stage aids the formation of fluorapatite crystals and hydroxy-fluorapatite, disrupting enamel mineralization (8, 9). It has also been shown that exces-

sive and high levels of fluoride intake affects mineralization and for long periods, can also reduce bone density, negatively affecting bone health, causing weakening and deformities (10), resulting in a greater risk of fracture and other problems due to skeletal fluorosis. Although previous studies have shown that the degree of dental fluorosis is directly associated with the concentration of fluoride in the drinking water, the mechanisms involved are not entirely clear. Currently, it is estimated that approximately 43 million people (3.3%) in the Chinese population have dental fluorosis (11). Dental fluorosis is not a problem exclusive to China; the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA, USA) reported that approximately 32% of children in the U.S. have some form of dental fluorosis, including moderate and severe forms (12). The identification of susceptible populations could be a way to reduce this problem.

Collagen is a protein that strengthens and supports the formation of bone and many other tissues, including cartilage, tendons, and skin. Two genes, *COL1A1* and *COL1A2* (collagen type I alpha 1 and collagen type 1 alpha 2), are responsible for forming collagen. Specifically, the *COL1A1* gene produces a component of collagen type I called the pro-alpha-1 chain, while the *COL1A2* gene produces the pro-alpha-2 chain (13, 14). The chains combine to make one molecule of type I procollagen, and collagenase is a fibril-forming collagen found in the majority of connective tissues and is abundant in the bones, cornea, dermis, and tendons. Bone collagen fibers are mineralized by calcium hydroxyapatite.

Some of the mutations in the collagenase gene are associated with different types of osteogenesis imperfecta, recessive classical type Ehlers–Danlos syndrome, idiopathic osteoporosis, and atypical Marfan syndrome (15). The important role of collagen and collagenase in the formation and architecture of hard tissues means that *COL1A1* and *COL1A2* polymorphisms can influence the onset and severity of dental fluorosis. The *COL1A* gene is located in the q21.3–q22.1 portion of chromosome 7, and mutations in the *COL1A2* gene have been associated with a wide spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels, and variations in *COL1A2* genotypes are associated with the development of dental fluorosis (15). Studies have established differential susceptibility to the development of dental fluorosis; likewise, epidemiological studies have found differences in the

prevalence of fluorosis among racial/ethnic groups; (16) these differences do not appear to be explained only by fluoride intake levels. Others studies have found a significant association between polymorphism in the *COL1A2* gene and bone development as well as bone content and bone mineral density (17).

The etiology of dental fluorosis is not well understood, although the main risk factor is generally a high intake of fluoride during tooth formation. However, there have been several indications of a possible influence of genetic factors in susceptibility to the development of dental fluorosis (18). These factors led to the hypothesis that genetic polymorphisms play a role in the formation of hard tissues or pathogenesis and that *COL1A2* genes can be considered to be useful factors in the elucidation of the etiology, development, and severity of dental fluorosis; (19–21) little is known about the role of the genes involved in determining susceptibility to the condition (22). Few studies have investigated a genetic predisposition for dental fluorosis, and little is known about the role of genes involved in the process.

The aim of this study was to investigate the association between the presence of the *COL1A2* A/C polymorphism and the severity of dental fluorosis in children exposed to high fluoride concentrations in drinking water.

## Materials and methods

A cross-sectional study was carried out that included 80 children (70% rate response) who voluntarily agreed to participate, and each child presented a letter of informed consent signed by a parent or guardian; the confidentiality of the participants was preserved during the study. A convenience nonprobabilistic sample method was used based on the response of each parent/child, recruited in the public school of the community. The study was conducted in La Reforma, a community localized in the North Central state of San Luis Potosi, Mexico. This region is characterized by high concentrations of fluoride in the drinking water (4.5 mg/L). The Institutional Bioethics Committee approved this study. Each individual who participated in the study responded to a questionnaire collecting general data, including lifestyle and risk factors for the development of fluorosis. At the time of the study, all participants were required to meet the following criteria: (i) living in

the area since birth, (ii) drinking the water and cooking with the water from the local network, (iii) good health and (iv) the absence of chronic diseases or recent medication (1 month).

The samples of ingested water and urine (first morning urine) were collected in the houses of the participants. Samples were collected in polypropylene containers previously washed with 10% nitric acid and finally rinsed with distilled water, transported in ice and stored at 4°C until analysis. Quantification of fluoride was performed by a potentiometric method with an ion-selective electrode (21). Briefly, the calibration curve was prepared in a range of 0.1–10.0 mg/L. Samples for quantitation were mixed with high total ionic strength adjustment buffer (TISAB) at a 1:1 ratio. Finally, the sample's fluoride concentration was determined by interpolation in the calibration curve. For quality-control reference material, the standard reference material (SRM) 2671 Fluoride in Freeze-Dried Urine [National Institute of Standards and Technology (US) (NIST)] was used, with a  $97 \pm 6\%$  recovery. The effect of urine dilution was corrected by specific gravity (23, 24). Samples were analyzed in triplicate, and the mean was reported.

The clinical dental evaluation was carried out according to the recommendations set by the WHO for national oral health surveys, with reference to a 10-min time period for basic dental examination of a child. Dental fluorosis was assessed on each child using a sterile dental mirror and a dental explorer under natural light in the classroom by one examiner. Diagnosis of dental fluorosis was performed in all present teeth by applying the Thylstrup and Fejerskov Index (TF) (25), where 0 indicates unaffected enamel and grades 1–4 denote white opacity on the enamel surface; the grade increases as the level of dental fluorosis increases. In grades 5–9, destruction of enamel is observed, in which grade 5 represents dark stains and pits (<2 mm in diameter) of the enamel. Grade 6 shows pits <2 mm deep. Grades 7, 8, and 9 represent the loss of tooth structure on 25%, 50%, and 100% of the enamel

surface, respectively. The mean TF score was obtained by adding the scores and dividing by the number of teeth examined. Previous studies in 20 children's with different degrees of dental fluorosis, and two examiners were completed to assess the reproducibility of interexaminer and intra-examiner recording of the TF index (>0.80 Kappa).

Epithelial cells were obtained by scraping the oral mucosa with a cytology brush, with one prior cleaning with a 0.07% cetylpyridinium chloride solution for five-seconds. Once the samples were taken, the sample brushes were placed in 15-mL conical tubes containing 5 mL of phosphate-buffered solution (PBS). The samples were stored at 4°C until they reached the laboratory, where they were centrifuged; subsequently, the cells were washed with PBS and stored at 70°C until processing. The DNA was isolated and purified with the aid of a Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Qiagen Sample & Assay Technologies, Hilden, Germany), and it was finally quantified by optical density (OD) at 260/280 nm with a NanoDrop™ 2000/2000c Thermo Scientific Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, USA). DNA samples were required to have a 260/280 ratio of 1.8 to be included in the PCR amplification experiments. Dilutions of DNA samples were performed with ultrapure water.

Amplification by PCR was performed for *COL1A2* with specific primers designed using the AmplifX 1.5.4 program (CNRS, Aix-Marseille Université - <http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>) under the amplification conditions summarized in Table 1. The reaction mixture (50 µL) contained 25 ng DNA, 25 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), and a sufficient amount of nuclease-free water to complete a 50 µL reaction. The amplified product was tested on agarose gel at 1%.

To detect polymorphisms A/C and ATG, the amplified product (50 µL) was purified with a Wizard® SV purification kit gel and the Promega PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and sent to the National Labo-

Table 1. Oligonucleotides and conditions employed for the detection of the *COL1A2* polymorphism

Polymorphism	A/C rs 412777	ATG rs 414408
Primer forward	AGGTCCTGTCGTAAGTATTGCTC	
Primer reverse	AGGAAAACCTGCAGGCCACTT	
Size of PCR product	706 pb	
Cycle number	40	
Annealing T°	56.8	

PCR, polymerase chain reaction.

ratory of Agricultural Biotechnology, Medical and Environmental LANBEMA-IPICyT to be sequenced in both directions (5'-3' and 3'-5'). The sequences were analyzed with the BioEdit Sequence Alignment Editor (Carlsbad, CA, USA).

All variables were assessed using univariate analysis to obtain frequencies, percentages, distributions, means, and standard deviations. To estimate whether the presence of the polymorphism and the dental fluorosis mean score (TF index) were associated, the unadjusted odds ratio (OR, 95% CI) and Spearman correlation coefficient were used. The SigmaPlot ver. 11.0 statistical software package was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

Eighty children were recruited of whom 41.3% ( $n = 33$ ) were female. The mean age of all participants was 9.1 years (SD 1.9, range 6–12). Table 2 presents summary data on the general characteristics of the study sample, which indicates that >92% of the population drank tap water, 46% of the population did not consume milk; 38% consumed soft drinks; and >90% did not know the risks of consuming local tap water or the risks of dental fluorosis.

According to clinical examination, 100% of the population had dental fluorosis with different levels severity, with a mean TF score of 6.5, considering all present teeth. The distribution of the sample according to the TF was as follows: 0% of the samples was classified as score 0.0–3.9;

6.2% as a score of 4.0–4.9; 25% as a score of 5.0–5.9; 12.5% as a score of 6.0–6.9; 30% as a score of 7.0–7.9; 18.7% as a score of 8.0–8.9, and 7.5% as a score of 9.0 (Table 3). At the age of 6–7 years, a score of 5 predominated at 48.6%, while the levels of greater severity (scores 8.0 and 9.0) were observed in 50% of the children aged 11–12 years.

The tap water taken from the participants' houses (which was reportedly used by the study sample families for drinking and cooking) had an average concentration of fluoride of  $4.5 \pm 0.46$  mg/L; all samples were >1.5 mg/L. The average fluoride concentration in urine for the study sample was  $3.1 \pm 1.0$  mg/L, with a minimal value of 1.1 and a maximal value of 5.9 mg/L.

The presence of polymorphism was designated as follows: the wild-type genotype was given the letters A/A, the heterozygous genotype was assigned the letters A/C, and the homozygous genotype was assigned the letters C/C, while the A/T/C polymorphism was not assigned a classification because such an individual was not found in the study samples. A general analysis of the presence of the polymorphisms studied demonstrated that 47.5% of the population had some kind of polymorphic genotype (A/C, C/C) (Table 4). Those with the polymorphism had a nonsignificant OR = 2.24; 95% confidence interval (95% CI) = 0.55–9.02 for dental fluorosis at higher exposures to fluoride (fluoride concentration in urine). This finding was similar to that in individuals without the polymorphism (OR = 1.65; 95% CI = 0.44–6.17) (Table 5). Furthermore, a correlation between the

Table 2. Summary of the characteristics of the study group

Variable	Mean $\pm$ SD	Range	%
Age (years)	9.1 $\pm$ 1.9	6–12	–
Fluoride in tap water (mg/L)	4.5 $\pm$ 0.46	3.9–5.3	–
Urine fluoride (mg/L)	3.1 $\pm$ 1.0	1.1–5.9	–
TF*	6.5 $\pm$ 1.3	4–9	–
Gender	–	–	Feminine 41.3 Masculine 58.7
% of population who drink tap water	–	–	84.0
% of population who know the risk of fluoride exposition (based on the questionnaire)	–	–	8.2
% of population who use tap water for cooking	–	–	100
% of population who drink milk (at least three times per week)	–	–	54.5
% of population who consume soft drinks (at least three times per week)	–	–	38.1

TF, Thylstrup–Fejerskov Index; SD, Standard deviation. mg/L: ppm.

\*Average of all present teeth.



Table 3. Fluoride concentrations in water/urine by TF index

TF index <sup>a</sup>	Frequency (%)	Sample type	Fluoride concentrations <sup>b</sup>	Range
4.0–4.9	5 (6.2)	Water	4.4 ± 0.3	4.0–4.9
		Urine	2.7 ± 0.9	2.0–4.0
5.0–5.9	20 (25)	Water	4.5 ± 0.5	3.9–5.3
		Urine	2.7 ± 0.9	1.1–4.7
6.0–6.9	10 (12.5)	Water	4.3 ± 0.3	3.9–4.7
		Urine	2.5 ± 0.5	1.7–3.6
7.0–7.9	24 (30)	Water	4.7 ± 0.4	4.0–5.3
		Urine	3.4 ± 1.1	2.2–5.6
8.0–8.9	15 (18.8)	Water	4.5 ± 0.5	3.9–5.3
		Urine	3.3 ± 1.0	2.0–5.1
9.0	6 (7.5)	Water	4.6 ± 0.5	3.9–5.3
		Urine	4.3 ± 0.7	3.7–5.4

*n* = 80 individuals.

TF: Dental Fluorosis Index by Thylstrup and Fejerskov.

None individual had TF score of 0–3.9

<sup>a</sup>Average of all teeth.

<sup>b</sup>Fluoride concentrations are expressed as mean ± standard deviation (SD) in mg/mL.

Table 4. Polymorphisms and allelic frequencies of COL1A2

dbSNP rs#	Frequencies <i>n</i> (%)			Allelic variant frequency
	A/A	A/C	C/C	
rs 412777	42 (52.5)	36 (45.0)	2 (2.5)	0.47

dbSNP = Single nucleotide polymorphism database.

A/A wild type, A/C heterozygous, C/C homozygous.

severity of fluorosis and water/urine fluoride concentrations in all three groups (nonpolymorphic A/A, polymorphic A/C, C/C) was significant only in nonpolymorphic individuals (A/A)  $r = 0.42$ ,  $P = 0.005$ ) (Table 6).

## Discussion

The level of fluoride found in the drinking water of the study sample is above the limit allowed by the Official Mexican Norm (NOM-127-SSA1-1994) (26)

and the value recommended by the WHO (1.5 mg/L) (4), with a mean of  $4.54 \pm 0.46$  mg/l. The most severe degrees of dental fluorosis in the sample studied were scores 8 and 9, and these were recorded at a higher rate in children aged 11 and 12 years, which may be linked to the fact that in this same population, higher concentrations were found in the urine because these children were exposed to fluoride for longer periods of time. Although dental fluorosis is considered a cosmetic problem, it is important to emphasize that it represents an irreversible problem in which in advanced stages involves pitting and loss of tooth structure and the teeth are fragile and susceptible to caries and fractures, leading to restorative dental treatments, which are frequently lengthy and expensive.

In addition, the consumption of water with high fluoride concentrations may cause damage to the nervous system (27), the renal system (28, 29), and to bone tissue formation (30). It is possible that the

Table 5. Association of dental fluorosis (TF) and exposure level versus polymorphism

	Polymorphism (A/C, C/C)				Nonpolymorphism (A/A)			
	TF <sup>a</sup>				TF <sup>a</sup>			
	6, 7, 8, 9	4, 5	<i>N</i>	OR (95% CI)	6, 7, 8, 9	4, 5	<i>N</i>	OR (95% CI)
Concentration of fluoride >3 mg/L <sup>b</sup>	16	5	21	2.24 (0.55–9.02)	17	6	23	1.65 (0.44–6.17)
Concentration of fluoride <3 mg/L <sup>b</sup>	10	7	17		12	7	19	

OR = Odds Ratio (95% CI).

TF: Thylstrup–Fejerskov Index.

<sup>a</sup>Average of all present teeth.

<sup>b</sup>Concentration of fluoride in urine.

Table 6. Correlation test using Spearman's rho

Variables	<i>r</i>		<i>r</i> <sup>2</sup>	
	AA	A/C, C/C	AA	A/C, C/C
Urine F TF <sup>a</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.40	0.17	0.16
Water F TF <sup>a</sup>	0.28	0.001	0.08	0.000001
Water F Urine F	0.32	0.04	0.10	0.002

TF: Dental Fluorosis Index by Thylstrup and Fejerskov.

A/A: wild type, A/C heterozygous, C/C homozygous.

<sup>a</sup>Average of all teeth.

<sup>b</sup>*P* = 0.005.

polymorphisms in the *COL1A2* gene are related to dental fluorosis and may influence the formation of teeth in children exposed to high concentrations of fluoride (31).

Some genes associated with severe dental fluorosis are also associated with bone mineral content and density due to the similarities in the structure and formation of bones and teeth; (32) others are involved in the formation of the protein matrix during tooth development. Some of these candidate genes include those for type 1 collagen, osteocalcin, osteonectin, and osteopontin. New studies should consider these genes to evaluate their influence. There have been studies in which an association was found between the mutation of the *COL1A2* gene in children, bone density, and dental fluorosis (33, 34). Interestingly, few studies have been conducted with humans to assess the genetic susceptibility associated with dental fluorosis, and studies have not been conducted in Mexican children.

This study represents a preliminary report that considers genetic factors in the evaluation of interindividual susceptibility in terms of the development of dental fluorosis. This susceptibility can be evaluated not only as a marker of severity of fluorosis development but could potentially also be a starting point for the evaluation of markers of other diseases in which the role of collagenase is known. The presence of the polymorphism evaluated in the sample is associated with bone diseases, such as osteogenesis imperfecta, Marfan syndrome, Alport syndrome, cerebral aneurysm, osteoporosis, and fractures, among others (35).

In Mexico, approximately 6 million people, of whom 35% are children, live in areas with fluoride-contaminated aquifers; therefore, the evaluation of the presence of a polymorphism in the *COL1A2* gene in the population is certainly an important finding (36). In the study sample, the correlation between severity of dental fluorosis and fluoride exposure level (urine/water fluoride concentra-

tions) was statistically significant only in A/A. A possible limitation of the study was that the concentration of fluoride in water was so high that it possibly influenced the detection of the real effect that *COL1A2* polymorphism has on the development and severity of dental fluorosis. Although the effect of *COL1A2* polymorphism in the severity of dental fluorosis has been analyzed in previous studies, the underlying mechanisms are still unclear. Moreover, it is necessary to design new studies that include a larger number of unrelated individuals and different exposures to fluoride to consolidate the available evidence and understand the possible effect of *COL1A2* polymorphism on the severity of dental fluorosis.

Our findings do not match those of other studies possibly due to the sample size of the study population, with few inhabitants and a high degree of consanguinity, the concentration of fluoride in the water is high with an average of 4.5 mg/L, which can cause dental fluorosis even in individuals without the polymorphism.

In conclusion, in the sample studied here, the presence of polymorphism in the *COL1A2* gene was not associated with the severity of dental fluorosis.

## Acknowledgements

This work was supported partially by 'Red Universitaria en Salud y Contaminación Ambiental' (PROMEPA) and PROFOCIE-UASLP 2014 grants.

## References

1. Mandinic Z, Curcic M, Antonijevic B, Carevic M, Mandic J, Djukic-Cosic D et al. Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Sci Total Environ* 2010;408:3507–12.
2. Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci* 2011;22:20–36.
3. Molina-Frecherio N, Sánchez-Pérez L, Castañeda-Castaneira E, Oropeza-Oropeza A, Gaona E, Salas-Pacheco J et al. Drinking water fluoride levels for a city in northern Mexico (Durango) determined using a direct electrochemical method and their potential effects on oral health. *Scientific World Journal* 2013;2013:1–6.
4. WHO. Guidelines for drinking-water quality, 4th edn. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
5. Yan X, Hao X, Nie Q, Feng C, Wang H, Sun Z et al. Effects of fluoride on the ultrastructure and expression of Type I collagen in rat hard tissue. *Chemosphere* 2015;128:36–41.

6. Majumdar KK, Sundarraj SN. Health impact of supplying safe drinking water on patients having various clinical manifestations of fluorosis in an endemic village of west bengal. *Family Med Prim Care* 2013;2:74–8.
7. Estrada-Capetillo BL, Ortiz-Pérez MD, Salgado-Bustamante M, Calderón-Aranda E, Rodríguez-Pinal CJ, Reynaga-Hernández E et al. Arsenic and fluoride co-exposure affects the expression of apoptotic and inflammatory genes and proteins in mononuclear cells from children. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014;761:27–34.
8. Harding MA, O'Mullane DM. Water fluoridation and oral health. *Acta Med Acad* 2013;42:131–9.
9. Lyaruu DM, Medina JF, Sarvide S, Bervoets TJ, Everts V, Denbesten P et al. Barrier formation: potential molecular mechanism of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2014;93:96–102.
10. Melaku Z, Assefa G, Enqusilassie F, Bjorvatn K, Tekle-Haimanot R. Epidemiology of skeletal fluorosis in Ethiopia: a community based survey. *Ethiop Med J* 2012;50:307–13.
11. Zhang Y, Cheng R, Cheng G, Zhang X. Prevalence of dentine hypersensitivity in Chinese rural adults with dental fluorosis. *J Oral Rehabil* 2014;41:289–95.
12. Beltrán-Aguilar ED, Barker L, Dye BA. Prevalence and severity of dental fluorosis in the United States, 1999–2004. *NCHS Data Brief* 2010;53:1–8.
13. Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic. *Blood* 2014;124:1242–50.
14. Mienaltowski MJ, Birk DE. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:5–29.
15. Kurt-Sirin O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, Seyhan MF, Isbir T, Can A. Combined effects of collagen type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Gene* 2014;540:226–31.
16. Heller KE, Sohn W, Burt BA, Feigal RJ. Water consumption and nursing characteristics of infants by race and ethnicity. *J Public Health Dent* 2000;60:140–6.
17. Fan X, Tang L. Aberrant and alternative splicing in skeletal system disease. *Gene* 2013;528:21–6.
18. Dawson DV. Preliminary evidence of an association between COL1A2 polymorphisms and dental fluorosis in a population with high fluoride exposure. *J Evid Based Dent Pract* 2010;10:96–8.
19. Blades HZ, Arundel P, Carlino WA, Dalton A, Crook JS, Freeman JV et al. Collagen gene polymorphisms influence fracture risk and bone mass acquisition during childhood and adolescent growth. *Bone* 2010;47:989–94.
20. Stephen J, Shukla A, Dalal A, Girisha KM, Shah H, Gupta N et al. Mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1482–9.
21. Flores-Méndez M, Ramírez D, Alamillo N, Hernández-Kelly LC, Del Razo LM, Ortega A. Fluoride exposure regulates the elongation phase of protein synthesis in cultured Bergmann glial cells. *Toxicol Lett* 2014;229:126–33.
22. Wu Y, Hao YQ, Li JY, Zhou XD. Gene expression profiles of the incisor pulp tissue during fluorosis. *Int Endod J* 2010;43:629–36.
23. Barber TE, Wallis G. Correction of urinary mercury concentration by specific gravity, osmolality and creatinine. *J Occup Med* 1986;28:354–9.
24. Kavouras SA. Assessing hydration status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:519–24.
25. Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance and surface distribution of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological change. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978;6:315–28.
26. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización,” *Diario Oficial de la Federación*.
27. Jiang S, Su J, Yao S, Zhang Y, Cao F, Wang F et al. Fluoride and arsenic exposure impairs learning and memory and decreases mGluR5 expression in the hippocampus and cortex in rats. *PLoS ONE* 2014;9:e96041.
28. Cárdenas-González MC, Del Razo LM, Barrera-Chimal J, Jacobo-Estrada T, López-Bayghen E, Bobadilla NA et al. Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;272:888–94.
29. Jyothikiran H, Shanthara JR, Subbiah P, Thomas M. Craniofacial imaging in orthodontics- past present and future. *Int J Orthod Milwaukee* 2014;25:21–6.
30. Luo Q, Leng H, Wang X, Zhou Y, Rong Q. The role of water and mineral-collagen interfacial bonding on microdamage progression in bone. *J Orthop Res* 2014;2:217–23.
31. Feng XY, Zhao YM, Wang WJ, Ge LH. Msx1 regulates proliferation and differentiation of mouse dental mesenchymal cells in culture. *Eur J Oral Sci* 2013;121:412–20.
32. Kaneto CM, Lima PS, Zanette DL, Prata KL, Pina Neto JM, de Paula FJ et al. COL1A1 and miR-29b show lower expression levels during osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells from osteogenesis imperfecta patients. *BMC Med Genet* 2014;15:45.
33. Huang H, Ba Y, Cui L, Cheng X, Zhu J, Zhang Y et al. COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calcitropic hormone levels, and dental fluorosis. *Community Dent Oral Epidemiol* 2008;36:517–22.
34. Urreiziti R, García-Giralt N, Riancho JA, González-Macías J, Civit S, Güerri R et al. COL1A1 haplotypes and hip fracture. *J Bone Miner Res* 2012;27:950–3.
35. Willing MC, Torner JC, Burns TL, Janz KF, Marshall T, Gilmore J et al. Gene polymorphisms, bone mineral density and bone mineral content in young children: the Iowa Bone Development Study. *Osteoporos Int* 2003;14:650–8.
36. Betancourt-Lineares A, Irigoyen-Camacho ME, Mejía-González A, Zepeda-Zapeda M, Sánchez-Pérez L. Dental fluorosis prevalence in Mexican localities of 27 states and the D.F.: six years after the publication of the Salt Fluoridation Mexican Official Regulation. *Rev Invest Clin* 2013;65:237–47.

**TERCER ARTÍCULO. - Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in  
Mexican children.**



## Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in Mexican children



Lizet Jarquín-Yñezá<sup>a</sup>, Jorge Alejandro Alegría-Torres<sup>b</sup>, Claudia G. Castillo<sup>a</sup>,  
José de Jesús Mejía-Saavedra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona No. 550, Lomas 2da. sección, CP 78210 San Luis Potosí, SLP, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, CP 36050 Guanajuato, Gto., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Polymorphism  
Risk factor  
Dental fluorosis  
Fluoride  
Collagen  
Gene

### ABSTRACT

**Objective:** To determine the allelic and genotypic frequencies of *rs 412777* polymorphism in the Collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*) gene and the association with the severity of dental fluorosis in children between 6 and 12 years old in the State of San Luis Potosi, Mexico.

**Design:** A cross-sectional study was designed; participants were 230 children from two rural communities of San Luis Potosí. Fluoride in drinking water and urine samples was quantified using a potentiometric method with a selective ion electrode. Dental fluorosis was diagnosed using the Thylstrup-Fejerskov index while the identification of the polymorphism was made by allelic discrimination, using allele-specific probes by real-time Polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was carried out with Student's *t*-test and Chi-square and Odds Ratio (OR). A confidence interval of 95% and a value of  $p < 0.05$  were considered.

**Results:** The concentration of fluoride in drinking water was  $2.36 \pm 0.02$  mg/L in Ojo Caliente and  $4.56 \pm 0.07$  mg/L in La Reforma, the concentration of fluoride in urine was  $2.05 \pm 0.62$  mg/L and  $2.99 \pm 0.99$  mg/L respectively. The prevalence of dental fluorosis was 100% and the frequency of alleles was 67% wild-type and 33% mutant allelic, alleles were found in Hardy-Weinberg equilibrium ( $X^2 = 0.33, p = 0.89$ ). The association between the degree of dental fluorosis and the evaluated polymorphism was statistically significant (OR = 7.10, 95% CI = 3.96–12.70,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** An association of *rs 412777* polymorphism in the *COL1A2* gene with dental fluorosis was found. Therefore, genetic variants represent a relevant risk factor to develop dental fluorosis, as it was proven in this study conducted in Mexican children.

### 1. Introduction

Fluoride is a chemical element found naturally in the drinking water of some localities. The official Mexican standard (Modification to the Official Mexican Standard, NOM-127-SSA1, 1996) in accordance with the World Health Organization (WHO) established a limit of fluoride in drinking water of 1.5 mg/L to avoid health damages such as dental and skeletal fluorosis, neurological damages, reproductive and renal problems (World Health Organization, WHO, 2011; Modification to the Official Mexican Standard, NOM-127-SSA1, 1996; Agency for Toxic Substances & Disease Registry U.S., ATSDR, 2003; National Research Council, NRC, 2006; Connet, 2004). Although there are no geological data that provide adequate information to estimate fluoride

concentrations in drinking water worldwide (Fewtrell, Stuart, Dave, & Jamie, 2006), in Mexico, some regions with endemic hydrofluorosis problems have been identified, including some localities in the State of San Luis Potosí (Aguilar-Díaz, Morales-Coron, Cintra-Viveiro, & De la Fuente-Hernández, 2017; Soto-Rojas, Ureña-Cirett, & Martínez-Mier, 2004).

Because information about the concentration of fluoride in drinking water is scarce, the number of people exposed to fluoride and the sensitive and validated dose-response, it is difficult to estimate the global burden of disease due to fluoride in drinking water, becoming even more complicated by other confounding factors, such as: differences in nutritional status, dosage and other sources of fluoride (Fewtrell et al., 2006). Furthermore, not all individuals exposed to

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [draljarquin@hotmail.com](mailto:draljarquin@hotmail.com) (L. Jarquín-Yñezá), [giorgio\\_alegretto@hotmail.com](mailto:giorgio_alegretto@hotmail.com) (J.A. Alegría-Torres), [claudiacastillo@gmail.com](mailto:claudiacastillo@gmail.com) (C.G. Castillo), [jjesus@uaslp.mx](mailto:jjesus@uaslp.mx) (J. de Jesús Mejía-Saavedra).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.010>

Received 8 May 2018; Received in revised form 17 August 2018; Accepted 21 August 2018

0003-9969/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

fluoride develop any disease or related symptom, due to the individual's genetic variability which can modify the response to fluoride exposure, as has been reported in some studies where the severity of dental fluorosis is influenced by the genetics (Daiwile et al., 2015; Everett et al., 2009; Huang et al., 2008).

Several authors have suggested that there is an association between dental fluorosis and genetic variants, affecting genesis and mineralization of enamel as Distal-less homologs (*DLX1* and *DLX2*), Tissue inhibitors of Metalloproteinases (*TIMP1*), Ameloblastin (*AMBN*), Tuftelin interacting protein 11 (*TFIP11*) and Tuftelin (*TUFT1*) genetic polymorphisms (Castiblanco, Martignon, Castellanos, & Mejía, 2017; Kuchler et al., 2017, 2018) or coding for proteins associated with the metabolism of bone structure (Huang et al., 2008; Lau et al., 2004; Willing et al., 2003). One of these genes involved is Collagen type I alpha 2 chain (*COL1A2*), which encodes for collagen type 1 protein. In fact, some polymorphisms in the *COL1A2* gene have been associated with osteogenesis imperfecta, osteoporosis and recently, with the risk of developing dental fluorosis (Dagleish, 1997; Huang et al., 2008).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the allelic and genotypic frequencies of *rs* 412777 polymorphism in the *COL1A2* gene and its association with the severity of dental fluorosis in children between 6 and 12 years old in the State of San Luis Potosí, Mexico.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

A cross sectional study was conducted in Ojo Caliente, Santa María del Río and La Reforma, Salinas de Hidalgo in the State of San Luis Potosí, with an average concentration of fluoride in drinking water of 2.12 mg F/L and 4.54 mg F/L, respectively (State Commission for the Protection against Health Risks (COEPRIS, 2014; Jarquín-Yñez et al., 2015). A total of 230 children aged between 6 and 12 years old, were included in this study, 111 from the community of Ojo Caliente (60 boys and 51 girls) and 119 from the community of La Reforma (64 boys and 55 girls).

The study was anonymous and voluntary and fulfilled the requirements of the bioethics committee of the Faculty of Medicine of the Autonomous University of San Luis Potosí (registration number: 2015-009) an informed consent was obtained from all the tutors of the participants. The inclusion criteria were: i) informed consent from the participants; ii) residence from birth in the selected communities; iii) ages from 6 to 12 years old and, iii) permanent dentition. The exclusion criteria were: i) presence of kidney diseases; ii) well-identified malabsorption problems and, iii) lack of biological samples.

Sources of fluoride exposure were explored by questionnaires, which were answered by the parents or tutors of the participants.

### 2.2. Biological monitoring

A 24-hour urine sample was collected from each participant using new polypropylene plastic containers. The fluoride quantification in the urine sample was carried out using the potentiometric method with a selective ion electrode, according to the National Institute for Occupational Safety and Health (National Institute for Occupational Safety & Health NIOSH, 1984). The range of calibration curve was from 0.1 to 10.0 mg F/L, all samples were quantified using a buffer (TISAB) in a 1:1 ratio. The reference standard SRM 2671a "Fluoride in Freeze-Dried Urine" (NIST) with a recovery of 97% ± 6 was used for quality control. The correction of urine dilution factor was carried out by density (Barber & Wallis, 1986).

### 2.3. Dental evaluation

The diagnosis of dental fluorosis was performed by trained personnel in the area according to WHO requirements, with appropriate

hygiene and safety measures and using previously sterilized material (World Health Organization, WHO, 1987), with an inter and intra-examiner calibration (> 0.89 Kappa). The degree of severity of dental fluorosis in ten levels was established using the Thylstrup-Fejerskov index (TF) with a scale from 0 to 9; TF0 indicated absence of fluorosis, TF1-TF4 spots on the surface of the enamel, which increased in accordance to the level, TF5 a slightly undercut enamel which was worsened in the TF6 grade, and TF7, TF8 and TF9 indicated 25%, 50% and 100% enamel destruction, respectively (Thylstrup & Fejerskov, 1978).

### 2.4. Identification of polymorphism

Peripheral blood samples were obtained by venous puncture. For DNA extraction 2 ml of blood samples of each participant was washed with a 1 ml of lysis buffer which contained sucrose 0.3 M, TRIS-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM and 1% triton. Blood samples were washed continuously with 150 µl of TRIS-HCl 10 mM pH 8, 150 µl of detergent 20 mg/ml and 100 µl of NaCl 5 mM, the supernatant was placed in a microtube with 1 ml of 96% ethanol and stored for 1 h to precipitate DNA. Subsequently, four washes were made with 500 µl of 70% ethanol and the DNA was re-suspended in 200 µl of nuclease-free water. DNA quantification was performed by spectrophotometry using a NanoDrop™ 2000/2000c ThermoScientific Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, USA), 260/280 nm ratio was calculated, and DNA integrity was measured by agarose gel electrophoresis and ultraviolet light.

The identification of the *rs* 412777 polymorphism in the *COL1A2* gene was carried out by allelic discrimination using allele-specific probes with the following nucleotide sequence: 5'-ACGGCAGGCTGGCCCAATTGGCCCC[A/C]GCTGGAGCAAGAGGAGAGCCTGGCA-3', with the fluorochromes/quencher VIC/MGB-NFQ and FAM/MGB-NFQ for the wild and mutant variants, respectively.

The reaction mixture for each sample was: 7.5 µl 2x Taqman GT Master Mix, 3 µl DNA (7 ng/µl), 1 µl 20x Taqman SNP assays MTO human SM SNP ID: *rs* 412777. The final volume was 15 µl. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in real time thermal cycler 7500 Real Time PCR System Applied Biosystems. The amplification conditions were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 1 min at 60 °C and 2 min at 50 °C. Each sample was run in duplicate in order to ensure that the genotype was correct.

### 2.5. Statistical analysis

Average age, urinary fluoride, degree of dental fluorosis, sex, distribution frequencies, drinking water uses, presence of polymorphism and group of dental fluorosis were calculated. The study group was classified in subgroups according to the severity of dental fluorosis: TF2,3,4,5 and TF6,7,8,9 and by genotype: Non-polymorphic (wild-homozygotes) and polymorphic (heterozygotes, mutant-homozygotes).

Student's *t*-test and Chi-square were used to compare the characteristics of the study population by area of residence. The association between dental fluorosis and age was obtained using a Chi-square test, and analysis of association of allelic and genotype with age, urinary fluoride and degree of dental fluorosis, was carried out using the ANOVA. Finally, OR were calculated to estimate the risk of presenting greater severity of dental fluorosis. A confidence interval (CI) of 95% and a value of *p* < 0.05 were considered to estimate the statistical significance of the results. The information was processed in the statistical package RStudio-0.99.902.023 (R Core Team, 2013).

## 3. Results

The distribution of boys and girls, and age, were similar between both communities. Only 20% of the participants reported using bottled water for drinking and cooking (3.5% in Ojo Caliente and 16.5% in La Reforma). In contrast, 55.2% reported using tap water for drinking and

**Table 1**  
Characteristics of the study population by area of residence.

Variables	Communities		
	Ojo Caliente	La Reforma	
Sex n (%).	male	60 (54.1)	64 (53.8)
	female	51 (45.9)	55 (46.2)
Age (years) mean ± S.D.	9.18 ± 2.02	9.23 ± 1.96	
Drink and cook with tap water n (%)	*87 (37.8)	*40 (17.4)	
Cook with tap water and drink bottled water n (%)	*16 (7.0)	*41 (17.8)	
Drink and cook with bottled water n (%)	*8 (3.5)	*38 (16.5)	
Fluoride in drinking water (mgF/L) mean ± SD (min-max)	Tap water	*2.36 ± 0.02 (2.00 – 2.50)	*4.56 ± 0.07 (4.00 – 6.00)
	Bottled water	*0.14 ± 0.04 (0.10 – 0.50)	*0.47 ± 0.05 (0.40 – 0.50)
Urinary fluoride (mgF/L) mean ± S.D. (min – max)	*2.05 ± 0.62 (1.20 – 4.00)	*2.99 ± 0.99 (1.20 – 5.50)	
<sup>a</sup> DF (TF) mean ± SD (min – max)	*5.32 ± 1.66 (2 – 8)	*5.88 ± 1.60 (2 – 9)	

SD = standard deviation; min-max = minimum and maximum; DF = dental fluorosis; TF = dental fluorosis index of Thylstrup–Fejerskov.

\* $\chi^2$  (for the proportions):  $p < 0.05$ .

\*Student's  $t$ -test independent sample (for the averages):  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> mean of all present teeth.

cooking (37.8% in Ojo Caliente and 17.4% in La Reforma), while 24.8% reported using bottled water for drinking and tap water for cooking (7% in Ojo Caliente and 17.8% in La Reforma) (Table 1).

Regarding the fluoride concentration, a mean in tap water of  $2.36 \pm 0.02$  mg/L in Ojo Caliente and  $4.56 \pm 0.07$  mg/L in La Reforma, was quantified. The mean concentration of the fluoride in bottled water was  $0.14 \pm 0.04$  mg/L and  $0.47 \pm 0.05$  mg/L respectively. As for the urinary fluoride, a mean of  $2.05 \pm 0.62$  mg/L and  $2.99 \pm 0.99$  mg/L was determined in Ojo Caliente and La Reforma respectively (Table 1).

Dental fluorosis was diagnosed in 100% of children. The mean of the TF index was lower in Ojo Caliente (TF  $5.32 \pm 1.66$ ) than in La Reforma (TF  $5.88 \pm 1.60$ ) (Table 1). The degrees of dental fluorosis presented by the children that participated in the study, were from TF2 to TF9. The prevalence of dental fluorosis according to age was presented as follows: in the group of children from 6 to 7 years old, 83% presented TF2,3,4,5 and 17% TF6,7,8, 9; the prevalence in children from 8 to 9 years old was 40% and 60%; in those from 10 to 11 years old was of 45% and 55% and in those of 12 years old, of 30% and 70% respectively.

Allelic and genotypic frequencies are shown in Table 2, presenting a prevalence of 67% for wild allele (A) and 33% mutant allele (C). Genotypes had a distribution of 46.5% wild-homozygotes, 41.7%

**Table 2**  
Genotypic and allelic frequencies of COL1A2 gene polymorphism in the study population.

rs 412777 COL1A2 polymorphism	Frequency (%)
Alleles	
A	310 (67)
C	150 (33)
Genotypes	
A/A	107 (46.5)
A/C	96 (41.7)
C/C	27 (11.7)

A = wild allele; C = mutant allele; A/A = wild-homozygote; A/C = heterozygotes; C/C = mutant-homozygote.

**Table 3**  
Analysis by genotype of the characteristics of the participants.

Mean ± SD	A/A (n = 107)	A/C (n = 96)	C/C (n = 27)	$p$ -value <sup>a</sup>
Age (years)	9.20 ± 2.29	9.50 ± 1.95	8.9 ± 2.14	0.26
Urinary fluoride (mgF/L)	2.51 ± 0.96	2.7 ± 0.97	2.3 ± 0.83	0.18
Dental Fluorosis (Thylstrup-Fejerskov)	*4.8 ± 1.54	6.4 ± 1.34	5.9 ± 1.73	< 0.001

A = wild allele; C = mutant allele; A/A = wild-homozygotes; A/C = heterozygotes; C/C = mutant-homozygotes.

\* ANOVA;  $p < 0.05$ .

**Table 4**  
Association of COL1A2 gene polymorphism with the dental fluorosis.

COL1A2 (rs 412777)	TF 6,7,8,9 n (%)	TF 2,3,4,5 n (%)	n	OR (95% CI)	$p$ -value	
By allele	A	100 (53.2)	103 (74.6)	203	1	–
	C	88 (46.8)	35 (25.4)	123	2.59 (1.60–4.20)	< 0.001
By genotype	Co-dominant					
	A/A	28 (24.1)	79 (69.3)	107	1	–
	A/C	72 (62.1)	24 (21.1)	96	8.46 (4.50–15.90)	< 0.001
	C/C	16 (13.8)	11 (9.6)	27	4.10 (1.70–9.80)	0.001
	Recessive					
	A/A	100 (86.2)	103 (90.4)	203	1	–
Dominant						
A/A	28 (24.1)	79 (69.3)	107	1	–	
A/C	88 (75.9)	35 (30.7)	123	7.10 (3.96–12.70)	< 0.001	
C/C	16 (13.8)	11 (9.6)	27	1.5 (0.60–3.30)	0.30	

TF = dental fluorosis index of Thylstrup–Fejerskov; OR = Odds Ratio (95% CI).

heterozygotes and 11.7% mutant-homozygotes showing Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2 = 0.33$ ,  $p = 0.89$ ).

When age, urinary fluoride and dental fluorosis were compared by genotypes, only a significant difference for TF index was found (Table 3). According to Table 4, the Odds Ratio analysis showed that the C allele had a greater risk of presenting a highest degree of dental fluorosis, indicating an OR = 2.59, (95% CI:1.60–4.20,  $p < 0.05$ ). Likewise, the dominant model (A/C-C/C vs A/A genotypes) showed an association between C allele carriers that were either homo or heterozygous with the severity of dental fluorosis showing an OR = 7.10 (95% CI = 3.96–12.70,  $p < 0.05$ )

#### 4. Discussion

In this study 80% of the evaluated population uses tap water for consumption (55.2% for drinking and cooking and 24.8% only for cooking), being higher in Ojo Caliente than in La Reforma (44.8% v/s 35.2%). This represents a public health problem, due to the high fluoride concentration in the tap water of the evaluated communities ( $2.36 \pm 0.02$  mgF/L in Ojo Caliente and  $4.56 \pm 0.07$  mgF/L in La Reforma), since 100% of the samples were above the limit allowed by the NOM-127 and the WHO (World Health Organization, WHO, 2011; Modification to the Official Mexican Standard, NOM-127-SSA1, 1996). Urinary fluoride confirmed the highest tap water consumption in these communities with  $2.05 \pm 0.62$  mgF/L in Ojo Caliente and  $2.99 \pm 0.99$  mgF/L in La Reforma; since the bottled water consumption was within the limit allowed by the NOM-201 of 0.7 mgF/L (Official Mexican Standard & NOM-201-SSA1, 2002) with

$0.14 \pm 0.04$  mgF/L in Ojo Caliente and  $0.47 \pm 0.05$  mgF/L in La Reforma.

The high fluoride concentration in drinking water of the communities that were evaluated, represents a potential risk for developing kidney diseases. In India the highest prevalence of kidney stones was reported in the population exposed to fluoride concentrations in drinking water between 3.5 and 4.9 mg F/L (Singh et al., 2001). In fact, residents of La Reforma have a high risk of developing this disease, since the fluoride concentration in drinking water was similar ( $4.56$  mg F/L  $\pm 0.07$ ).

The prevalence of dental fluorosis in children was 100% exhibiting degrees of severity from TF2 to TF9, with a high prevalence of the most severe grades in older children, probably because of the longer time of exposure. The prevalence of severe dental fluorosis shown in our study (70% in the population of 12 years old) was higher than the national reported level of 27% in San Luis Potosi with a prevalence of 4.28% of severe dental fluorosis in 12 years old and 2.09% in 15 years old subjects (Betancourt-Lineares, Irigoyen-Camacho, Mejía-González, Zepeda-Zepeda, & Sánchez-Pérez, 2013).

The most severe degrees of dental fluorosis (TF 6, 7, 8, 9) cause the functionality of the tooth to be seriously affected due to the loss of important portions of its structure, producing fractures and deteriorating its physical appearance (Fejerskov, Thylstrup, & Larsen, 1977; Moller, 1982), which will result in masticatory, nutritional and self-esteem problems. Likewise, the severity of dental fluorosis has been related to a decrease in the intellectual coefficient (IQ) (Das & Mondal, 2016), even at lower exposure levels than those found in this study (2.2 mg F/L, 2.3 mg F/L and 1.5 mg F/L) (Mondal, Dutta, & Gupt, 2016; Sebastian & Sunitha, 2015; Trivedi, Sangai, Patel, Payak, & Vyas, 2012).

Previous studies of dental fluorosis in Mexico reported discrepancies regarding its association with fluoride concentration in water, fluorinated salt intake and altitude (Aguilar-Díaz et al., 2017; Soto-Rojas et al., 2004). In our study, altitude and other sources of exposure were not considered. However, an association was found between the prevalence of dental fluorosis with the concentration of fluoride in drinking water and urine. Children with the lowest degrees of dental fluorosis were the ones that presented the lowest levels of urinary fluoride and residing in the community with the lowest levels of fluoride in drinking water (Ojo Caliente with dental fluorosis of  $5.32 \pm 1.66$ , urinary fluoride of  $2.05 \pm 0.62$  mgF/L and fluoride in drinking water of  $2.36 \pm 0.02$  mg/L v/s La Reforma with  $5.88 \pm 1.60$ ,  $2.99 \pm 0.99$  mgF/L and  $4.56 \pm 0.07$  mgF/L respectively) (Table 1).

In the present, it has been suggested that there are factors that exacerbate the effects of fluoride, such as malnutrition, low calcium intake and/or genetic susceptibility (Correia Sampaio, Ramm von der Fehr, Arneberg, Petrucci Gigante, & Hatloy, 1999; Daiwile et al., 2015; De la Fuente-Hernández, Aguilar-Díaz, & Cintra-Viveiro, 2016; Everett et al., 2009; Huang et al., 2008; Khandare, Gourineni, & Validandi, 2017; Massler & Schour, 1952). Regarding genetic predisposition, on several studies conducted on animal models as well as in human populations, have been identified genetic polymorphisms that increase the risk of presenting harmful effects on enamel due to exposure to this element (Den Besten, 1986; Everett, 2011). In our study, the genetic susceptibility was considered a risk factor, through the identification of polymorphism rs 412777 in the COL1A2 gene, which had already been previously identified in La Reforma by our research group (Escobar-García, Mejía-Saavedra, Jarquín-Yáñez, Molina-Frechero, & Pozos-Guillén, 2016), whose prevalence (47.5%) was replicated in the present study (47%). In fact, of 123 children that showed the genotype A/C and C/C in the present study, 56 of them residing in La Reforma, which represent the 47% of the population evaluated in this community (119 children).

When analyzing the carriers of the risk allele (C) and the degree of severity of dental fluorosis, an OR of 2.59 (95% CI = 1.60–4.20,  $p < 0.05$ ) was presented. Being the co-dominant and dominant

genotype model associated with the degree of severity of dental fluorosis. As previously stated, this means that in our study children who presented A/C and C/C genotype increased the risk of having the highest severity levels of dental fluorosis (TF 6, 7, 8, 9). Likewise, it was found that the mean of dental fluorosis index was higher in A/C and C/C carriers than A/A carriers (6.4 and 5.9 respectively vs 4.8). This result was different to those previously reported by our research group in La Reforma and by Muñoz-Hernández et al. in Mexican children, where there was no significant association between COL1A2 gene polymorphism and dental fluorosis (Escobar-García et al., 2016; Muñoz-Hernández, Burciaga-Nava, Cuevas-González, & Zambrano-Galván, 2017).

In the case of the previous study that our research group conducted in La Reforma, the statistical analysis was different since we included urinary fluoride within the Odds Ratio analysis, when comparing the groups with higher and lower urinary fluoride (cut off point 3.00 mg F/L) with those with higher and lower severity of dental fluorosis by genotype (Escobar-García et al., 2016). In the present study, urinary fluoride was ignored in the Odds Ratio analysis since prior to this, it was observed that there weren't significant differences between the group of polymorphic and non-polymorphic children. Likewise, the present study is more robust than the previous study in La Reforma ( $n = 230$  v/s  $n = 80$ ) (Escobar-García et al., 2016). In the case of the study of Muñoz-Hernández et al., they did not evaluate the level of exposure to fluoride, so it is unknown if the populations were exposed to high concentrations of fluoride as in the present study, furthermore, they did not classify the severity of the dental fluorosis by correlating it with polymorphisms (Muñoz-Hernández et al., 2017).

In previous studies conducted in Indian and Chinese children, it has been also observed the influence of COL1A2 gene polymorphism on the prevalence of dental fluorosis in children exposed to fluoride through drinking water. The Indian study was performed in a population of 150 children aged 6–12 years old with dental and skeletal fluorosis and a fluoride concentration in drinking water  $> 1.5$  mg/L, finding a significant difference in the distribution of the risk allele among children with and without dental fluorosis (Meena, Toteja, Bala, & Mohanty, 2016). In the study conducted in China, carriers of the mutant-homozygotes increased the risk of presenting dental fluorosis at exposures higher than 2 mg F / L in drinking water (OR = 4.85, 95% CI = 1.22–19.32) (Huang et al., 2008). In contrast to our study, where 100% of children had dental fluorosis and the risk of presenting the highest severity levels was statistically associated with mutant-homozygotes and heterozygotes.

Additionally, type 1 collagen represents 90% of the bone protein matrix, essential for mineralization and elasticity (Prockop & Kivirikko, 1995). Thus, the presence of a polymorphism in the COL1A2 gene has been associated with bone diseases such as osteogenesis imperfecta, osteoporosis, Ehlers-Danlos and atypical Marfan syndrome characterized by low bone mineral density, moderate to severe bone fragility and an increased tendency to bruises and bleeding (Dalglish, 1997; Mann & Ralston, 2003; Nguyen et al., 2005). Therefore, it is necessary to monitor the bone health of the study population.

In the present study, it was observed that the presence of risk allele (C) in the COL1A2 gene and exposure to fluoride influences the development of dental fluorosis, with the level of exposure to fluoride being a determining factor. The genetic vulnerability predisposes that carriers of this risk allele, exposed to the same fluoride concentrations, present a higher severity of dental fluorosis than the rest of the population. It is convenient to evaluate other health effects associated with fluoride, whose clinical manifestations could be exacerbated by the presence of the polymorphism registered in the population of study. Likewise, it is important to evaluate the prevalence of this polymorphism in populations with endemic hydrofluorosis, but above all to avoid exposure to this pollutant.



## 5. Conclusions

Our results showed a significant association between the severity of dental fluorosis and the rs 412777 polymorphism evaluated in the COL1A2 gene in populations exposed to fluoride.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgement

The present study was supported by the Sectorial Fund SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT-234310.

## References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S., ATSDR (2003). *Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine (F)*. Atlanta GA: Department of Health & Human Services, Public Health Service.
- Aguilar-Díaz, F. M., Morales-Coron, F., Cintra-Viveiro, A. C., & De la Fuente-Hernández, J. (2017). Prevalence of dental fluorosis in Mexico 2005–2015: a literature review. *Salud Pública Mex*, 59, 306–313.
- Barber, T. E., & Wallis, G. (1986). Correction of urinary mercury concentration by specific gravity, osmolality, and creatinine. *Journal of Occupational Medicine*, 28(5), 354–359.
- Betancourt-Lineares, A., Irigoyen-Camacho, M. E., Mejía-González, A., Zepeda-Zepeda, M., & Sánchez-Pérez (2013). Prevalence of dental fluorosis in Mexican localities located in 27 states and the D.F. six years after the publication of the Official Mexican Standard for the fluoridation of salt. *Revista de Investigación Clínica*, 65(3), 237–247.
- Castiblanco, G. A., Martignon, S., Castellanos, J. E., & Mejía, W. A. (2017). Pathogenesis of dental fluorosis: biochemical and cellular mechanisms. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*, 28(2), 408–421. <https://doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n2a10/> (Accessed May 2017).
- Connet, P. (2004). 50 reasons to oppose fluoridation. *Journal Medical Veritas*, 1, 70–80.
- Correia Sampaio, F., Ramm von der Fehr, F., Arneberg, P., Petrucci Gigante, D., & Hatloy, A. (1999). Dental fluorosis and nutritional status of 6- to 11-year-old children living in rural areas of Paraíba, Brazil. *Caries Research*, 33(1), 66–73.
- Daiwile, A. P., Sivanesan, S., Izzotti, A., Bafana, A., Naoghare, P. K., Arrigo, A., et al. (2015). Non-coding RNAs: Possible players in the development of fluorosis. *BioMed Research International*, 2015, 274852.
- Dalgleish, R. (1997). The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Research*, 25, 181–187.
- Das, k., & Mondal, N. K. (2016). Dental fluorosis and urinary fluoride concentration as a reflection of fluoride exposure and its impact on IQ level and BMI of children of Laxmisagar, Simlupal Block of Bankura District, W.B., India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(4), 218. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5219-1/> (Accessed May 2017).
- De la Fuente-Hernández, J., Aguilar-Díaz, F. C., & Cintra-Viveiro, C. A. (2016). Dental fluorosis and associated factors in students of Guanajuato, Mexico. *Entreciencias: diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 4(11), 273–289.
- Den Besten, P. K. (1986). Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in therat. *Journal of Dental Research*, 65, 1272–1277.
- Escobar-García, D., Mejía-Saavedra, J., Jarquín-Yáñez, L., Molina-Frecherro, N., & Pozos-Guillén, A. (2016). Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 44(2), 162–168.
- Everett, E. T. (2011). Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *Journal of Dental Research*, 90(5), 552–560.
- Everett, E. T., Yan, D., Weaver, M., Liu, L., Foroud, T., & Martinez-Mier, E. A. (2009). Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait loci on mouse chromosomes 2 and 11. *Cells, Tissues, Organs*, 189, 212–218.
- Fejerskov, O., Thylstrup, A., & Larsen, M. J. (1977). Clinical and structural features and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 85, 510–534.
- Fewtrell, L., Stuart, S., Dave, K., & Jamie, B. (2006). An attempt to estimate the global burden of disease due to fluoride in drinking water. *Journal of Water and Health*, 4(4), <https://doi.org/10.2166/wh.2006.04/> (Accessed May 2017).
- Huang, H., Ba, Y., Cui, L., Cheng, X., Zhu, J., Zhang, Y., et al. (2008). COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calcitropic hormone levels, a dental fluorosis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 36(6), 517–522.
- Jarquín-Yáñez, L., Mejía-Saavedra, J. J., Molina-Frecherro, N., Gaona, E., Rocha-Amador, D. O., López-Guzmán, O. D., et al. (2015). Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosí. *The Scientific World Journal*, 2015, 647184. <https://doi.org/10.1155/2015/647184/> (Accessed May 2017).
- Khandare, A. L., Gourineni, S. R., & Validandi, V. (2017). Dental fluorosis, nutritional status, kidney damage, and thyroid function along with bone metabolic indicators in school-going children living in fluoride-affected hilly areas of Doda district, Jammu and Kashmir, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(11), 1.
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Oliveira, D. S. B., Charone, S., Nelson-Filho, P., Silva, R. A. B., et al. (2017). Polymorphisms in genes involved in enamel development are associated with dental fluorosis. *Archives of Oral Biology*, 76, 66–69.
- Küchler, E. C., Dea Bruzamolín, C., Ayumi Omori, M., Costa, M. C., Antunes, L. S., Pecharki, G. D., et al. (2018). Polymorphisms in nonamelogenin enamel matrix genes are associated with dental fluorosis. *Caries Research*, 52(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000479826/> (Accessed June 2018).
- Lau, E. M., Choy, D. T., Li, M., Woo, J., Chung, T., & Sham, A. (2004). The relationship between COL1A1 polymorphisms (Sp 1) and COL1A2 polymorphisms (Eco RI and Pvu II) with bone mineral density in Chinese men and women. *Calcified Tissue International*, 75, 133–137.
- Mann, V., & Ralston, S. H. (2003). Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone*, 32(711), 717.
- Massler, M., & Schour, I. (1952). Relation of endemic dental fluorosis to malnutrition. *Journal of the American Dental Association*, 44(2), 156–165.
- Meena, H., Toteja, G. S., Bala, K., & Mohanty, S. S. (2016). Association of COL1A2 gene polymorphism with dental fluorosis in children of Jaipur district of Rajasthan, India. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*, 3(4), 249–255.
- Modification to the Official Mexican Standard, NOM-127-SSA1 (1996). Environmental health, water for human use and consumption. Permissible limits of quality and treatments to which the water must undergo for its potabilization. *Health Secretary Official Journal of the Federation*, CVIII(13), 6.
- Moller, I. J. (1982). Fluorides and dental fluorosis. *International Dental Journal*, 32, 135–147.
- Mondal, D., Dutta, G., & Gupt, S. (2016). Inferring the fluoride hydrogeochemistry and effect of consuming fluoride-contaminated drinking water on human health in some endemic areas of Birbhum district, West Bengal. *Environmental Geochemistry and Health*, 38(2), 557–576.
- Muñoz-Hernández, M. J., Burciaga-Nava, J. A., Cuevas-González, J. C., & Zambrano-Galván, G. (2017). Correlation of polymorphisms of the COL1A2 gene with dental fluorosis in Mexican children. *Acta Universitaria*, 27(1), 83–87.
- National Institute for Occupational Safety and Health NIOSH (1984). *Fluoride in urine* (3rd ed.). *Manual of analytical methods* Vol. 11US: Department of Health and Human Services p. 8308–1–8308–3.
- National Research Council, NRC (2006). *Fluoride in drinking water: A scientific review of EPA's standards, committee on fluoride in drinking water*. USA: National Academies Press.
- Nguyen, T. V., Esteban, L. M., White, C. P., Grant, S. F., Center, J. R., Gardiner, E. M., et al. (2005). Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(12), 6575–6579.
- Official Mexican Standard, & NOM-201-SSA1 (2002). Products and services. Water and ice for human consumption, packaged and in bulk. Sanitary specifications. *Health Secretary Official Journal of the Federation*.
- Prockop, D. J., & Kivirikko, K. I. (1995). Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 403–434.
- R Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- Sebastian, S. T., & Sunitha, S. (2015). A cross-sectional study to assess the intelligence quotient (IQ) of school going children aged 10–12 years in villages of Mysore district, India with different fluoride levels. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 33(4), 307–311.
- Singh, P. P., Barjatiya, M. K., Dhing, S., Bhatnagar, R., Kothari, S., & Vineet Dhar (2001). Evidence suggesting that high intake of fluoride provokes nephrolithiasis in tribal populations. *Urological Research*, 29(4), 238.
- Soto-Rojas, A. E., Ureña-Cirett, J. L., & Martínez-Mier, E. A. (2004). A review of the prevalence of dental fluorosis in Mexico. *Pan American Journal of Public Health*, 15(1).
- State Commission for the Protection against Health Risks (COEPRIS), San Luis Potosí, S.L. P., México, <http://www.coeprislpgob.mx/> (Accessed May 2017).
- Thylstrup, A., & Fejerskov, O. (1978). Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 6(6), 315–328.
- Trivedi, M. H., Sangai, N. P., Patel, R. S., Payak, M., & Vyas, S. J. (2012). Assessment of ground water quality with special reference to fluoride and its impact on IQ of school children in six villages of the Mundra Region, Kachchh, Gujarat, India. *Fluoride*, 45(4), 377–383.
- Willing, M. C., Torner, J. C., Burns, T. L., Janz, K. F., Marshall, T., Gilmore, J., et al. (2003). Gene polymorphisms, bone mineral density and bone mineral content in young children: The Iowa Bone Development Study. *Osteoporosis International*, 14(8), 650–658.
- World Health Organization, WHO (1987). *Oral health survey-basic methods* (3rd ed.). Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, WHO (2011). *Guidelines for drinking-water quality* (4th ed.). Geneva, Switzerland: World Health Organization.

**CUARTO ARTÍCULO.- Bone mineral density and nutritional status in child population of San Luis Potosi, Mexico.**

**BONE MINERAL DENSITY AND NUTRITIONAL STATUS IN CHILD POPULATION OF SAN LUIS POTOSI, MEXICO.**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	EJAP-D-19-00032	
<b>Full Title:</b>	BONE MINERAL DENSITY AND NUTRITIONAL STATUS IN CHILD POPULATION OF SAN LUIS POTOSI, MEXICO.	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Keywords:</b>	CLRH-D-18-00904 Osteoporosis Bone mineral density in mexican child	
<b>Corresponding Author:</b>	Carlos Abud Mendoza Facultad de Medicina, Universidad Autonoma de San Luis Potosi - Facultad de Medicina San Luis Potosi, San Luis Potosi MEXICO	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Facultad de Medicina, Universidad Autonoma de San Luis Potosi - Facultad de Medicina	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Lizeth Jarquín-Yáñez	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Lizeth Jarquín-Yáñez José Jesús Mejía-Saavedra Jacqueline Calderón-Hernández Jorge A Alegría Torres Jorge Morales -Torres Carlos Abud Mendoza	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	The Sectorial Fund SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT 234310 (234310)	Dr José Jesús Mejía-Saavedra
<b>Abstract:</b>	<p><b>Aim:</b> This study aimed to evaluate association between bone mineral density and nutritional status in apparently healthy children from two rural communities in the State of San Luis Potosi, México. <b>Participants and methods:</b> A cross-sectional study was carried out that included 241 children residing in rural communities of La Reforma, Salinas de Hidalgo and Ojo Caliente, Santa Maria del Río. Bone mineral density was evaluated in the lumbar region and left hip using a central DXA equipment, the results were interpreted as Z-score adjusted for age, sex, weight, height and ethnicity. <b>Nutritional status</b> was obtained from the WHO classification based on height and body mass index for age. <b>Results:</b> Children's mean bone mineral density were <math>0.56 \pm 0.11</math> g/cm<sup>2</sup> in the lumbar region and <math>0.71 \pm 0.10</math> g/cm<sup>2</sup> in hip. A total of 218 children had normal bone mineral density and 23 low regardless of the evaluated anatomical region. Case with low bone mineral density were more frequent in girls than in boys (17 v/s 6), with the highest prevalence in the oldest age groups. <b>Nutritional status</b> was normal in 67% of children, 27% presented low body weight, 2% moderate malnutrition and 4% severe. Differences were observed between the means of bone mineral density Z-score of each nutritional group (healthy= <math>-0.67 \pm 0.87</math>, low weight= <math>-0.94 \pm 0.72</math>, moderate= <math>-1.14 \pm 0.70</math>, severe= <math>-2.30 \pm 0.61</math>) (<math>p &lt; 0.05</math>). <b>Conclusions:</b> Low bone</p>	

	mineral density in this population was found only in those children with severe malnutrition.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Fidencio Cons, MD fidenciocons@gmail.com
	Juan Canoso jcanoso@gmail.com
<b>Opposed Reviewers:</b>	



[Click here to view linked References](#)

Elimina la filigrana digital ahora

## Bone mineral density and nutritional status in child population of San Luis Potosí, México.

Lizet Jarquín-Yañez<sup>1</sup>, José de Jesús Mejía-Saavedra<sup>1</sup>, Jaqueline Calderón Hernández<sup>1</sup>, Jorge Alejandro Alegría-Torres<sup>2</sup>, Jorge Morales-Torres<sup>3</sup>, Carlos Abud-Mendoza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210 San Luis Potosí, SLP, México; <sup>2</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, 36050 Guanajuato, Gto., México; <sup>3</sup> Hospital De la Parra, León, Gto <sup>4</sup>Unidad de Investigaciones Reumatológicas A.C., Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, 78290 San Luis Potosí, SLP, México.

### Abstract

**Aim:** This study aimed to evaluate association between bone mineral density and nutritional status in apparently healthy children from two rural communities in the State of San Luis Potosí, México. **Participants and methods:** A cross-sectional study was carried out that included 241 children residing in rural communities of La Reforma, Salinas de Hidalgo and Ojo Caliente, Santa Maria del Río. Bone mineral density was evaluated in the lumbar region and left hip using a central DXA equipment, the results were interpreted as Z-score adjusted for age, sex, weight, height and ethnicity. Nutritional status was obtained from the WHO classification based on height and body mass index for age. **Results:** Children's mean bone mineral density were  $0.56 \pm 0.11$  g/cm<sup>2</sup> in the lumbar region and  $0.71 \pm 0.10$  g/cm<sup>2</sup> in hip. A total of 218 children had normal bone mineral density and 23 low regardless of the evaluated anatomical region. Case with low bone mineral density were more frequent in girls than in boys (17 v/s 6), with the highest prevalence in the oldest age groups. Nutritional status was normal in 67% of children, 27% presented low body weight, 2% moderate malnutrition and 4% severe. Differences were observed between the means of bone mineral density Z-score of each nutritional group (healthy=  $-0.67 \pm 0.87$ , low weight=  $-0.94 \pm 0.72$ , moderate=  $-1.14 \pm 0.70$ , severe=  $-2.30 \pm 0.61$ ) ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** Low bone mineral density in this population was found only in those children with severe malnutrition.

**Keywords:** Low Bone Mineral Density, Children Population, Health Risk, malnutrition, México.

**Data of the corresponding author:** Name: Carlos Abud-Mendoza. Av. V. Carranza 2395, zona Universitaria, San Luis Potosí. S.L.P., México. Zc: 78290. Phone:524448342781. Email:c\_abud@hotmail.com

## Introduction

Osteoporosis is considered a global public health problem. The prevalence of osteoporosis in Mexico is 16% in women older than 45 years<sup>1,2</sup>. This condition is associated with a deterioration in the quality of life and a high medical care cost, as it is associated with fractures and physical disability<sup>3-5</sup>.

Studies of the bone mineral density (BMD) have become increasingly important, due to the relationship these hold with osteoporosis in the adult population. BMD in children is only evaluated in those with a significant fracture history or associated pathological conditions, such as sickle cell disease, cystic fibrosis and other metabolic disorders<sup>6-9</sup>. However other factors have to be considered in the BMD evaluation in children such as the genetic component, nutritional status, deficient physical activity, as well as the natural process of bone demineralization due to the acquisition of the velocity peak of the growth in height and the accumulation of bone mineral that are presented in non-coordinated way<sup>10-12</sup>.

It is necessary to maintain an adequate BMD during childhood since the bone mass at the end of growth will determine the adult BMD and this could prevent bone diseases. The dual energy x-ray absorptiometry (DXA) is the most widely used technique for measuring bone mineral content (BMC) and BMD in children and this is the method recommended by the World Health Organization (WHO) and the by International Society of Clinical Densitometry (ISCD)<sup>13,14</sup>.

It is known that the BMD decreases if nutritional status is altered, and this could increase the risk of osteoporotic fractures in adult<sup>15-18</sup>. Therefore the objective of this study was to evaluate the BMD and its association with nutritional status in apparently healthy children from two rural communities in the State of San Luis Potosi, México.

## Participants and methods

### Study population

Participants were recruited from two rural communities in the State of San Luis Potosi, Mexico. La Reforma, belonging to the municipality of Salinas de Hidalgo located in the western part of the State in the region known as Altiplano Potosino, and Ojo Caliente belonging to the municipality of Santa Maria del Rio, located in the central and southern part of the State and both of them considered as desert zones.

The final sample included 241 children, 120 from La Reforma and 121 from Ojo Caliente between 5 and 15 years of age, who were randomly selected from schools in the area and living in their community since birth. Inclusion criteria were: apparently healthy and availability of being transported (accompanied by their parents or tutor) to the city of San Luis Potosi to attend the appointment for the bone densitometry. The exclusion criteria were: consumption of drugs or any other product that could interfere with the results of the study. Informed consent was

1  
2  
3  
4 obtained from each participant's parent or tutor, and assent was obtained from the  
5 participants. The study was free of charge, anonymous and voluntary; and fulfilled  
6 the requirements of the bioethics committee of the Faculty of Medicine of the  
7 Autonomous University of San Luis Potosí (registration number: 2015-009).  
8

### 9 Evaluation of the bone mineral density and nutritional status

10  
11 Participants were transported to the Unidad de Investigaciones Reumatológicas  
12 A.C at the Central Hospital "Dr. Ignacio Morones Prieto" in the city of San Luis  
13 Potosi, to perform the bone densitometry study; a qualified and certified technical  
14 professional who was blinded about the children health status did the evaluation.  
15 The bone mineral content (BMC) was evaluated in the lumbar region (L1- L4) and  
16 the left hip. Participants were placed in supine position with an elevation of the  
17 lower extremities, to obtaining the correct separation among the lumbar vertebrae.  
18 In order to study the hip, participant continued in supine position with the legs in  
19 slight abduction maintaining the right femoral shaft and in an internal rotation (15°-  
20 30°)<sup>19</sup>. The study was done using a DXA central equipment "Hologic Model  
21 Discovery Wi" (S/N 85714) with software for infants and pediatrics. The duration of  
22 the study ranged between 8-10 minutes and the dose of skin radiation was below  
23 1mrem. The BMC was adjusted by the vertebral surface area and expressed in  
24 BMD values (g/cm<sup>2</sup> of hydroxyapatite) to be further interpreted in Z-score after  
25 having been adjusted by age, sex, weight, height and ethnicity<sup>14,20,21</sup>, this was done  
26 by the equipment software. Height and weight of each of the participants was  
27 measured in centimeters (cm) and kilograms (kg) respectively and was performed  
28 by qualified technical professionals who were certified in the area using a  
29 "Harpender Holtein" wall stadiometer and a "Tanita" scale.  
30  
31

32  
33 The WHO and the ISCD, the most recognized institutions for bone diagnosis,  
34 recommend different criteria for BMD analysis<sup>14,22</sup>. For the purpose of this study,  
35 we considered the proposed by the ISCD, because it is targeted for population  
36 under 20 years of age. A normal BMD include Z-score above -2.0 standard  
37 deviations (S.D.) and a low BMD include Z-score below -2.0 S.D., and  
38 osteoporosis for a Z-score below -2.0 S.D. and clinical history of fractures; defined  
39 as a vertebral compression fracture in the absence of local disease, two long bone  
40 fractures before age 10 or three long bone fractures before age 19<sup>21, 23, 24</sup>.  
41  
42

43  
44 The chronic status nutritional was obtained according to the WHO classification  
45 taking into account the height and body mass index for the age<sup>25</sup>.  
46  
47

### 48 Statistical Analysis

49  
50 We obtained prevalence of sex and nutritional status, and mean  $\pm$  S.D of age and  
51 BMD. The frequencies of normal and low BMD were stratified by sex and age.  
52 BMD Z-score of each nutritional status were compared with ANOVA-test. An  
53 RStudio-0.99.902.0 package was used for the statistical analysis<sup>26</sup>.  
54  
55  
56  
57

## 58 **Results**

59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The study population was composed by 241 children with mean age of  $9.25 \pm 2.13$ , 112 girls and 129 boys. Children's mean BMD were  $0.56 \pm 0.11$  g/cm<sup>2</sup> in the lumbar region and  $0.71 \pm 0.10$  g/cm<sup>2</sup> in the hip region. Nutritional status was normal in 67% of children, 27% presented low body weight, 2% moderate malnutrition and 4% severe malnutrition (table 1).

As shown in figure 1, BMD increased with age and this was different between anatomical regions evaluated and between girls and boys especially in lumbar region. Additionally in this region, girls' BMD was greater than that of boys from 11 years old.

Normal BMD Z-score ( $>-2.0$ ) ranged from -1.9 to 1.8 in both anatomical regions evaluated and this one was presented in 219 children in the lumbar region and 239 in hip. Low BMD Z-score ( $\leq-2.0$ ) ranged from -2.0 to -3.9 in lumbar region and from -2.0 to -2.1 in hip and this one was presented in 22 and two children respectively. A total of 218 children had normal BMD and 23 low BMD regardless of the evaluated anatomical region. Likewise, the case with low BMD were more frequent in girls than in boys (17 v/s 6), with the highest prevalence in the oldest age groups (table 2).

Regarding the relationship between the BMD and the nutritional status, in healthy children BMD Z-score in the lumbar region was  $-0.67 \pm 0.87$ , in low body weight  $-0.94 \pm 0.72$ , in moderate malnutrition  $-1.14 \pm 0.70$  and in malnutrition severe  $-2.30 \pm 0.61$  and hip region was  $-0.04 \pm 0.75$ ,  $-0.22 \pm 0.60$ ,  $-0.26 \pm 0.66$  and  $-1.39 \pm 0.48$  respectively. Children with malnutrition severe had BMD Z-score different statistically from the other nutritional groups in both anatomical regions (table 3).

## Discussion

When we analyze the absolute measurements of the BMD, differential values was observed according to age, sex and anatomical region evaluated. These results were similar to other studies, where BMD increased with age and it was greater in hip region than lumbar<sup>27-31</sup>. Likewise, in our study lumbar BMD of girls was greater than boys after 11 years old, similar to the study in Mexican and Korean children where female BMD was greatest between 10 and 13 years old<sup>27,28,31</sup>. In our study BMD was  $0.56$  g/cm<sup>2</sup> in lumbar region and  $0.71$  g/cm<sup>2</sup> in hip. These values were lower than lumbar BMD in children from New Zealand with fracture associated to high adiposity which was of  $0.80$  g/cm<sup>2</sup><sup>6</sup>, approximately 1.4 times above of our data ( $0.56$  g/cm<sup>2</sup>). However, we did not obtain adiposity data and we did not find a clinical history of fractures during the study. In such a way the clinical impact of our data is unknown.

We obtained the cases with low BMD from criteria of ISCD<sup>21,24</sup> however BMD values are different between populations, as reported by Chinese compared with American children<sup>32</sup>. Tamayo et al. have conducted studies in Mexican population to establish BMD Z-score, they found that the reference databases used to evaluate BMD significantly underestimated the cases of abnormal BMD in the Mexican mestizo population<sup>27</sup>. So that our results could be underestimated.



1  
2  
3  
4 We found 23 cases with low BMD regardless of the evaluated anatomical region  
5 which were more frequent in girls than in boys (17 v/s 6), with the greatest  
6 prevalence in the oldest groups. It is well known that due to anatomy and bone  
7 structure, women show a greater risk of osteoporotic fractures during adult age  
8 than men and this is associated with hormonal changes and the presence of  
9 menarche<sup>18,33,34</sup>. However, in the present study these factors were not evaluated.

10  
11  
12 The presence of low BMD in our study, requires greater attention to the promotion  
13 of bone health in children, since more than 90% of adult bone mass is acquired  
14 during the first two decades of life, so it is necessary to ensure optimal BMD at the  
15 end of the child's life in order to prevent osteoporotic problems in adulthood<sup>35</sup>.

16  
17  
18 Risk factors have been associated to BMD such as nutritional status, genetic  
19 susceptibility and exposure to environmental contaminants<sup>36-38</sup>. We considered the  
20 nutritional status and found that BMD Z-score decreased in both evaluated  
21 anatomical region when the children presented severe chronic malnutrition with a  
22 statistically significant difference (in healthy children BMD Z-score in the lumbar  
23 region was -0.67, in low body weight -0.94, in moderate malnutrition -1.14 and in  
24 malnutrition severe -2.30 and hip region was -0.04, -0.22, -0.26 and -1.39  
25 respectively). This result is different from that obtained by Rendon-Tavera et al  
26 since they found a trend of low BMD in children with obesity<sup>30</sup> and from that  
27 authors who have suggested that fat body mass is an inversely proportional  
28 predictor of BMD<sup>18,39,40</sup>. However, we did not found cases of high BMI that are  
29 usually accompanied by a high percentage of fat body mass<sup>41</sup>

30  
31  
32  
33 As is known, malnutrition is caused by several factors, including poor nutrition. In  
34 our study, children with malnutrition probably have a deficiency of nutrients actively  
35 involved in bone formation, such as calcium, phosphorus, vitamin D or protein<sup>42</sup>.  
36 There are studies that show the association of these nutrients with BMD. Abrams  
37 et al. showed that the deficiency of Vitamin D, calcium, and phosphorous can lead  
38 to rickets<sup>43</sup>. Geiger et al. demonstrated that calcium intake correlates positively with  
39 low BMD and it has been shown that low protein intake (less than 45-55 g/day in  
40 men or 45 g/day in women) is detrimental to acquiring peak bone mass in  
41 adolescence and to preserve it in adulthood<sup>44,45</sup>. However, we do not evaluate the  
42 intake of these nutrients and it would be interesting to do so since in our study only  
43 BMD Z-score of lumbar region, from the children with severe malnutrition  
44 corresponded to low BMD (-2.30).

45  
46  
47  
48  
49 It is important to promote therapeutic interventions, focused on the consumption of  
50 healthy food, physical exercise, controlled sun exposure, etc. Taking into  
51 consideration that childhood is the stage with greater nutritional imbalance  
52 because children are more vulnerable to the consumption of foods without a  
53 nutritional contribution, and can find themselves in the stage of life where mayor  
54 nutritional requirements exist due to growth and development. Furthermore, eating  
55 habits that will have an influence in the development of diseases including  
56 osteoporosis are forged during this stage, thus, dairy, green leaves, fish and salt  
57 consumption among others has an influence in its presence<sup>46-48</sup>. Likewise, in rural  
58 Mexican communities, the consumption of carbonated drinks is frequent. There are

1  
2  
3  
4 studies suggesting that the ratio between a high phosphorus, low calcium  
5 consumption leads to a lower bone density and osteoporosis<sup>49</sup>  
6

7 The present investigation provides epidemiological information on the values of  
8 child BMD in Mexican rural population associated with nutritional status. Studies  
9 are needed to evaluate the clinical impact of low BMD in children as well as the  
10 promotion of bone health in populations at risk.  
11  
12  
13

## 14 **Conclusions**

15 We found a relationship between nutritional status and bone mineral density. Low  
16 BMD in our population was found only in those children with severe malnutrition.  
17  
18  
19  
20

## 21 **Acknowledgement**

22 The Sectorial Fund SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT-234310 supported the present  
23 research  
24  
25  
26  
27

28 **Authors declare do not have any conflict of interest.**  
29  
30  
31

## 32 **References**

- 33 1. Murillo UA, Deleze HM. Osteoporosis in the Mexican postmenopausal  
34 woman. Magnitude of the problem. Multicentric study. Ginecol Obstet Mex  
35 1999; 67:227-233.
- 36 2. Mendoza RMA, Escalante PJM, Martínez ZR, et al. Osteoporosis in  
37 Mexicans older than 40 years. Determination by densitometry. Rev Med  
38 IMSS 2003; 41(3):193-202.
- 39 3. World Health Organization (WHO). Scientific group assessment of the  
40 osteoporosis at the primary care level. Geneva 27, Switzerland 2004: WHO  
41 Press.
- 42 4. Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. Clin Orthop Relat Res. 2004:  
43 (425):126-134.
- 44 5. Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, et al. Rodríguez-García M, Cannata-  
45 Andía JB. The effect of vertebral fracture as a risk factor for osteoporotic  
46 fracture and mortality in a Spanish population. Osteoporos Int. 2003;  
47 14:520-524.
- 48 6. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, et al. Bone mineral density and body  
49 composition in boys with distal forearm fractures: A dual-energy x-ray  
50 absorptiometry study. J Pediatr 2001; 139:509-515.
- 51 7. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, et al. Association between bone mass and  
52 fractures in children: a prospective cohort study. J Bone Miner Res 2006;  
53 21(9):1489-1495.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1
- 2
- 3
- 4 8. Garrido Colino C, Beléndez Bieler C, Pérez Díaz M, et al. Evaluation of
- 5 bone mineral density in children with sickle cell disease. *An Pediatr* 2015;
- 6 82(4):216-221.
- 7
- 8 9. Tormo R, Infante D. Affectation of bone mineral content in digestive
- 9 pathologies. Unit of Gastroenterology, Hepatology and Child Nutrition.
- 10 Hospital Materno Infantil Vall d' Hebron.Universidad Autónoma Barcelona.
- 11 *Rev Esp Pediatr* 2003; 59(1):79-84.
- 12
- 13 10. Szadek LL, Scharer K. Identification, prevention, and treatment of children
- 14 with decreased bone mineral density. *Journal of Pediatric Nursing* 2014;
- 15 29:3-14.
- 16
- 17 11. Ichiba H, Shintaku H, Fujimaru M, et al. Bone mineral density of the lumbar
- 18 spine in very-low-birth-weight infants: longitudinal study. *Eur J Pediatr* 2000;
- 19 159: 215-218.
- 20
- 21 12. Bailey DA, Wedge JH, McCulloch RG, et al. Epidemiology of fractures of the
- 22 distal end of the radius in children as associated with growth. *J Bone Joint*
- 23 *Surg Am* 1989; 71:1225-1231.
- 24
- 25 13. Lorente RM, Azpeitia J, Arévalo N, et al. Dual energy X-ray absorptimetry:
- 26 Fundamentals, methodology, and clinical applications. *Radiology* 2012;
- 27 54(5):410-423.
- 28
- 29 14. Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, et al. Position statement. Official
- 30 positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin*
- 31 *Endocrinol Metab* 2004; 89(8):3651-3655.
- 32
- 33 15. Bianchi ML. Osteoporosis in children and adolescents. *Bone* 2007;
- 34 41(4):486-495.
- 35
- 36 16. Hansen MA, Overgaard K, Riis BJ, et al. Role of bone mass and bone loss
- 37 in postmenopausal osteoporosis: 12-year study. *Br Med J* 1991; 303:961-
- 38 964.
- 39
- 40 17. Aguilera Barreiro MA, Cazares Rosado LM, Rangel Peniche DB, et al. Effect
- 41 of lifestyles in young Mexican university students on bone mineral density.
- 42 *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2017;23(1).
- 43
- 44 18. Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Cruz-Valdez A, et al. Peak bone mineral area
- 45 density and determinants among females aged 9 to 24 years in Mexico
- 46 *Osteoporos Int* 2003;14:539–547
- 47
- 48 19. Lentle BC, Prior JC. Osteoporosis: what a clinician expects to learn from a
- 49 patient's bone densitometry examination. *Radiology* 2008; 228:620-628.
- 50
- 51 20. Binkovitz L, Sparke P, Henwood MJ. Pediatric DXA: clinical applications.
- 52 *Pediatr Radiol* 2007; 37:625-635.
- 53
- 54 21. Baim S, Leonard MB, Bianchi ML. Official positions of the International
- 55 Society for Clinical Densitometry (ISCD) and executive summary of the
- 56 2007. Pediatric Position Development Conference. *J Clin Densitom* 2008;
- 57 11(1):6-21.
- 58
- 59 22. World Health Organization (WHO). Study Group on Assessment of Fracture
- 60 Risk and Its Application to Screening and Postmenopausal Osteoporosis.
- 61 Geneva: WHO, 1994.
- 62
- 63 23. Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO. Dual energy x-ray absorptiometry
- 64 interpretation and reporting in children and adolescents: the International
- 65

- 1  
2  
3  
4 Society of Clinical Densitometry pediatric official positions. *J Clin Densitom* 2008; 11(1):43-58.  
5  
6  
7 24. Bianchi ML, Baim S, Bishop NJ, et al. Official positions of the International  
8 Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and  
9 adolescents. *Pediatric Nephrology* 2010; 25(1):37-47.  
10  
11 25. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-  
12 for-length, weight-for height and body mass index-for-age: methods and  
13 development. 2006. Suiza, World Health Organization. Disponible in:  
14 [www.who.int/childgrowth/](http://www.who.int/childgrowth/)  
15  
16 26. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R  
17 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2013. Disponible in:  
18 [www.R-project.org/](http://www.R-project.org/).  
19  
20 27. Tamayo J, Díaz R, Lazcano-Ponce E, et al. Reference values for areal bone  
21 mineral density among a healthy Mexican population. *Salud Publica Mex*  
22 2009; 51(1):S56-S83  
23  
24 28. Montijo-Barrios E, Ramírez-Mayans J, García-Campos M, et al.  
25 Accumulation of bone mass measured by peripheral DEXA in healthy  
26 Mexican children between 6 to 12 years of age. *Salud Publica Mex* 2009;  
27 51:227-230.  
28  
29 29. Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Díaz R, et al. Correlation trends for bone  
30 mineral density in Mexican women: Evidence of familiar predisposition.  
31 *Salud Publica Mex* 2009; 51(1):S93-S99  
32  
33 30. Redon-Tavera A, Rodríguez-Madrid R, León-Hernández S, et al. Bone  
34 mineral density, nutritional status and long bone fractures in children.  
35 *Investigación en Discapacidad* 2014; 3(4):168-176.  
36  
37 31. Yi KH, Hwang JS, Kim EY, et al. Reference values for bone mineral density  
38 according to age with body size adjustment in Korean children and  
39 adolescents. *J Bone Miner Metab* 2013. DOI 10.1007/s00774-013-0488  
40  
41 32. Liu J, Wang L, Sun J, et al. Bone mineral density reference standards for  
42 Chinese children aged 3–18: cross-sectional results of the 2013–2015  
43 China Child and Adolescent Cardiovascular Health (CCACH) Study. *BMJ*  
44 *Open* 2017. doi:10.1136/bmjopen-2016-014542  
45  
46 33. Clark P, Cons-Molina F, Delezé M, et al. The prevalence of radiographic  
47 vertebral fractures in Latin American countries: The Latin American  
48 Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int* 2009; 20:275-282.  
49  
50 34. Peris Bernal P. Osteoporosis in Young individuals. *Reumatol Clinical* 2010;  
51 6(4):217-223  
52  
53 35. Henwood ML, Binkovitz L. Update on Pediatric Bone Health. *J Am*  
54 *Osteopath Assoc* 2009; 109:5-12.  
55  
56 36. Lindsay R, Cosman F. Osteoporosis. En: Harrison. *Principios de Medicina*  
57 *Interna*. 17ª ed. Madrid: McGraw-Hill 2009: 2397-2408.  
58  
59 37. Cech D. Prevention of osteoporosis: from infancy through older adulthood.  
60 *Hong Kong physiotherapy journal* 2012; 30:6-12.  
61  
62 38. Galindo-Zavala R, Núñez-Cuadros E, Martín-Pedraz L, et al. Low bone  
63 mineral density in juvenile idiopathic arthritis: prevalence and related factors.  
64 *An Pediatr (Barc)* 2017; 87(4):218-225.  
65

39. Janicka A, Wren TAL, Sanchez MM, et al. Fat Mass Is Not Beneficial to Bone in Adolescents and Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:143–147.
40. El Hage PR, Courteix D, Benhamou CL et al. Relative Importance of lean and fat mass on bone mineral density in a group of adolescent girls and boys. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 105(5):759-64.
41. Padilla J. Relationship of body mass index and body fat percentage in young venezolanos. *Rev. Ib. CC. Act. Fis. Dep.* 2014; 3 (1):27-33
42. Martín-Jiménez JA, Consuegra-Moya B., Martín-Jiménez MT. Nutritional factors in the prevention of osteoporosis. *Nutr Hosp*. 2015; 32(1):49-55.
43. Abrams SA. Nutritional rickets: an old disease returns. *Nutr Rev* 2002; 60:111-115.
44. Geiger KE, Koeller DM, Harding CO, et al. Normal vitamin D levels and bone mineral density among children with inborn errors of metabolism consuming medical food-based diets. *Nutrition Research* 2016; 36:101-108.
45. Bonjour JP, Schurch MA, Rizzoli R. Protein intake and hip fracture. En: Vellas B, Albarède JL, Garry PJ, editores. *Mujeres: Envejecimiento y salud*. Glose, Barcelona, 1998: 85-88.
46. [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10583%3A2015-pahowho-food-processors-reduce-salt-childrens-salty-products&Itemid=1926&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10583%3A2015-pahowho-food-processors-reduce-salt-childrens-salty-products&Itemid=1926&lang=es) Accessed in April 24th 2017.
47. Randoin L. *Composition tables of aliments*. 17<sup>a</sup> ed. París: L.T. Editions Jacques Lanore 1982.
48. Goulding A, Rockell JE, Black RE, et al. Children who avoid drinking cow's milk are at increased risk for prepubertal bone fractures. *J Am Diet Assoc* 2004; 104:250-253
49. Sámano R, Rodríguez-Ventura AL, Godínez Martínez EY, et al. Association of the consumption of carbonated drinks and decalcification in women of reproductive and non-reproductive age in Mexico City. *Nutr Hosp*. 2013; 28:1750-1756

Figures and tables

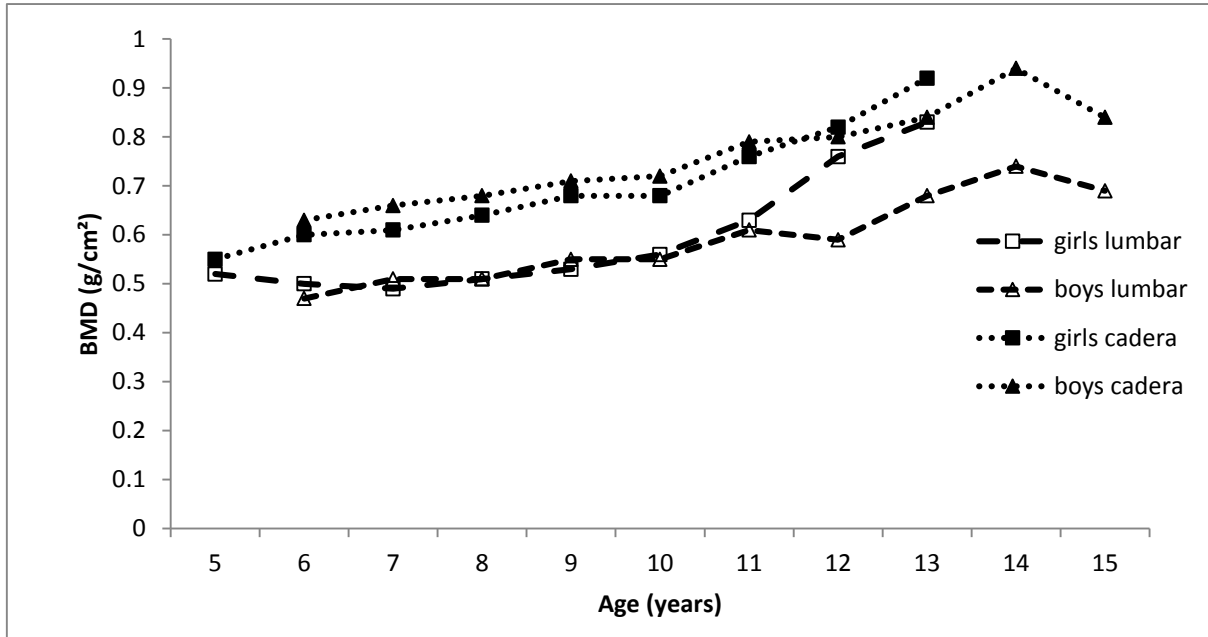


Figure 1. Distribution of BMD (bone mineral density) by anatomical region and age from girls and boys.



Table 1. Characteristics of study population

	age (years) <sup>a</sup>	9.25 ± 2.13
BMD (g/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	lumbar region	0.56 ± 0.11
	hip region	0.71 ± 0.10
sex % (n)	female	46.0 (112)
	male	54.0 (129)
status nutritional % (n)	healthy	67.0 (162)
	low body weight	27.0 (65)
	moderate malnutrition	2.0 (5)
	severe malnutrition	4.0 (9)

BMD= Bone mineral density  
<sup>a</sup>mean ± standard deviation

 pdfelement

Table 2. Frequency of normal and low BMD (bone mineral density) regardless of the evaluated anatomical region by age group and sex

	age	BMD	
		Normal (%)	Low (%)
girls (n=112)	5-7 (n=30)	27 (12.0)	3 (13.0)
	8-10 (n=42)	36 (16.5)	6 (26.0)
	≥ 11 (n=40)	32 (15.0)	8 (35.0)
boys (n=129)	5-7 (n=27)	26 (12.0)	1 (4.0)
	8-10 (n=64)	61 (28.0)	3 (13.0)
	≥ 11 (n=38)	36 (16.5)	2 (9.0)
all (241)		218	23

pdfelement



Table 3. BMD (bone mineral density) Z-score according to nutritional status in each evaluated anatomical region

anatomic region	nutritional status			
	healthy (n=162)	low body weight (n=65)	moderate malnutrition (n=5)	Severe malnutrition (n=9)
lumbar	-0.67 ± 0.87	-0.94 ± 0.72	-1.14 ± 0.70	*-2.30 ± 0.61
hip	-0.04 ± 0.75	-0.22 ± 0.60	-0.26 ± 0.66	*-1.39 ± 0.48

It present mean ± standard deviation

\*ANOVA;  $p < 0.05$

pdfelement

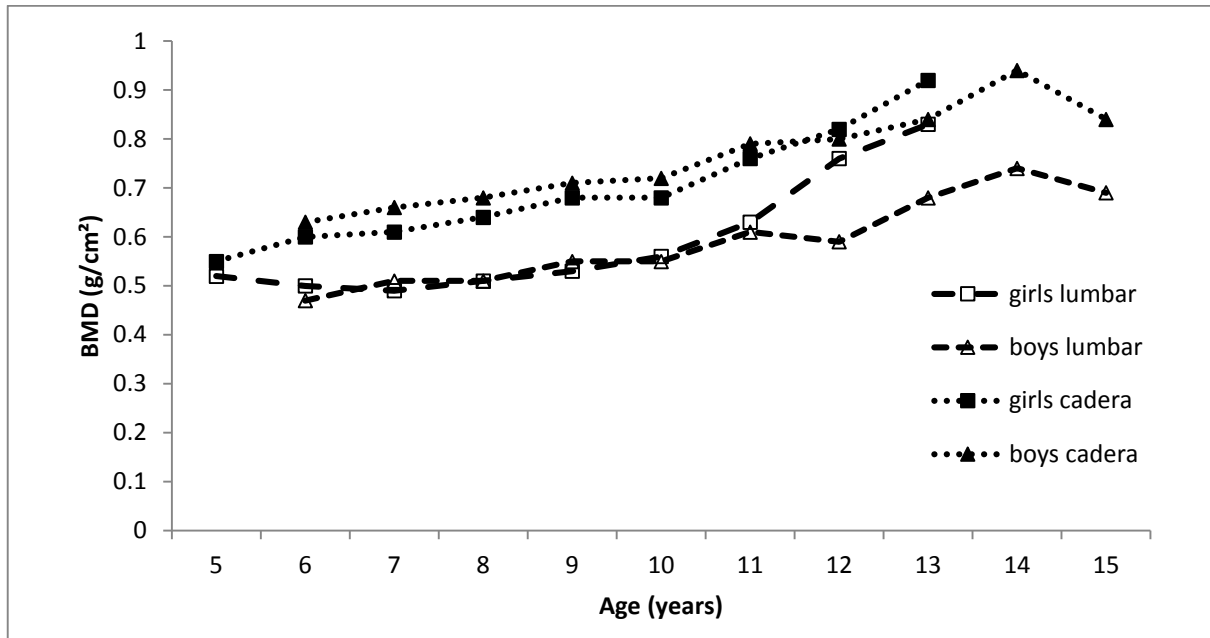
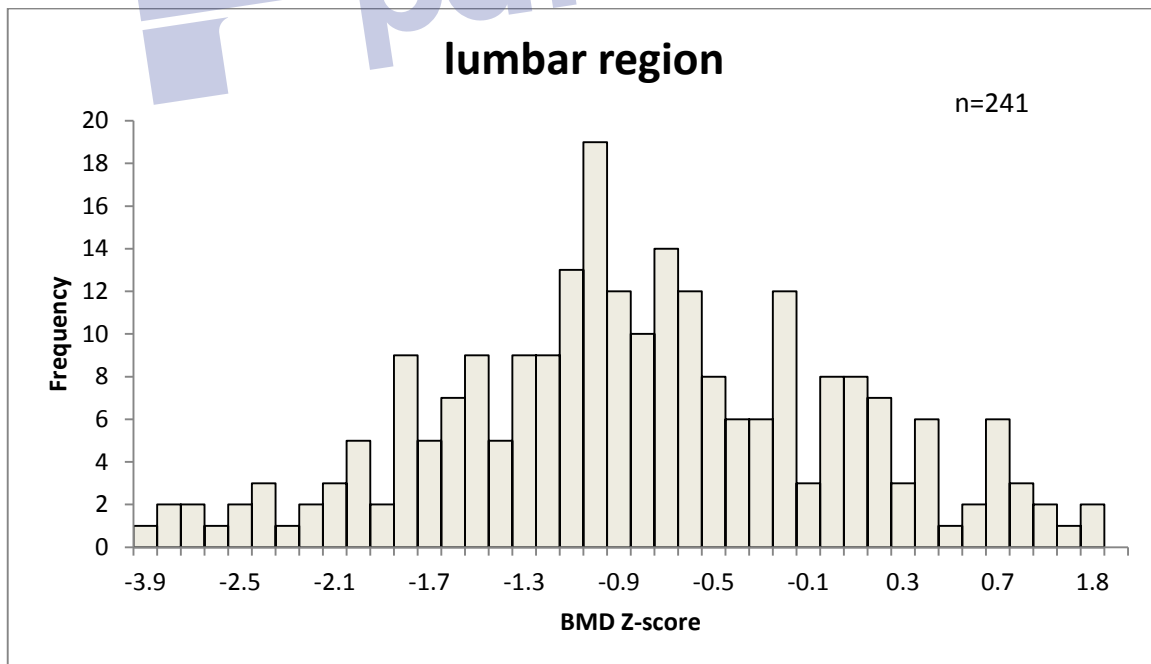


Figure 1. Distribution of BMD (bone mineral density) by anatomical region and age from boys and girls.



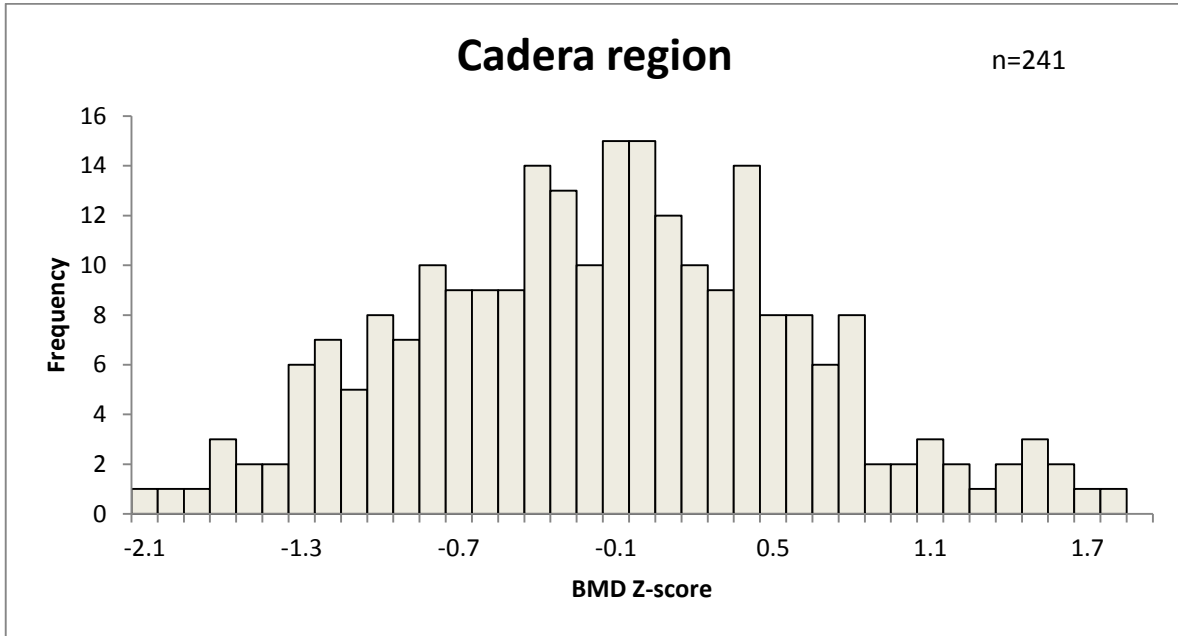


Figure 2. Distribution of BMD (bone mineral density) Z-score by anatomical region.



Table 1. Frequency of BMD (bone mineral density) Z-scores classified according to the ISCD (International Society of Clinical Densitometry) by age group and sex of participants.

	age	Z-score BMD	
		normal > -2.0	low ≤ -2.0
girls (n=112)	5-7 (n=30)	27	3
	8-10 (n=42)	36	6
	≥ 11 (n=40)	32	8
boys (n=129)	5-7 (n=27)	26	1
	8-10 (n=64)	61	3
	≥ 11 (n=38)	36	2
all (241)		218	23

Table 2. BMD Z-score according to nutritional status and by age group

Age (years)	chronic malnutrition			
	healthy	low weight	moderate	severe
5	-	-0.45 (n=2)	-	-
6	-0.66 (n=19)	-0.72 (n=5)	-0.80 (n=1)	-
7	-0.53 (n=16)	-0.99 (n=14)	-	-
8	-0.67 (n=30)	-1.28 (n=11)	-	-2.50 (n=1)
9	-0.60 (n=23)	-0.98 (n=7)	-1.06 (n=3)	-2.40 (n=1)
10	-0.92 (n=20)	-1.08 (n=8)	-1.70 (n=1)	-3.00 (n=1)
11	-0.79 (n=30)	-0.86 (n=6)	-	-2.80 (n=1)
12	-0.50 (n=14)	-0.91 (n=10)	-	-2.55 (n=2)
13	-0.38 (n=10)	-1.00 (n=1)	-	-1.80 (n=1)
14	-	-0.10 (n=1)	-	-1.50 (n=1)
15	-	-	-	-1.50 (n=1)
all	-0.67 ± 0.87 <sup>a</sup> (n=162)	-0.94 ± 0.72 <sup>a</sup> (n=65)	*-1.14 ± 0.70 <sup>a</sup> (n=5)	*-2.30 ± 0.61 <sup>a</sup> (n=9)

<sup>a</sup>mean ± standard deviation

\*ANOVA;  $p < 0.05$

Table 3. BMD (bone mineral density) Z-score according to nutritional status in each evaluated anatomical region

anatomic region	nutritional status			
	healthy (n=162)	low body weight (n=65)	moderate malnutrition (n=5)	Severe malnutrition (n=9)
lumbar	-0.67 ± 0.87	-0.94 ± 0.72	-1.14 ± 0.70	*-2.30 ± 0.61
hip	-0.04 ± 0.75	-0.22 ± 0.60	-0.26 ± 0.66	*-1.39 ± 0.48

It present mean ± standard deviation

\*ANOVA;  $p < 0.05$



Click here to access/download  
**Supplementary Material**  
The title page.docx



## Copyright/Authorship/Disclosure Form

### Clinical Rheumatology

Bone mineral density in children

Article Title: (first few words) .....

First Author: Lizet Jarquín-Yáñez .....

E-mail: draljarquin@hotmail.com .....

#### AUTHORSHIP

I, the undersigned author(s), certify that:

- I have seen and approved the final version of the manuscript, and all subsequent versions.
- I have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
- I have drafted the article or revised it critically for important intellectual content.
- I agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

I accept public responsibility for it, and believe it represents valid work. As an author of this article, I certify that none of the material in the manuscript has been previously published, nor is included in any other manuscript. I certify that this manuscript is not under consideration for publication elsewhere, nor has it been submitted or accepted in another publication in any form. The rights or interest in the manuscript have not been assigned to any third party.

Moreover, should the editor of *Clinical Rheumatology* request the data upon which the manuscript is based, I shall produce it. I also certify that I have read and complied with the copyright information, as found on the journal home page website.

After submission of this agreement signed by all authors, changes to the order of the author names will not be accepted by *Clinical Rheumatology*. Authors will be asked to complete an 'Authorship Change' form when requesting the removal or addition of an author name(s), change or addition of corresponding author, etc. The Authorship Change form must be signed by all named authors; implementation of the change is at the discretion of the Editor.

#### FINANCIAL DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

I certify that any financial interests such as employment, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, as well as any personal relationships, academic competition, and intellectual passion which may inappropriately influence my actions, have been included within my manuscript. If none exist, the statement "Conflict of Interest: the authors declare they have no conflicts of interest" has been included.

All funding sources supporting the work and all institutional or corporate affiliations of mine are acknowledged in a footnote.

I have had full access to all the data in the study (if applicable) and thereby accept full responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

By checking the box next to my signature I assert that there are no conflicts of interest (both personal and institutional) regarding specific financial interests that are relevant to the work conducted or reported in this manuscript.

Page 1 of 2 (Signatures and dates are required on page 2)

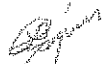
# Copyright/Authorship/Disclosure Form

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Where applicable, I confirm that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Where applicable, I confirm that that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study have been omitted.

Statements affirming the above have been included prior to the References section. If these statements are not applicable, the following statement has been included: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.



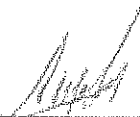
Author's signature

Lizet Jarquín-Yáñez

Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210 San Luis Potosí, SLP, México

Printed name & date

2

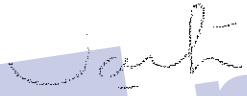


Author's signature

José de Jesús Mejía-Saavedra

Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210 San Luis Potosí, SLP, México

Printed name & date



Author's signature

Jaqueline Calderón Hernández

Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210 San Luis Potosí, SLP, México

Printed name & date

4

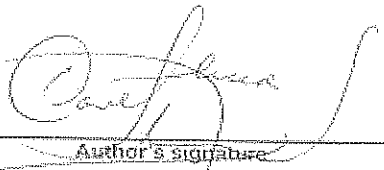


Author's signature

Jorge Alejandro Alegria-Torres

Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, 36050 Guanajuato, Gto., México.

Printed name & date



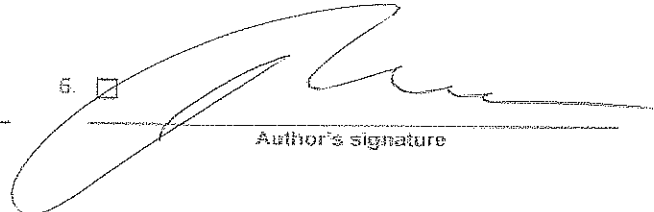
Author's signature

Carlos Abud-Mendoza

Unidad de Investigaciones Reumatológicas A.C., Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", 78250 San Luis Potosí, SLP, México

Printed name & date

5.



Author's signature

JORGE MORALES-TORRES, M.D.

Printed name & date 20-JUL-2018

NOTE: All named authors must sign this form. If there are more than 12 authors in the authorship group then please continue the author signatures, names and dates on an additional sheet.

**QUINTO ARTÍCULO.- Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio  
en San Luis Potosí, México.**



Manuscript Number: ANPEDIA-19-11

Title: Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio en San Luis Potosí, México Endemic hydrofluorosis and consumption of calcium, phosphorus and magnesium in San Luis Potosí, Mexico

Article Type: Original

Keywords: Salud; flúor; exposición; micronutrientes; ingesta diaria recomendada.

Health; fluoride; exposure; micronutrients; recommended daily intake.

Corresponding Author: Professor José de Jesús Mejía-Saavedra, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad Autonoma de San Luis Potosi

First Author: Lizet Jarquín-Yáñez, PhD

Order of Authors: Lizet Jarquín-Yáñez, PhD; Jaqueline Calderón Hernández, PhD; Nelly Molina-Frechero; Laura González, Miss; José de Jesús Mejía-Saavedra, Ph.D.

Abstract: Introducción: Una mala nutrición durante la infancia es origen de numerosas enfermedades y contribuye negativamente en la salud de poblaciones expuestas a tóxicos. Objetivo: Evaluar la relación existente entre el nivel de exposición a flúor y el consumo de micronutrientes en escolares de una zona rural del estado de San Luis Potosí. Metodología: Se evaluaron 121 escolares entre 7 y 15 años residentes de Ojo Caliente, Santa María del Río. Las concentraciones de flúor en agua y orina se obtuvieron a través del método potenciométrico con electrodo ion selectivo y la ingesta de micronutrientes a través de un cuestionario de frecuencia de consumo validado. Resultados: El promedio de flúor en agua de grifo y embotellada fue de  $2.36 \pm 0.02$  mg/L y  $0.14 \pm 0.04$  mg/L respectivamente y en orina de  $2.05 \pm 0.62$  mg/L. Los niños que presentaron un consumo <50% de la Ingesta diaria recomendada de calcio tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo mayor ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L) misma situación en el caso del magnesio ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  y  $1.90 \pm 0.67$  mg/L). Los niños que presentaron un consumo >150% de la ingesta diaria recomendada de fósforo tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo menor ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  y  $1.82 \pm 0.13$  mg/L). Conclusiones: En el presente estudio se encontró relación entre la concentración de flúor en orina y el consumo de calcio, magnesio y fósforo.

Introduction: Poor nutrition during childhood is the origin of many diseases and contributes negatively to the health of populations exposed to toxic substances. Objective: To evaluate the relationship between the level of exposure to fluoride and the consumption of micronutrients in schoolchildren in a rural area of the state of San Luis Potosí. Methodology: We evaluated 121 schoolchildren between 7 and 15 years old,

they were residents of Ojo Caliente, Santa María del Río. Fluoride concentrations in water and urine were obtained through the potentiometric method with selective ion electrode and the intake of micronutrients was obtained through a validated consumption frequency questionnaire. Results: The average of fluoride concentrations in tap and bottled water were  $2.36 \pm 0.02$  mg/L and  $0.14 \pm 0.04$  mg/L respectively and in urine was of  $2.05 \pm 0.62$  mg/L. Children who had a consumption <50% of the recommended daily intake of calcium had a higher concentration of fluoride in urine compared to those who had a higher consumption ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L), the same happened in the case of magnesium consumption ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  and  $1.90 \pm 0.67$  mg/L). Children who had a consumption >150% of the recommended daily intake of phosphorus had a higher concentration of fluoride in urine compared to those who had a lower consumption ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  and  $1.82 \pm 0.13$  mg/L ). Conclusions: In the present study, a relationship was found between the concentration of fluoride in urine and the consumption of calcium, magnesium and phosphorus.

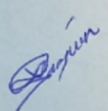
Suggested Reviewers: Octelina Castillo-Ruiz  
Unidad Academica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán,, Universidad Autónoma de Tamaulipas  
octecastillox@hotmail.com  
Posee trabajos similares

Fatima del Carmen Aguilar-Díaz  
National Graduate School, Unit León, National Autonomous University of Mexico  
fatimaguilar@gmail.com  
Tiene un trabajo similar

A través de la siguiente carta manifestamos que el manuscrito es remitido exclusivamente a **ANALES DE PEDIATRÍA** de forma que no está siendo sometido a consideración en cualquier otra publicación y no ha sido publicado previamente ni en todo ni en parte.

Los autores somos responsables de la investigación, participando en su concepto y diseño, análisis e interpretación de los datos, escritura y corrección del manuscrito, así como en la aprobación del texto final que hemos enviado a **ANALES DE PEDIATRÍA**.

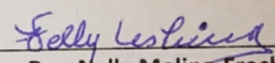
ATENTAMENTE



---

**M C. Lizet Jarquín-Yáñez**

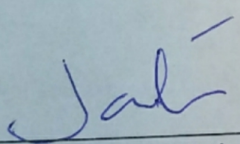
Centro de Investigación Aplicada en  
Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí



---

**Dra. Nelly Molina-Frechero**

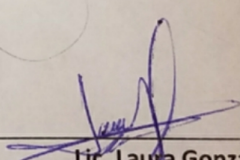
Departamento de Atención a la Salud, División  
de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad  
Autónoma Metropolitana Xochimilco, México



---

**Dra. Jaqueline Calderón Hernández**

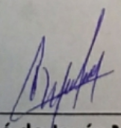
Centro de Investigación Aplicada en  
Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí



---

**Lic. Laura González**

Licenciatura en Nutrición, Universidad del  
Centro de México, San Luis Potosí



---

**Dr. José de Jesús Mejía-Saavedra**

Centro de Investigación Aplicada en  
Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

## **Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio en San Luis Potosí, México**

**Título corto:** Hidrofluorosis, calcio, fósforo y magnesio

**Autores:**

Lizet Jarquín-Yáñez<sup>1</sup>, Jaqueline Calderón Hernández<sup>1</sup>, Nelly Molina-Frechero<sup>2</sup>, Laura González<sup>3</sup>, José de Jesús Mejía-Saavedra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona 550 Lomas 2da. Secc., 78210 San Luis Potosí, SLP, México.

<sup>2</sup>Departamento de Atención a la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, 04460 CD de México, México.

<sup>3</sup>Licenciatura en Nutrición, Universidad del Centro de México, Capitán Caldera 75 Tequisquiapan, 78250 San Luis Potosí, SLP, México.

**Datos del autor correspondiente:** José de Jesús Mejía-Saavedra, Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona 550 Lomas 2da. Secc. 78210 San Luis Potosí, SLP, México. Tel. (52 444) 8262300 ext. 8461. [jjesus@uaslp.mx](mailto:jjesus@uaslp.mx)

Esta investigación fue financiada por el fondo sectorial SS/IMSS/ISSTE-CONACyT-234310

**Recuento de palabras:** 3010

**Fecha de envío:** 05-01-19

## Hidrofluorosis endémica y consumo de calcio, fósforo y magnesio en San Luis Potosí, México.

### Resumen

**Introducción:** Una mala nutrición durante la infancia es origen de numerosas enfermedades y contribuye negativamente en la salud de poblaciones expuestas a tóxicos. **Objetivo:** Evaluar la relación existente entre el nivel de exposición a flúor y el consumo de micronutrientes en escolares de una zona rural del estado de San Luis Potosí. **Metodología:** Se evaluaron 121 escolares entre 7 y 15 años residentes de Ojo Caliente, Santa María del Río. Las concentraciones de flúor en agua y orina se obtuvieron a través del método potenciométrico con electrodo ion selectivo y la ingesta de micronutrientes a través de un cuestionario de frecuencia de consumo validado. **Resultados:** El promedio de flúor en agua de grifo y embotellada fue de  $2.36 \pm 0.02$  mg/L y  $0.14 \pm 0.04$  mg/L respectivamente y en orina de  $2.05 \pm 0.62$  mg/L. Los niños que presentaron un consumo <50% de la Ingesta diaria recomendada de calcio tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo mayor ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L) misma situación en el caso del magnesio ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  y  $1.90 \pm 0.67$  mg/L). Los niños que presentaron un consumo >150% de la ingesta diaria recomendada de fósforo tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo menor ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  y  $1.82 \pm 0.13$  mg/L). **Conclusiones:** En el presente estudio se encontró relación entre la concentración de flúor en orina y el consumo de calcio, magnesio y fósforo.

**Palabras Clave:** Salud, flúor, exposición, micronutrientes, ingesta diaria recomendada

## Abstract

**Introduction:** Poor nutrition during childhood is the origin of many diseases and contributes negatively to the health of populations exposed to toxic substances.

**Objective:** To evaluate the relationship between the level of exposure to fluoride and the consumption of micronutrients in schoolchildren in a rural area of the state of San Luis Potosí.

**Methodology:** We evaluated 121 schoolchildren between 7 and 15 years old, they were residents of Ojo Caliente, Santa María del Río. Fluoride concentrations in water and urine were obtained through the potentiometric method with selective ion electrode and the intake of micronutrients was obtained through a validated consumption frequency questionnaire.

**Results:** The average of fluoride concentrations in tap and bottled water were  $2.36 \pm 0.02$  mg/L and  $0.14 \pm 0.04$  mg/L respectively and in urine was of  $2.05 \pm 0.62$  mg/L. Children who had a consumption  $<50\%$  of the recommended daily intake of calcium had a higher concentration of fluoride in urine compared to those who had a higher consumption ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L), the same happened in the case of magnesium consumption ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  and  $1.90 \pm 0.67$  mg/L). Children who had a consumption  $>150\%$  of the recommended daily intake of phosphorus had a higher concentration of fluoride in urine compared to those who had a lower consumption ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  and  $1.82 \pm 0.13$  mg/L ).

**Conclusions:** In the present study, a relationship was found between the concentration of fluoride in urine and the consumption of calcium, magnesium and phosphorus.

**Keywords:** Health, fluoride, exposure, micronutrients, recommended daily intake

## 1.- INTRODUCCIÓN

La nutrición durante la infancia y la adolescencia es un tema de gran importancia debido a los cambios físicos y biológicos que se presentan. Factores como los estilos de vida adquiridos, hábitos alimenticios inadecuados, la genética y factores ambientales provocan mayores requerimientos nutricionales en esta población<sup>1</sup>. De tal manera que la cantidad de nutrientes consumidos en este periodo deben ser capaces de reducir el riesgo de enfermedades crónicas en el futuro.

Es importante considerar que las secuelas de una mala alimentación durante la infancia y la adolescencia abarcan diversos tipos de problemas como los neurológicos, musculares, óseos, infecciosos y de desarrollo, así como invalidez física y muerte, lo cual representa una disminución de la calidad de vida de las personas y del rendimiento económico de un país.

Actualmente se ha demostrado la relación existente entre la dieta y algunos contaminantes ambientales, con mayor vulnerabilidad en niños y adolescentes. En el caso particular del flúor, se ha descrito una absorción rápida y casi completa cuando la dieta es rica en fósforo<sup>2,3</sup>. Caso contrario a lo que ocurre cuando la dieta es rica en calcio, magnesio o aluminio en donde su absorción se reduce ligeramente, debido a los complejos insolubles que se forman<sup>2,3</sup>. Bajo este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la relación existente entre el nivel de exposición a flúor y el consumo de micronutrientes en escolares de una zona rural en el estado de San Luis Potosí.

## **2.- METODOLOGÍA**

Se llevó a cabo un estudio transversal analítico en una muestra de 121 escolares de entre 7 y 15 años de edad residentes de la comunidad de Ojo Caliente, Santa María del Río ubicada en la parte centro-sur del estado de San Luis Potosí.

### *2.1 Población de estudio*

La población de estudio fue seleccionada al azar. Los criterios de inclusión fueron: residencia desde el nacimiento en la comunidad seleccionada y ausencia de enfermedad aparente reportada por los padres o tutores. Se excluyeron aquellos niños que estuvieran consumiendo algún suplemento alimenticio. Previo al estudio se informó a la población acerca de los objetivos de la investigación, riesgos y metas. El estudio fue anónimo y voluntario y cumplió con los requisitos del comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. El consentimiento informado fue firmado tanto por los participantes como por los padres o tutores.

### *2.2 Evaluación dietética*

Se obtuvo el consumo de calcio, magnesio y fósforo basado sobre su contenido en diferentes grupos de alimentos y sobre su frecuencia de ingesta a partir del cuestionario de frecuencia de consumo del Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrientes (SNUT) desarrollado por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) el cual ha sido validado para población mexicana<sup>4</sup>. Para ello se solicitó el apoyo de los padres o tutores.

### *2.3 Monitoreo biológico*

Se recolectó una muestra de orina de 24 horas de cada participante utilizando recipientes de plástico de polipropileno nuevos. La cuantificación de flúor en las muestras de orina y agua se llevó a cabo utilizando el método potenciométrico con un electrodo ion selectivo, de acuerdo al Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH *por sus siglas en inglés*)<sup>5</sup>. El rango de la curva de calibración fue de 0.1 a 10.0 mgF/L, todas las muestras fueron cuantificadas usando un buffer (TISAB) en una proporción de 1:1. Como control de calidad se utilizó el estándar de referencia SRM 2671a "Fluoruro en orina liofilizada" (NIST) con una recuperación del 97% ± 6. La corrección del factor de dilución de la orina se llevó a cabo por densidad<sup>6</sup>.



#### 2.4 Análisis estadístico

Se calcularon frecuencias, proporciones, medias y desviación estándar para describir a la población de estudio. Se compararon medias entre los grupos tanto con t-student como con ANOVA con un valor de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el paquete estadístico RStudio-0.99.902.023<sup>7</sup>.

La población evaluada fue estratificada de acuerdo al origen del agua de consumo en: a) bebe y cocina con agua de grifo, b) cocina con agua de grifo y bebe agua embotellada y c) bebe y cocina con agua embotellada. Posteriormente se estratificó de acuerdo a la edad mediante los criterios del Instituto de Medicina (IOM *por sus siglas en inglés*) con el fin de establecer la ingesta diaria recomendada (IDR)<sup>8,9</sup> en: a) 7 a 8 años, b) 9 a 13 años y c) 14 a 15 años. Finalmente se estratificó en base a la IDR por el IOM y validada para población mexicana<sup>8,9</sup> en: a) <50% de la IDR, b) entre 50% y 100% de la IDR y c) >150% de la IDR .

### 3.- RESULTADOS

La población de estudio quedó conformada por 121 niños con una edad promedio de  $10.31 \pm 2.14$  años, el 54% fueron masculinos y 46% femeninos. El 72% de la población evaluada reportó utilizar el agua del grifo para beber y cocinar, el 21% solo para cocinar y el resto reportó utilizar el agua embotellada tanto para beber como para cocinar (tabla 1). El promedio de la concentración de flúor en el agua de grifo fue de  $2.36 \pm 0.02$  mg/L y de  $0.14 \pm 0.04$  mg/L en el agua embotellada. En tanto que la concentración promedio de flúor en la orina fue de  $2.05 \pm 0.62$  mg/L (tabla 1).

En relación a la ingesta de los micronutrientes evaluados de acuerdo al grupo de edad, el consumo promedio de calcio fue de  $731.68 \pm 327.38$  mg/día en los niños de 7-8 años, de  $936.34 \pm 316.69$  mg/día en los niños de 9-13 años y de  $860.70 \pm 328.81$  mg/día en los niños de 14-15 años. El 25% de los niños de 7-8 años presentaron una ingesta de calcio por debajo de 390 mg/día y el 50% un consumo por arriba de los 900 mg/día. El 75% de los niños de 9-13 años y de 14-15 años presentaron una ingesta de calcio menor a 1188.82 mg/día y 1166.98 mg/día respectivamente (tabla 2). Un consumo <50% de la IDR para calcio se presentó en el 38% del grupo de niños de 7-8 años y de 9-13 años y en el 60% de los de 14-15 años (figura 1).

En el caso del magnesio, el consumo promedio fue de  $171.44 \pm 53.94$  mg/día en los niños de 7-8 años,  $305.74 \pm 102.59$  mg/día en los de 9-13 años y  $361.00 \pm 163.12$  mg/día en los de 14-15 años. El 75% del grupo de niños de 7-8 años y 9-13 años presentaron una ingesta de magnesio mayor a 150.92 mg/día y 282.35 mg/día respectivamente y el 50% de los niños de 14-15 años presentaron una ingesta mayor a 370.24 mg/día (tabla 2). Sin embargo, el 10% de la población evaluada presentó un consumo <50% de la IDR para magnesio en el grupo de 7-8 años, el 18% en el de 9-13 años y el 30% en el de 14-15 años (figura 1). Así mismo, el 17% de la población presentó un consumo >150% de la IDR para magnesio en los niños de 7-8 años, el 28% en los de 9-13 años y el 10% en los de 14-15 años (figura 1).

El consumo promedio de fósforo fue de  $643.06 \pm 168.44$  mg/día en los niños de 7-8 años,  $1404.76 \pm 476.72$  mg/día en los de 9-13 años y  $1005.41 \pm 366.96$  mg/día en los de 14-15 años (tabla 2). El 25% de los niños de 7-8 años presentaron un consumo de fosforo menor a 500 mg/día, el 50% de los niños de 9-13 años menor a 1222.24 mg/día y el 75%

de los de 14-15 años menor a 1073.56 mg/día (tabla 2). Con respecto a la IDR el 5% de los niños de 9-13 años y el 10% de los de 14-15 años presentaron un consumo <50% de la IDR para fósforo. El 31% de los niños de 7-8 años, el 46% de los de 9-13 años y el 10% de los de 14-15 años presentaron un consumo >150% de IDR para fósforo (figura 1).

En cuanto a la relación entre la concentración de flúor en orina y el origen del agua de consumo en la tabla 3 se puede observar un nivel de exposición a flúor de  $2.26 \pm 0.53$  mg/L en los niños que reportaron beber y cocinar con agua de grifo, de  $1.63 \pm 0.53$  mg/L en aquellos que reportaron cocinar con agua de grifo y beber agua embotellada y de  $1.13 \pm 0.10$  mg/L en aquellos que reportaron beber y cocinar con agua embotellada, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre dichos promedios.

En lo que se refiere a la concentración de flúor en orina y la ingesta de los micronutrientes evaluados, la tabla 3 muestra una mayor concentración de flúor en la orina de los niños que presentaron un consumo <50% de la IDR de calcio con respecto a los que tuvieron un consumo mayor. Misma situación que ocurrió en el caso del magnesio, en donde los niños que reportaron un consumo <50% de la IDR presentaron la mayor concentración de flúor en la orina. Caso contrario a lo ocurrido con el fósforo, en donde los niños que presentaron la mayor concentración de flúor en la orina fueron aquellos que tuvieron un consumo >150% de la IDR (tabla 3).

#### 4.- DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron 121 niños de una comunidad rural afectada por flúor en el agua de consumo, en donde más del 90% de la población reportó utilizar el agua del grifo para beber y/o cocinar, con una concentración de flúor 1.5 veces por arriba del límite permitido por la NOM-127 para este tipo de agua (2.36 v/s 1.5 mgF/L)<sup>10</sup>. El porcentaje de consumo del agua de grifo es similar a otros estudios que señalan que entre el 60% y el 90% de la población residente de zonas con altas concentraciones de flúor, utilizan este tipo de agua para beber y preparar alimentos<sup>11</sup>.

El consumo de flúor implica riesgos a la salud como fluorosis dental y esquelética, problemas neurológicos, reproductivos, renales y endócrinos entre otros<sup>12-14</sup>, por lo que la salud de la población se encuentra en riesgo. En este caso, nosotros encontramos una mayor concentración de flúor en la orina de los niños que utilizaban el agua del grifo tanto para beber como para cocinar y una disminución de esta conforme dejaban de utilizarla para el consumo (beben y cocinan 2.26 mgF/L, solo cocinan 1.63 mgF/L y no la utilizan 1.13 mgF/L), por lo que se sugiere sustituirla por el agua embotellada; la cual mostró una concentración dentro del límite permitido por la NOM-041 (0.14 v/s 0.7 mgF/L)<sup>15</sup> y un menor nivel de exposición a flúor en los niños que reportaron usar agua embotellada para beber y cocinar (1.13 mgF/L).

Al considerar a los contaminantes ambientales como los causantes de efectos negativos en salud, es necesario tomar en cuenta factores como la susceptibilidad genética y el estado nutricional del individuo expuesto, ya que pueden exacerbar sus efectos<sup>16-19</sup>. Nosotros evaluamos el consumo de calcio, magnesio y fósforo considerando que son los mayormente asociados con el metabolismo del flúor<sup>20</sup>.

En México existen problemas de bajo consumo de micronutrientes asociados al alto consumo de energía<sup>21</sup>. Siendo el problema principal la deficiencia de calcio, debido a la relación que guarda con la presencia de enfermedades crónico degenerativas<sup>22</sup>. En el caso de nuestro estudio, nosotros encontramos deficiencia tanto de calcio como de magnesio y fósforo. Existen reportes que indican una deficiencia importante de calcio sobre todo en países en vías de desarrollo como México, principalmente en la parte norte del país<sup>23,24</sup>, lugar en donde se localiza nuestra zona de estudio (San Luis Potosí).

El consumo promedio de calcio en nuestra población fue de 731 mg/día en los niños de 7-8 años, de 936 mg/día en los de 9-13 años y de 860 mg/día en los de 14-15 años, valores similares a los obtenidos en otros estudios donde reportan ingestas entre 589 y 986 mg/día en niños de 8 a 10 años y entre 675 y 1273 mg/día en niños de 10 a 18 años<sup>25</sup>. Contrario a los valores registrados solo para México, en donde en uno de ellos se reportó una media de consumo de calcio menor a la obtenida en el presente estudio con 466 mg/día en niñas y 527 mg/día en niños y en otro una mediana de 763 mg/día, menor a la registrada en los niños de 7-8 años y de 9-13 años (900 y 998 mg/día) y mayor a la registrada en los de 14-15 años (649 mg/día)<sup>26,27</sup>.

En el presente estudio, el 75% de los niños de 9-13 años y de 14-15 años presentaron una ingesta de calcio menor a la IDR (1188.82 y 1166.98 v/s 1300 mg/día). Así mismo, el 38% de los niños de 7-8 años y 9-13 años y el 60% de los de 14-15 años presentaron un consumo <50% de la IDR para calcio, proporción de niños mayor a la encontrada en Reynosa, Tamaulipas, en donde reportaron que el 32% de los niños consume menos del 50% de la IDR para calcio<sup>28</sup>. El consumo de calcio es indispensable para el crecimiento y mineralización de los tejidos duros del organismo<sup>29</sup>. Un aporte inadecuado de este micronutriente puede conducir a deformidades óseas y otras enfermedades de carácter irreversible tales como la osteoporosis, la cual puede tener su origen durante la infancia aumentando el riesgo de morbilidad y mortalidad en la edad adulta<sup>30-32</sup>. Recordemos además que el consumo de flúor también se encuentra asociado a enfermedades óseas. De manera que la población de estudio se encuentra en riesgo de presentar este tipo de enfermedades.

Existen además estudios que señalan que la deficiencia de magnesio puede afectar el crecimiento óseo al alterar el metabolismo del calcio a través del efecto en las hormonas calcitrópicas<sup>33</sup>. En nuestro estudio el consumo de magnesio fue mayor que el consumo de calcio ya que arriba del 75% de la población evaluada alcanzó la IDR en los grupos de 7-8 años y 9-13 años (p25= 150 y 282 mg/día respectivamente) y arriba del 50% en los de 14-15 años (p50= 370 mg/día). Sin embargo el 10% de la población evaluada presentó un consumo <50% de la IDR para magnesio en el grupo de 7-8 años, el 18% en el de 9-13 años y el 30% en el de 14-15 años.

Hábitos alimenticios como el consumo elevado de fibra dietaria y alimentos procesados, la sustitución del consumo de leche por refrescos, jugos o productos lácteos de origen vegetal y el consumo elevado de cafeína, proteína y fósforo influyen en la deficiencia de calcio y magnesio<sup>34</sup>. Actualmente, el exceso en el consumo de fósforo se ve reflejado principalmente por el aumento en el consumo de bebidas carbonatadas, las cuales son altas en fósforo provocando la disminución de la densidad mineral ósea (DMO). En nuestro estudio, el 31% de los niños de 7-8 años, el 46% de los de 9-13 años y el 10% de los de 14-15 años presentaron un consumo >150% de IDR para fósforo, lo cual podría estar relacionado con la presencia de bajo consumo de calcio y magnesio en la población de estudio y probablemente ocasionará problemas de DMO. Además esto podría exacerbar los efectos negativos en salud provocados por el elevado consumo de flúor en la población.

Existen numerosos estudios que proponen la participación de la dieta y la nutrición en la reducción de los efectos tóxicos del flúor en el organismo<sup>2,35</sup>. Incluso, Godfren y cols. proponen un programa para el control integrado de la fluorosis dental, a partir de la disminución del consumo de flúor a través del uso de una planta rica en calcio<sup>36</sup>. Otros reportes señalan que el calcio y el fósforo se encuentran en equilibrio dentro del organismo y la abundancia o carencia de uno ellos afecta la capacidad de absorber del otro. Lo que podría sugerir una relación indirecta entre la absorción del flúor y el fósforo, ya que el fósforo requiere vitamina D para absorberse y al consumirse en exceso, podría reducir la vitamina D disponible en el organismo para que el calcio pueda absorberse y este a su vez interfiera con la absorción del flúor<sup>37</sup>.

En el caso de nuestro estudio nosotros asumimos que la deficiencia en el consumo de calcio y de magnesio podrían estar afectando la concentración de flúor en el organismo, al encontrar mayores concentraciones de flúor en la orina de los niños con un consumo <50% de la IDR para calcio y magnesio respecto a aquellos que tuvieron una ingesta mayor (2.20 v/s 1.96 mg/L en el caso del calcio y 2.58 v/s 1.96 y 1.90 mg/L en el caso del magnesio). Además, nosotros encontramos una relación entre el nivel de exposición a flúor y el consumo de fósforo al encontrar una mayor concentración de flúor en la orina de los niños que presentaron un consumo de fósforo >150% de la IDR con respecto a los niños que tuvieron un consumo menor (2.43 v/s 1.82 mg/L).

Los resultados del presente estudio muestran una deficiencia en el consumo de calcio y magnesio <50% de la IDR así como un consumo de fósforo >150% de la IDR que se relacionaron con el nivel de exposición a flúor evaluado en orina. Sin embargo, son necesarios más estudios que confirmen estos resultados, ya que nosotros aplicamos un cuestionario de frecuencia de consumo siendo recomendable el uso de pruebas químicas de cuantificación. Además, considerando los resultados del presente estudio se sugiere monitorizar la salud ósea de la población evaluada, implementar programas nutricionales enfocados a contrarrestar las deficiencias observadas, así como ampliar la evaluación nutricional en esta y en otras zonas vulnerables a efectos tóxicos ambientales como lo es el flúor.

## **5.- CONCLUSIONES**

En el presente estudio se registró una relación entre la concentración de flúor en el agua de consumo y el nivel de exposición. Un porcentaje considerable de la población evaluada registró un consumo <50% de la IDR de calcio y de magnesio y un consumo >150% de la IDR de fósforo. Así mismo, dentro del presente estudio se encontró una relación entre la concentración de flúor en la orina de los participantes y el consumo de calcio, magnesio y fósforo.

## **6.- CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

## **7.- DECLARACIÓN DE FINANCIAMIENTO**

Esta investigación fue financiada por el fondo sectorial SS/IMSS/ISSTE-CONACyT-234310

## **8.- AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a los participantes del presente estudio, a sus padres, profesores, autoridades locales y demás personas que apoyaron para su realización.



## 9.- BIBLIOGRAFIA

1. Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gilman MW, Thomas Rattay LK, et al. Dietary Recommendations for Children and Adolescents: A Guide for Practitioners. *Pediatr.* 2006;117:2.
2. Rivas-Gutiérrez J, Huerta-Vega L. Fluorosis dental: metabolismo, distribución y absorción del fluoruro. *Revista de la Asociación Dental Mexicana. ADM* 2005;6:225-229.
3. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010;188:319-333.
4. Hernández-Ávila JE, González-Avilés L, Rosales-Mendoza E. Manual de usuario. SNUT Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos, México. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2003.
5. National Institute for occupational safety and Health (NIOSH). Fluoride in urine. 3<sup>th</sup> ed. Us Departament of health and human Services, Manual of analytical Methods; 1984:8308-18308-3.
6. Barber TE, Wallis G. Correction of urinary mercury concentration by specific gravity, osmolality and creatinine. *Journal of occupational medicine.* 1986;28(5):354-359.
7. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2013. <http://www.R-project.org/>.
8. Bourges HE, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población Mexicana. Bases Fisiológicas 1. México, DF: Editorial Panamericana. 2005. p. 372
9. Institute of Medicine (IOM). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus,

Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington (DC): National Academies Press (US). 1997. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109825/> doi: 10.17226/5776

10. Modificación a la Norma Oficial Mexicana: NOM-127-SSA, Salud Ambiental. Agua para Uso y Consumo Humano-Límites permisibles de Calidad y Tratamientos a que debe someterse el Agua para su Potabilización. México, D.F. Diario Oficial de la Federación.1996;CVIII(13):6.
11. Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R, Calderon J. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica*. 2007;23(4):5579–87.
12. Karimzade S, Aghaei M, Mahvi AH. Investigation of intelligence quotient in 9-12 years old children exposed to high and low-drinking water fluoride in West Azerbaijan Province, Iran. *Fluoride*. 2014;47:9–14.
13. Jiménez-Córdova MI, Cárdenas-González M, Aguilar-Madrid G, Sánchez-Peña LC, Barrera-Hernández A, Domínguez-Guerrero IA, et al. Evaluation of kidney injury biomarkers in an adult Mexican population environmentally exposed to fluoride and low arsenic levels. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;352(1):97-106.
14. Jarquín-Yáñez L, Mejía-Saavedra JJ, Molina-Frechero N, Gaona E, Rocha-Amador DO, López-Guzmán OD, et al. Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi. *Scientific World Journal*. 2015;647184. <https://doi.org/10.1155/2015/>
15. Norma Oficial Mexicana: NOM-041-SSAI, Bienes y Servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias. México, D.F. Diario Oficial de la Federación. 1995;CDXCVIII(18):52
16. Jarquin-Yáñez L, Alegría-Torres JA, Castillo CG, Mejía-Saavedra JJ. Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in Mexican children. *Arch Oral Biol*. 2018;96:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.010>

17. Escobar-García D, Mejía-Saavedra JJ, Jarquín-Yáñez L, Molina-Frechero N, Pozos-Guillén A. Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2016.
18. Aguilar-Díaz FC, De la Fuente-Hernández J, Cintra-Viveiro CA. Dental fluorosis, fluoride in urine, and nutritional status in adolescent students living in the rural areas of Guanajuato, Mexico. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry.* 2016.
19. Irigoyen-Camacho ME, García Pérez A, Mejía González A, Huizar Álvarez R. Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. *Sci Total Environ.* 2016;541:512–519
20. Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr. Oral Sci.* 2011;22:20–36.
21. Hernández-Ávila M, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Gómez-Acosta LM, Gaona-Pineda EB, et al. Informe final de resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Pub Mex.* 2016.
22. Gutiérrez-Cortez E, Rojas-Molina JI, Zambrano-Zaragoza M, Quintanar-Guerrero D, González-Reza R, Rojas-Molina A, et al. Effect of processing conditions on the production of nixtamalized corn flours by the traditional method. *CyTA-J Food.* 2013;11:46-53.
23. Fiorentino M, Landais E, Bastard G, Carriquiry A, Wieringa FT, Berger J. Nutrient intake is insufficient among senegalese urban school children and adolescents: results from two 24 h recalls in state primary schools in Dakar. *Nutrients.* 2016;8(10):E650.
24. Vivanco-Muñoz N, Reyes-Sánchez M, Lazcano E, Díaz R, Antúnez O, Clarck P. Physical activity is a prognostic factor for bone mineral density in Mexican children. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2012;69:40-45.

25. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific opinion on dietary reference values for calcium. *EFSA Journal*. 2015;13(5):4101.
26. Rivera-Dommarco J, López-Olmedo N, Aburto T, Pedraza-Zamora L, Sánchez-Pimienta T. Consumo de productos lácteos en población mexicana. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2014.
27. Flores M, Macías N, Rivera M, Barquera S, Hernández L, García-Guerra A, et al. Energy and nutrient intake among Mexican school-aged children, Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pub México*. 2009;50:540-550.
28. Castillo-Ruiz O, Velázquez G, Uresti-Marín RM, Mier N, Vázquez M, Ramírez JA. Estudio de los hábitos alimentarios de niños de 4-6 años de Reynosa, Tamaulipas, México. *CyTA-J Food*. 2012;10:5-11.
29. Martín-Jiménez JA, Consuegra-Moya B, Martín-Jiménez MT. Nutritional factors in the prevention of osteoporosis. *Nutr Hosp*. 2015;32(1):49-55.
30. Cosenza L, Pezzella V, Nocerino R, Di Costanzo M, Croruzzo A, Passariello A, et al. Calcium and vitamin D intakes in children: a randomized controlled trial. *BMC Pediatr*. 2013;13:86
31. Henwood MJ, Binkovitz L. Update on pediatric bone health. *J Am Osteopath Assoc* 2009;109:5-12.
32. Langsetmo L, Berger C, Kreiger N, Kovacs CS, Hanley DA, Jamal SA, et al. Calcium and vitamin D intake and mortality: results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;98(7):3010-3018.

33. Ryder KM, Shorr RI, Bush AJ, Kritchevsky SB, Harris T, Stone K, et al. Magnesium intake from food and supplements is associated with bone mineral density in healthy older white subjects. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53:1875-1880.
34. Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, De Bono S, Ginty F, Goldberg GR. Nutrition and bone growth and development. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2006;65:348-60
35. Chinoy N, Mehta D, Jhala Devendrasinh. Beneficial effects of a protein rich diet on fluoride induced free radical toxicity in the liver of male mice. *Fluoride.* 2005;38.
36. Godfrey S, Labhasetwar PK, Datta S. Resultados de un programa integrado de mitigación de fluorosis en una población controlada de India. *Tecnología y ciencias del agua.* 2010;1(1):35-45.
37. Macías-Tomei C, Palacios C, Mariño Elizondo M, Carías D, Noguera D, Chávez Pérez JF. Valores de referencia de calcio, vitamina D, fósforo, magnesio y flúor para la población venezolana. *Archivos latinoamericanos de nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.* 2013;63(4)

Figura 1. Prevalencia del consumo de micronutrientes <50%, entre 50% y 100% y >150% tomando como 100% la ingesta diaria recomendada por el Instituto de Medicina (IOM)<sup>8,9</sup>

## TABLAS

Tabla 1. Características de la población de estudio

Sexo <i>n</i> (%)	masculino	65 (54)
	femenino	56 (46)
Bebe y cocina con agua de grifo <i>n</i> (%)		87 (72)
Cocina con agua de grifo y bebe agua embotellada <i>n</i> (%)		26 (21)
Bebe y cocina con agua embotellada <i>n</i> (%)		8 (7)
<sup>a</sup> Edad (años)		10.31 ± 2.14
<sup>a</sup> Flúor en agua (mg/L)	Grifo	2.36 ± 0.02
	Embotellada	0.14 ± 0.04
<sup>a</sup> Flúor en orina (mg/L)		2.05 ± 0.62

<sup>a</sup>Promedio ± Desviación Estándar

Tabla 2. Consumo de micronutrientes (mg/día) de acuerdo al grupo de edad.

Edad (años)	<i>n</i> (%)	IDR	media ± D.E	<i>P</i> 25	<i>P</i> 50	<i>P</i> 75
calcio						
7 a 8	29 (24)	800	731.68 ± 327.38	390.00	900.00	997.82
9 a 13	82 (68)	1300	936.34 ± 316.69	648.01	998.87	1188.82
14 a 15	10 (8)	1300	860.70 ± 328.81	649.00	649.27	1166.98
magnesio						
7 a 8	29 (24)	130	171.44 ± 53.94	150.92	185.00	187.00
9 a 13	82 (68)	240	305.74 ± 102.59	282.35	329.61	370.72
14 a 15	10 (8)	360-410	361.00 ± 163.12	221.89	370.24	451.75
fósforo						
7 a 8	29 (24)	500	643.06 ± 168.44	500.00	589.00	790.00
9 a 13	82 (68)	1250	1404.76 ± 476.72	1049.53	1222.24	1877.90
14 a 15	10 (8)	1250	1005.41 ± 366.96	778.50	1066.55	1073.56

D.E= Desviación Estándar; IDR=Ingesta diaria recomendada por el Instituto de Medicina (IOM)<sup>8,9</sup>



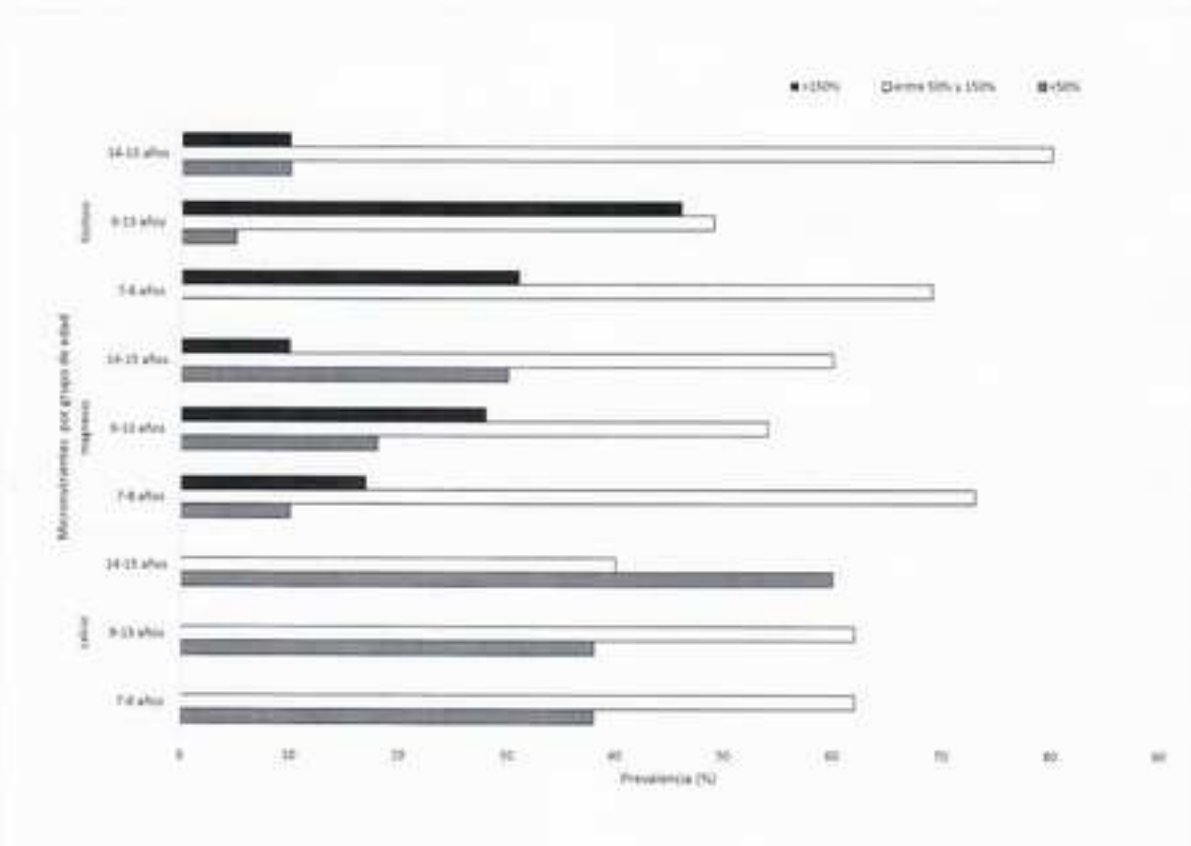
Tabla 3. Concentración de flúor en orina de acuerdo al origen del agua de consumo y a la ingesta de los micronutrientes evaluados.

Variable		Flúor en orina (mg/L) media ± D.E.
Origen del agua de consumo	Grifo (bebe y cocina)	*2.26 ± 0.53
	Grifo (cocina) y embotellada (bebe)	*1.63 ± 0.53
	embotellada (bebe y cocina)	*1.13 ± 0.10
IDR de calcio	<50%	*2.20 ± 0.70
	entre 50% y 100%	1.96 ± 0.55
	>150%	-
IDR de magnesio	<50%	*2.58 ± 0.69
	entre 50% y 100%	1.96 ± 0.50
	>150%	1.90 ± 0.67
IDR de fósforo	<50%	1.82 ± 0.13
	entre 50% y 100%	1.82 ± 0.54
	>150%	*2.43 ± 0.59

D.E.= Desviación Estándar; IDR= Ingesta Diaria Recomendada por el Instituto de Medicina (IOM)<sup>8,9</sup>; \* $p < 0.05$

# Figura

[Click here to download high resolution image](#)



**PROGRAMA DE COMUNICACIÓN DE RIESGOS.- Daños a la salud por consumo de flúor a través del agua**

La comunicación de riesgos (CR) es una estrategia empleada para acercarse a grupos vulnerables con el fin de proteger su salud y contribuir a la disminución de la morbilidad y mortalidad. En el presente proyecto de tesis se llevó a cabo un programa de CR para proteger la salud de la población de estudio y disminuir la presencia de enfermedades fluoróticas.

La metodología empleada correspondió al programa de CR orientado a la salud propuesto por Baker en 1990, el cual consta de ocho pasos: 1) **evaluación del riesgo para la salud**; 2) **establecimiento de metas**; 3) **evaluación de las audiencias blanco**; 4) **evaluación del contexto sociocultural**; 5) **elección del enfoque**; 6) **construcción de las comunicaciones**; 7) **puesta en operación del programa sobre riesgo** y 8) **evaluación de los efectos**.

La **evaluación del riesgo** para la salud se llevó a cabo en cuatro etapas las cuales estuvieron implícitas durante el presente proyecto de tesis:

En la primera etapa se identificaron los peligros en la población de estudio tomando en cuenta entre otra información: el límite permitido de flúor en el agua de consumo propuesto por la NOM-127 de 1.5 mg/L, el propuesto por la NOM-201 de 0.7 mg/L para el agua de consumo embotellada y el nivel de flúor en orina sugerido por la OMS de 1.0 mg/L. Se tomaron en cuenta además reportes en la literatura que evidencian daños neurológicos en poblaciones con concentraciones de flúor en agua de consumo >3mg/L y presencia de enfermedades fluoróticas severas como fluorosis esquelética, fracturas óseas, trastornos gastrointestinales y alteraciones renales en poblaciones con concentraciones de flúor en agua >4mg/L. Posteriormente se realizó la cuantificación de flúor en el agua de consumo y

las muestras de orina de la población de estudio para comparar los resultados con los datos identificados en la literatura.

En los resultados se puede observar que tanto la concentración de flúor en el agua de grifo como en las muestras de orina se encuentra por arriba de los límites sugeridos, así mismo existen concentraciones de flúor en el agua de consumo que de acuerdo a los estudios reportados sugieren daño neurológico, trastornos gastrointestinales y renales, fracturas óseas y fluorosis esquelética en la población de estudio (tabla 1).

Tabla 1. Monitoreo ambiental y biológico de flúor (mg/L) como parte del programa de comunicación de riesgos en las comunidades de estudio

Zona de residencia	Agua de consumo media ± DE		Flúor en orina media ± DE (min-max)
	<sup>a)</sup> Grifo	<sup>b)</sup> Embotellada	
Ojo Caliente	2.36 ± 0.02	0.14 ± 0.04	2.05 ± 0.62 (0.9-4.0)
La Reforma	4.56 ± 0.07	0.47 ± 0.05	2.99 ± 0.99 (1.2-5.5)

DE=Desviación estándar

Valores de referencia: <sup>a)</sup>NOM-127: 1.5mgF/L agua de consumo; <sup>b)</sup>NOM-201: 0.7mgF/L agua embotellada; <sup>c)</sup>OMS: 1.0mgF/L orina.

En la segunda etapa se determinó la relación dosis-respuesta tomando en cuenta los datos de la ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades) de dosis de referencia (RfD) y dosis máxima en la cual no se ha observado efecto adverso (NOAEL) los cuales correspondieron a 0.05 mg/kg/día para el efecto de fluorosis dental.

Durante la tercera etapa se realizó la evaluación de la exposición calculando la dosis externa del contaminante recibida por la población, la cual correspondió a 0.10 mg/Kg/día para la

comunidad de Ojo Caliente y de 0.21 mg/Kg/día para la comunidad de La Reforma. El cálculo se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$\text{Dosis de exposición estimada (mg/Kg/día)} = \frac{\text{Conc. (mg/L)} * \text{TI (L/día)} * \text{FE}}{\text{PC (Kg)}}$$

Donde:

Conc.: Concentración del contaminante en el agua de consumo

PC: Peso corporal (media en los niños del presente estudio)

TI: Tasa de ingestión de agua en niños (en promedio: 1.5 L/día)

FE: Factor de exposición (absorción de flúor por vía oral: 0.97)

$$\text{Dosis de exposición } \underline{\text{Ojo Caliente}} \text{ (mg/Kg/día)} = \frac{2.36 \text{ mg/L} * 1.5 \text{ L/día} * 0.97}{35 \text{ Kg}} = 0.10 \text{ mg/Kg/día}$$

$$\text{Dosis de exposición } \underline{\text{La Reforma}} \text{ (mg/Kg/día)} = \frac{4.56 \text{ mg/L} * 1.5 \text{ L/día} * 0.97}{31 \text{ Kg}} = 0.21 \text{ mg/Kg/día}$$

Finalmente, en la cuarta etapa se realizó la caracterización del riesgo en donde se integró la información obtenida en la identificación de los peligros, la relación dosis-respuesta y la evaluación de la exposición, con el objeto de predecir el riesgo de padecer los efectos adversos del flúor en la población expuesta y facilitar la toma de decisiones tendentes a reducir dichos riesgos a niveles tolerables. Los resultados obtenidos manifestaron que la salud de la población evaluada está en riesgo, la concentración de flúor registrada en el agua de consumo se encontró por arriba de los límites permitidos y las dosis de exposición

a flúor en las comunidades evaluadas estuvieron por encima de la RfD propuesta por la ATSDR para el efecto de fluorosis dental, con un factor de riesgo importante. El cual fue calculado de la siguiente manera:

Factor de Riesgo Ojo Caliente= Dosis de exposición/ Rfd 0.21 mg/Kg/día / 0.05 mg/Kg/día=

\*2.0

Factor de Riesgo La Reforma=

Dosis de exposición/ Rfd 0.10 mg/Kg/día / 0.05 mg/Kg/día=

\*4.2

\*Valor de referencia: 1

Una vez realizada la evaluación del riesgo se llevó a cabo el **establecimiento de metas** correspondiente al programa de CR, en donde se plantearon los siguientes objetivos:

- Concientizar a la población de estudio sobre el riesgo a la salud que implica el consumir agua de la llave.
- Fomentar en la población de estudio el uso del agua de garrafón tanto para beber como para cocinar

Con el fin de llevar a cabo los objetivos planteados en el programa de CR se llevó a cabo la **evaluación de las audiencias blanco**, cuyo proceso inició durante la primera etapa del proyecto de tesis. Se llevaron a cabo reuniones con las autoridades competentes de cada comunidad como presidentes municipales, directores de las escuelas primarias, maestros, padres de familia y niños participantes, con el fin de darles a conocer los detalles del

proyecto e invitarlos a participar. Se conformó la población de estudio y a través de un cuestionario dirigido a los padres de familia se obtuvo información acerca del origen del agua de consumo y la percepción del riesgo por flúor, cuyos resultados se resumen en las figuras 1 y 2.

En la comunidad de Ojo Caliente el 63% de la población de estudio reportó utilizar para beber el agua de llave y el 37% el agua purificada. El 95% cocina con agua de la llave y el resto lo hace con agua purificada. El 63% de la población bebe y cocina con agua de la llave, el 5% con agua purificada y el 32% bebe agua purificada y cocina con agua de la llave, no registrándose el consumo de agua de la llave para beber y agua purificada para cocinar. En cuanto al conocimiento del riesgo a la salud ocasionado por el flúor, únicamente el 35% de la población evaluada externó que lo conocía (figura 1).

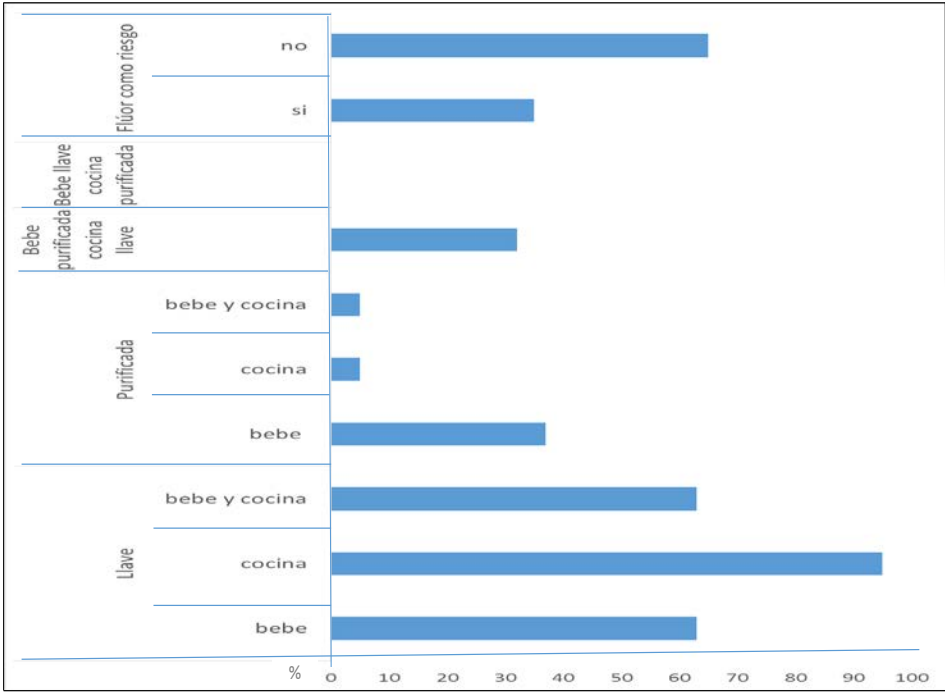


Figura 1. Resultados del origen del agua de consumo y la percepción del riesgo por consumo de flúor como parte del programa de comunicación de riesgos en la población de estudio de Ojo Caliente



En el caso de la comunidad de La Reforma el 78% de los niños participantes reportaron beber agua de la llave y el 22% agua purificada. El 100% registró cocinar con agua de la llave. El 78% reportó beber y cocinar con agua de la llave y el resto (22%) reportó beber agua purificada y cocinar con agua de llave, no hubo registros de beber y cocinar con agua purificada, ni de beber agua de la llave y cocinar con agua purificada. En relación a si conocían o no el riesgo a la salud que causa el flúor, el 88% de la población de estudio no lo sabía (Figura 2)

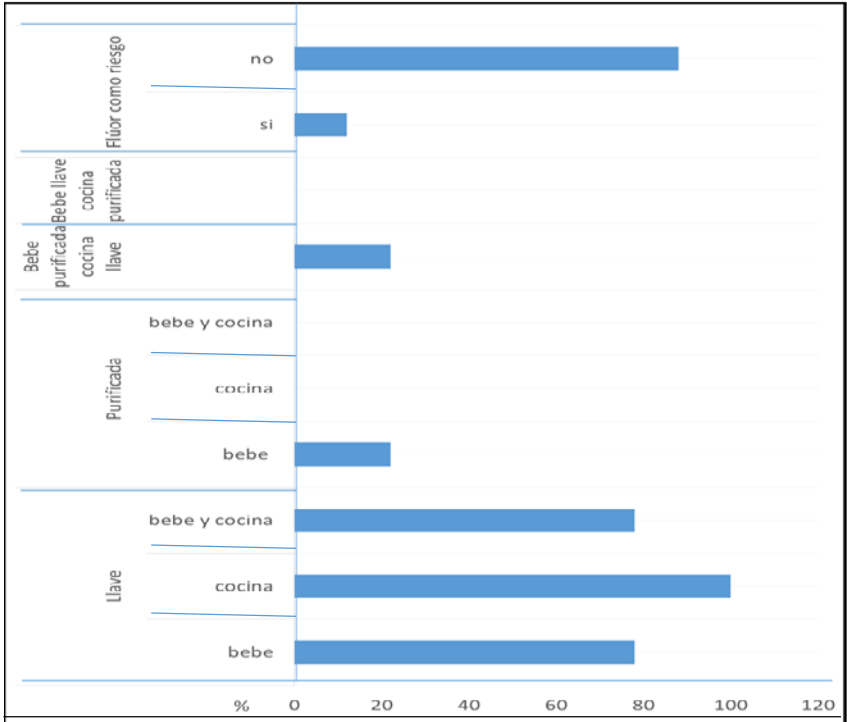


Figura 2. Resultados del origen del agua de consumo y la percepción del riesgo por consumo de flúor como parte del programa de comunicación de riesgos en la población de estudio de La Reforma

Dentro de la **evaluación del contexto sociocultural** el cual incluye la vulnerabilidad de la población frente a un riesgo asociado a aspectos extrínsecos y/o sociodemográficos, se tomaron en cuenta el grado de marginación, la ubicación geográfica, la concentración de flúor en agua, la prevalencia de fluorosis dental y enfermedades óseas, la susceptibilidad genética y el estado nutricional (únicamente frecuencia de consumo) de la población de estudio, cuyos resultados se fueron obteniendo en el transcurso del proyecto de tesis, sin embargo sólo se seleccionó uno de ellos para el programa de CR.

La **elección del enfoque** que se dio al programa de CR estuvo dirigida hacia el uso del agua de grifo y el daño a la salud que genera, ya que de acuerdo a la evaluación de la audiencia blanco un importante porcentaje utiliza el agua de grifo para beber y cocinar y de acuerdo a la evaluación del contexto sociocultural el valor de la concentración de flúor en el agua de grifo de la población de estudio es un factor importante.

En la **construcción de las comunicaciones** se mantuvo informada a la población de estudio en todo momento, proporcionado resultados y recomendaciones en cada etapa del presente proyecto de tesis, procurando mantener el interés, la colaboración y la participación activa. Atendiendo experiencias, opiniones y dudas, haciendo hincapié en el riesgo a la salud que implica el uso del agua de grifo para beber y/o cocinar y la importancia del uso del agua de garrafón. Los canales de comunicación empleados consistieron en presentaciones Power Point, uso de rotafolios, carteles, imágenes y juegos.

La **puesta en operación del programa de CR** quedó implícita en el desarrollo del presente proyecto de tesis y consistió en lo siguiente:

### Autoridades municipales

Se llevó a cabo una primera reunión con el presidente municipal y cabildo en cada una de las comunidades de estudio con la finalidad de presentar el proyecto y los responsables del mismo. Se proyectó una presentación Power Point en la cual se incluyó el nombre del proyecto y patrocinador, así como una breve introducción acerca del flúor: donde se encuentra, como se incorpora al organismo, cuál es su mecanismo de acción, daños a la salud que ocasiona, factores de riesgo, etc. Se expusieron los objetivos del proyecto, la hipótesis y la metodología a seguir; haciendo hincapié en que el estudio es gratuito, anónimo y voluntario y se encuentra aprobado por el comité de bioética de la facultad de medicina de la UASLP. Se entregó a la población de estudio por escrito esta información, así como una copia del consentimiento informado y la carta de aprobación del proyecto.

Se estableció una segunda reunión con el presidente municipal y su cabildo para consolidar el apoyo recibido para el traslado de los participantes a la Unidad de Investigaciones Reumatológicas, A.C. del Hospital Central "Ignacio Morones Prieto" ubicado en la ciudad de San Luis Potosí, para la evaluación reumatológica realizada en la segunda etapa del proyecto. En esta ocasión se entregó un breve informe de la actividad en el que se incluyó: una introducción sobre las enfermedades óseas asociadas al consumo de flúor, la importancia del examen reumatológico, el objetivo de realizar dicho examen y en que consiste. Así mismo se entregó un cronograma que incluía el nombre de los niños y padres de familia que asistirían cada día, el punto y la hora de salida y llegada.

En la tercera reunión con el presidente municipal y cabildo de cada comunidad participante, se expusieron de manera oral y escrita los resultados obtenidos en el monitoreo ambiental y biológico, la evaluación reumatológica y dental y la susceptibilidad genética, a través de una presentación Power Point y un informe escrito en los que se incluyeron gráficas y fotografías. En esta reunión se estableció una interacción con las autoridades en donde se expusieron recomendaciones y propuestas de solución.

#### Autoridades escolares y Padres de familia y/o tutores

Se estableció una reunión con las autoridades escolares de cada comunidad participante (director, maestros y comité de padres de familia) con la finalidad de presentarles el proyecto y solicitarles su participación en el mismo a través de una presentación Power Point que incluía: nombre del proyecto, patrocinador y responsables, una breve introducción de la problemática del flúor en las comunidades de estudio: que es, donde se encuentra, como se incorpora al organismo, efectos que causa y factores de riesgo, entre otras cosas. Se explicaron los objetivos del proyecto y la metodología a seguir, recalcando que el estudio es gratuito, anónimo y voluntario y se encuentra aprobado por el comité de bioética de la facultad de medicina de la UASLP.

Una vez que las autoridades escolares tuvieron la reunión con los padres de familia y/o tutores y les comunicaron el mensaje, se estableció una segunda reunión en la que se incorporaron estos últimos. En esta reunión nuevamente se expuso la presentación Power Point que se presentó en la reunión con las autoridades escolares. Resolviendo dudas relacionadas tanto con la metodología a seguir en el proyecto como con el flúor, ya que un

alto porcentaje de la población desconocía el daño a la salud que genera (88% en La Reforma y 65% en Ojo Caliente), se mantuvo una interacción con la audiencia en donde se compartieron experiencias y opiniones.

Durante el proceso de extracción sanguínea de los niños participantes para la identificación de la susceptibilidad genética como parte del presente proyecto de tesis, se contó con la asistencia de los padres de familia y/o tutores, los cuales recibieron una plática breve acerca de la relación de la susceptibilidad genética y el consumo de flúor a través del agua de consumo mientras esperaban su turno; de manera que la población fuera consciente de la importancia del examen. Así mismo, durante la reunión previa al traslado de los participantes para la evaluación reumatológica a la ciudad de San Luis Potosí, se llevó a cabo una exposición breve en Power Point en donde se incluyó, además de la metodología a seguir y el cronograma con la cita de cada niño, una plática acerca de las enfermedades óseas asociadas al consumo de flúor, recalcando la importancia de sustituir el agua de la llave por agua de garrafón con el fin de evitar estas enfermedades en sus hijos.

Se llevó a cabo la reunión con las autoridades escolares y padres de familia y/o tutores de los niños participantes de cada comunidad para la entrega de resultados del proyecto, en donde se recalcó nuevamente la importancia de utilizar el agua de garrafón tanto para beber como para cocinar, con la finalidad de protegerse de los efectos tóxicos del flúor. Durante esta reunión se solicitó la participación de la audiencia para aportar medidas que se deben tomar para evitar daños a la salud ocasionados por el flúor y para conocer la nueva percepción de los padres de familia y/o tutores acerca de la problemática. Se empleó una presentación Power Point para el caso de la entrega de resultados en forma general, un

informe escrito para la entrega de resultados en forma particular y papel bond y plumones para realizar la lluvia de ideas acerca de las medidas sugeridas por los padres de familia para evitar los efectos del flúor en sus hijos.

### Niños participantes

En el caso de los niños participantes se llevaron a cabo actividades dinámicas, utilizando recursos didácticos para que los niños pudieran interpretar el mensaje de manera fácil y clara. Participaron en el llenado de los cuestionarios acerca de la exposición y percepción del riesgo a la salud por flúor, acudieron a sesiones en las cuales se les proporcionó información acerca del flúor: que es, en donde se encuentra, como se incorpora al organismo, cuáles son los daños a la salud que provoca y cuál es la manera de evitarlos. Se estableció un cronograma previo en donde los niños fueron citados en la escuela primaria en un horario establecido. Se realizaron dinámicas en las cuales se recalcó la toxicidad del flúor y la manera de contrarrestar sus efectos haciendo uso del pintarrón, carteles, rotafolios e incluso cuentos relacionados con el tema el cual fue expuesto a través de una presentación Power Point. Para estas actividades se contó con el apoyo de los estudiantes de la licenciatura en Ciencias Ambientales y Salud (CAyS) de la Facultad de Medicina de la UASLP.

Con el fin de verificar la **efectividad del programa de CR** se llevó a cabo un monitoreo biológico en los niños participantes para comparar los niveles de exposición a flúor al comienzo y al final del programa. Se aplicaron cuestionarios acerca de la nueva percepción que tienen acerca del flúor para conocer si ésta fue diferente a la que tenían al comenzar el

programa y como actividad adicional los niños plasmaron a través de un dibujo y un cuestionario esta nueva percepción, cuyos resultados son expresados en las tablas 2 y 3 en donde se puede observar un aumento en la percepción del riesgo por flúor en los niños participantes. Para estas actividades se emplearon vasos de polipropileno nuevos, equipo y reactivos necesarios para la cuantificación de flúor y cuestionarios previamente elaborados, lápices, sacapuntas, hojas de papel y colores.

En relación a los resultados del origen del agua de consumo en las tablas 2 y 3 se puede observar que hubo una disminución en ambas comunidades del número de participantes que utilizaron el agua de la llave para beber y/o cocinar y un aumento del uso del agua purificada, con respecto a los resultados anteriores al programa de CR.

Tabla 2. Resultados del origen del agua de consumo y la percepción del riesgo por flúor antes y después del programa de comunicación de riesgos en Ojo Caliente

		Antes (n=121)	Después (n=121)
Agua de la llave (%)	bebe	63	47
	cocina	95	83
	bebe y cocina	63	47
Agua purificada (%)	bebe	37	53
	cocina	5	17
	bebe y cocina	5	17
Bebe agua purificada y cocina con agua de la llave (%)		32	36
Bebe agua de la llave y cocina con agua purificada (%)		0	0
Conocimiento del flúor (%)	si	35	74
	no	65	26

Tabla 3. Resultados del origen del agua de consumo y la percepción del riesgo por flúor antes y después del programa de comunicación de riesgos en La Reforma

		Antes (n=120)	Después (n=120)
Agua de la llave (%)	bebe	78	32
	cocina	100	66
	bebe y cocina	78	32
Agua purificada (%)	bebe	22	68
	cocina	0	34
	bebe y cocina	0	34
Bebe agua purificada y cocina con agua de la llave (%)		22	34
Bebe agua de la llave y cocina con agua purificada (%)		0	0
Conocimiento del flúor (%)	si	12	80
	no	88	20

En cuanto a la concentración de flúor en orina, se obtuvo una diferencia significativa entre la media de flúor obtenida al comienzo y al final del programa en ambas comunidades, ya que a pesar de que las concentraciones de flúor en orina se encontraron por arriba de los niveles recomendados hubo una disminución del valor después del programa de CR (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de flúor en la orina de los participantes antes y después del programa de comunicación de riesgos

Flúor en orina (mg/L) media $\pm$ D.E.		
Zona de residencia	antes	después
Ojo Caliente	2.69 $\pm$ 0.98*	2.05 $\pm$ 0.62*
La Reforma	3.29 $\pm$ 1.33*	2.99 $\pm$ 0.99*

DE= Desviación estándar

\*p < 0.05



El presente programa de CR tuvo como objetivo concientizar a la población de estudio sobre el riesgo a la salud que implica el consumir agua de la llave y fomentar el uso del agua de garrafón tanto para beber como para cocinar. Como se pudo observar, estos objetivos fueron cumplidos satisfactoriamente, al lograr una disminución en el uso del agua de la llave para beber y/o cocinar y hacer del conocimiento de la población, el riesgo a la salud que implica el consumir flúor a través del agua de consumo. Sin embargo, es importante recalcar que parte de la población aún no es consciente de esta información, por lo que es necesario continuar con la intervención. Además es necesario reevaluar a la población consciente de los efectos del flúor con el afán de conocer si con el transcurso del tiempo el uso del agua de la llave sigue disminuido.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

Durante el presente trabajo se evaluaron dos escenarios de riesgo por agua de consumo contaminada con flúor: La comunidad de Ojo Caliente en la parte centro sur del estado de San Luis Potosí con una concentración de flúor en el agua del grifo de 2.36 mg/L y la comunidad de La Reforma en la parte norte del estado con una concentración de 4.56 mgF/L, siendo mayor el consumo de este tipo de agua con respecto al agua embotellada, la cual se encontró en ambas comunidades dentro del límite permitido por la NOM-201 de 0.7 mgF/L (0.14 mg/L y 0.47 mg/L respectivamente) (NOM-201).

Las altas concentraciones de flúor en el agua del grifo (más de 1.5 mgF/L de acuerdo a la NOM-127) resultaron en dosis altas de exposición estimada (0.21 mg/Kg/día en Ojo Caliente y 0.10 mg/Kg/día en La Reforma) que revelaron factores de riesgo importantes en ambas comunidades para el efecto de fluorosis dental (2.0 en Ojo Caliente y 4.2 en La Reforma).

Sin embargo, como es sabido el flúor no solo se acumula en los tejidos dentarios, sino que se puede almacenar en otros tejidos como los huesos, el cerebro, los testículos y el riñón entre otros, provocando daños severos (Hernández-Castro et al., 2010). Por lo que surgió la necesidad de evaluar no solo el nivel de exposición a flúor acompañado con fluorosis dental, sino también la evaluación del componente óseo (DMO) y otros factores relacionados con la absorción del flúor y sus efectos, tales como la edad, la susceptibilidad genética y el estado nutricional .

Dentro de los efectos en salud del flúor, en la población de estudio se registró fluorosis dental con una prevalencia del 100% en ambas comunidades y alteración en la DMO de los

participantes, de la cual se estableció únicamente la presencia de DMO baja (17 casos en Ojo Caliente y 6 en La Reforma).

Es importante mencionar que la información acerca del límite a partir del cual se define el término de DMO baja y osteoporosis en niños, es controversial; ya que se considera la referencia establecida por la ISCD para poblaciones menores de 20 años, la cual no está adecuada a población mexicana (Tamayo et al., 2009).

Además, es necesario considerar que los valores de DMO son diferentes entre las poblaciones, tal es el caso del estudio de Liu y colaboradores en donde se registró una diferencia significativa entre el valor de la DMO de la población china v/s la americana (Liu et al., 2017), considerando otros factores que podrían contribuir a esa diferencia tales como la constitución física y los hábitos.

Tamayo y colaboradores llevaron a cabo un estudio en población mexicana, encontrando que las bases de datos de referencia utilizadas para evaluar la DMO, subestimaron significativamente los casos de DMO anormal, sugiriendo el uso de las tablas de elaboración propia (Tamayo et al., 2009). Por lo que a pesar de que en México se ha establecido el uso de las bases de referencia de la ISCD, existe la propuesta de crear bases de referencia adecuadas a población mexicana.

En base a lo anterior, en el presente trabajo los valores de DMO fueron interpretados en valores Z que recomienda la ISCD, por lo que nuestros resultados podrían estar subestimados. Además, los valores de la DMO normal presentaron valores Z que se desconoce si son altos, ya que no hay datos disponibles de la ISCD para saber hasta qué

valor deja de ser normal, incluso en el presente trabajo se registraron valores Z de 1.5 a 1.8, cuyos valores en adultos están relacionados con el riesgo de cáncer y osteoartritis (Campbell et al., 2012).

En lo que respecta a la relación entre los efectos fluoróticos evaluados y el nivel de exposición a flúor, en ambas comunidades los niños con los grados más severos de fluorosis dental tuvieron las mayores concentraciones de flúor en orina, con respecto a los que tuvieron grados menores de fluorosis dental.

En el caso de la comunidad de La Reforma, los niños con los grados de fluorosis dental TF8 y TF9 presentaron concentraciones de flúor en orina de 3.75 mg/L, en tanto que los niños con los grados TF4 y TF5 presentaron concentraciones de 2.66 mgF/L, existiendo diferencias significativas entre ellas.

Dentro de la relación existente entre el nivel de exposición y la fluorosis dental, la edad fue un factor importante que conforme fue aumentado, determinó un mayor grado de fluorosis dental y nivel de exposición en ambas comunidades. Tal es el caso de los niños de Ojo Caliente, en donde los grados de fluorosis dental TF6 a TF9 prevalecieron en el 17% de los niños de 6-7 años y en el 70% de los mayores de 12 años y el caso de La Reforma, en donde a la edad de 6 a 7 años la prevalencia de las concentraciones de flúor en orina más altas (más de 4mgF/L) fue menor (5.7%) con respecto al grupo de edad de 8 a 12 años (35%).

En cuanto a la asociación de la DMO y el nivel de exposición a flúor se observó una menor concentración de flúor en la orina de los niños que presentaron DMO baja con respecto a los que presentaron DMO normal. Para fines estadísticos, esta asociación no se estableció

por comunidad y se realizó únicamente con la DMO de la región lumbar, esto en virtud de los pocos casos registrados de DMO baja (23 de 241 casos entre ambas comunidades) y de los pocos casos registrados en la región de cadera (1 caso en Ojo Caliente y 1 caso en La Reforma).

Los resultados de asociación entre la DMO y el nivel de exposición son mostrados en la tabla 5 y se puede observar que el nivel de exposición es alto en ambos casos, sin embargo en virtud de la asociación del flúor con el aumento de DMO (De Luis Román et al., 2004), el patrón establecido en los resultados es acorde. No obstante, hubiera sido mejor haber realizado la comparación de la concentración de flúor en orina entre casos de DMO baja y normal v/s DMO alta, pero en el presente estudio no se registraron casos de esta última.

Tabla 5. Concentración de flúor en orina de acuerdo al diagnóstico de la densidad mineral ósea lumbar en las comunidades de estudio.

<sup>a)</sup> DMO lumbar	Fluor en orina (mg/L) media ± DE
Normal	*2.56 ± 0.96
Baja	2.12 ± 0.78

DMO= Densidad mineral ósea; DE= Desviación estándar

<sup>a)</sup>De acuerdo a la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica

\*p< 0.05

En el presente trabajo se evaluó la presencia de tres polimorfismos asociados a alteraciones óseas y dentarias en poblaciones de riesgo por contaminación de flúor en el agua de consumo. Sin embargo, la prevalencia de dos de ellos: el rs 2234693 y el rs 1256049 de los genes receptores estrogénicos, fue nula en la población de estudio. En tanto que el

polimorfismo rs 412777 del gen COL1A2, fue encontrado en el 41.7% de la población evaluada (230 participantes entre ambas comunidades), manteniendo la misma prevalencia en la comunidad de La Reforma (47.5%) durante los dos estudios realizados en el presente trabajo en distintos tiempos y con diferente tamaño de muestra (80 v/s 119).

Con respecto a ello, se pudo observar que al aumentar el tamaño de la muestra entre un estudio y otro (80 v/s 119) y evitar incluir en el análisis de riesgo el nivel de exposición, considerando que no existieron diferencias significativas del nivel de exposición entre los genotipos (A/A  $2.51 \pm 0.96$  mgF/L, A/C  $2.7 \pm 0.97$  mgF/L, C/C  $2.3 \pm 0.83$  0.18 mgF/L), se encontró un OR=7.10 (3.96-12.70) para los niños que llevaron el polimorfismo independientemente de que este fuera homocigoto o heterocigoto de presentar fluorosis dental más severa, con respecto a los niños que no lo llevaron.

En cuanto a la relación entre el polimorfismo evaluado en el gen COL1A2 y la DMO se pudo observar que de los 23 casos de DMO baja reportados, solo 22 contaron con el análisis para la identificación del polimorfismo, de los cuales 10 presentaron el polimorfismo (7 casos con A/C y 3 casos con C/C) y 12 no lo presentaron, lo cual significa que no hubo relación entre ellos (datos no mostrados). Sin embargo, existen reportes de que las mutaciones en el gen COL1A2 están ligadas a un amplio espectro de enfermedades óseas, entre ellas la osteoporosis la cual implica una disminución de la DMO (Dagleish, 1997; Kurt-Sirin et al., 2014), por lo que probablemente es otro rs el que está relacionado y no el rs 412777 que evaluamos en el presente estudio.

En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación del estado nutricional y el consumo de micronutrientes (calcio, magnesio y fósforo) con el fin de asociarlos a los efectos en salud evaluados (fluorosis dental y DMO baja). En el caso del consumo de los micronutrientes se aplicó un cuestionario de frecuencia de consumo, el cual abarcó varios tipos de micronutrientes y a los macronutrientes. Sin embargo, solo se tomaron en cuenta el consumo de calcio, magnesio y fósforo por su mayor asociación con los tejidos involucrados (Gómez et al., 2002; López et al., 2006; Vieira et al., 2005)

Se registraron casos de bajo peso, desnutrición moderada y desnutrición severa. Así como una prevalencia importante de casos de consumo de calcio y de magnesio <50% de la ingesta diaria recomendada (IDR) y de casos de consumo de fósforo >150%, lo cual refleja la importancia del diseño del programa nutricional derivado de los resultados de la presente tesis. Para lo cual se requiere su pronta aplicación en la población de estudio.

De manera general, los casos de bajo peso, desnutrición moderada y desnutrición severa estuvieron relacionados con los valores de DMO en ambas comunidades, siendo el valor Z de los niños con desnutrición severa, el único que representó DMO baja con respecto a las otras condiciones nutricionales (eutróficos, bajo peso y desnutrición moderada) con un valor Z de  $-2.30 \pm 0.61$ . Lo cual refleja la importancia del estado nutricional dentro de la adquisición de la DMO durante la etapa infantil.

En el caso de la fluorosis dental, la asociación con el estado nutricional no fue significativa probablemente por su asociación con el nivel de exposición y debido al número pequeño de casos de desnutrición severa (9 casos de 241). Misma razón que podría explicar la falta



de asociación entre el estado nutricional y el nivel de exposición (Datos no mostrados en este trabajo).

En lo que respecta a la asociación entre el consumo de calcio, fósforo y magnesio y el nivel de exposición se pudo observar que en la comunidad de Ojo Caliente los niños que presentaron un consumo <50% de la IDR de calcio tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo mayor ( $2.20 \pm 0.70$  v/s  $1.96 \pm 0.55$  mg/L) misma situación en el caso del magnesio ( $2.58 \pm 0.69$  v/s  $1.96 \pm 0.50$  y  $1.90 \pm 0.67$  mg/L) y los niños que presentaron un consumo >150% de la IDR de fósforo tuvieron una concentración mayor de flúor en orina con respecto a los que tuvieron un consumo menor ( $2.43 \pm 0.59$  v/s  $1.82 \pm 0.54$  y  $1.82 \pm 0.13$  mg/L). Lo cual refleja la participación de estos micronutrientes en la absorción del flúor en el organismo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación señalan la necesidad de sustituir el consumo del agua del grifo por el del agua embotellada, con el fin de evitar daños a la salud, ya que a pesar de que el programa de comunicación de riesgos implementado durante el desarrollo de la presente tesis reflejó una importante disminución del uso del agua de grifo y un menor nivel de exposición, al final del programa los valores siguieron siendo altos.

Así mismo, es importante considerar que las comunidades de estudio se encuentran vulnerables a los efectos del flúor en virtud del polimorfismo registrado, el bajo consumo de calcio y magnesio y el alto consumo de fósforo. Por lo que se sugiere identificar estos factores de riesgo en otras comunidades con problemas de hidrofluorosis endémica.

En el presente estudio, se evaluaron la fluorosis dental y la DMO como principales efectos en salud del flúor. Sin embargo, se sugiere realizar la evaluación de otros efectos, tales como problemas renales, condiciones hormonales y erupción dental entre otros. Esto tanto en las poblaciones evaluadas, como en otras comunidades que compartan escenarios de riesgo similares.

Los casos de fluorosis dental, DMO baja, desnutrición, bajo consumo de calcio y magnesio y alto consumo de fósforo registrados en el presente estudio, son condiciones en salud que requieren atención, ya que podrían incrementarse o ser la causa de otras patologías más severas, por lo que se sugiere reevaluar estas condiciones en la población de estudio para confirmar los resultados a través de métodos más pertinentes en el caso de que se requiera.

## REFERENCIAS

1. Norma Oficial Mexicana: NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. Diario oficial de la Federación
2. Hernández-Castro B, Vigna-Pérez M, Doníz-Padilla L, Ortiz- Pérez MD, Jiménez-Capdeville E, González-Amaro R, et al. (2010). Effect of fluoride exposure on different immune parameters in humans. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 1-9 doi:10.3109/08923973.2010.491081.
3. Tamayo J, Díaz R, Lazcano-Ponce E, et al. Reference values for areal bone mineral density among a healthy Mexican population. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 1:S56-S83
4. Liu J, Wang L, Sun J, et al. Bone mineral density reference standards for Chinese children aged 3–18: cross-sectional results of the 2013–2015 China Child and Adolescent Cardiovascular Health (CCACH) Study. *BMJ Open* 2017. doi:10.1136/bmjopen-2016-014542
5. Campbell TC, Campbell II TM. El estudio de China. Efectos asombrosos en la dieta, la pérdida de peso y la salud la largo plazo. Dallas, Texas. Ben Bella Books, Inc 2012: 237-238.
6. De Luis Román DA, Aller De la Fuente R, De Luis J, Pérez JL, González M (2004). Papel del flúor en la osteoporosis. *Endocrinol Nut*;51(7):426-432.

7. Dagleish R. The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:181–7.
8. Kurt-Sirin O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, Seyhan MF, Isbir T, Can A. Combined effects of collage type I alpha1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Gene* 2014; 540: 226–31.
9. Gómez G, Gómez D, Martín M. Flúor y fluorosis dental. (2002). Pautas para el consumo de dentífricos y aguas de bebida en Canaria; ed. 1ª: Santa Cruz de Tenerife. Edita: Dirección General de Salud Pública. Servicio Canario de la Salud.
10. López-Molina M I, Hernández-López M. (2006). Flúor, aplicaciones preventivas y terapéuticas. *Spin cero cuadernos de ciencia*; No.10.
11. Vieira A P, Hancock R, Eggertsson H, Everett E T, Grynopas M D. Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jan;76(1):17-25.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

- En el presente trabajo las comunidades evaluadas registraron contaminación por flúor en el agua del grifo, con valores por arriba del límite permitido por la NOM-127 de 1.5 mg/L.
- El agua embotellada distribuida en las comunidades evaluadas registró concentraciones de flúor dentro del límite establecido por la NOM.201 para este tipo de agua de 0.7 mg/L.
- En ambas comunidades de estudio la principal fuente de abastecimiento de agua para beber y/o cocinar es el agua del grifo.
- El factor de riesgo calculado por el uso del agua del grifo para el consumo fue alto en ambas comunidades.
- El nivel de exposición a flúor estuvo por encima del límite sugerido por la OMS de 1mg/L en ambas comunidades.
- La prevalencia de los polimorfismos rs 2234693 y el rs 1256049 de los genes receptores estrogénicos fue nula en la población de estudio, en tanto que la prevalencia del polimorfismo rs 412777 del gen COL1A2 fue del 41.7% entre ambas comunidades.
- En el presente estudio se registraron casos de DMO baja de acuerdo a los valores de referencia de la ISCD.
- La prevalencia de fluorosis dental fue del 100% en ambas comunidades.

- La presencia del polimorfismo evaluado en el gen COL1A2 generó un riesgo para presentar los grados fluorosis dental más severos
- No se registró asociación entre el polimorfismo evaluado y los valores de la DMO
- Los niños que tuvieron DMO baja presentaron niveles de exposición menores con respecto a los niños que tuvieron DMO normal, sin embargo ambos presentaron niveles de exposición alto en ambas comunidades.
- Los niños con los grados más severos de fluorosis dental presentaron los mayores niveles de exposición comparado con los niños que presentaron los grados menos severos en ambas comunidades.
- Secundario a los objetivos de la presente investigación en la población de estudio se evaluaron el estado nutricional y el consumo de micronutrientes, encontrando casos de bajo peso, desnutrición moderada y desnutrición severa. Así como casos de consumo <50% de la IDR de calcio y de magnesio y >150% de la IDR de fósforo.
- En la población de estudio el estado nutricional estuvo asociado al valor de la DMO y no estuvo asociado al nivel de exposición y fluorosis dental
- En ambas comunidades el consumo de calcio, magnesio y fósforo estuvo asociado al nivel de exposición.

- A pesar de que en el programa de comunicación de riesgo se logró reducir el uso del agua del grifo y el nivel de exposición a flúor, los niveles y el consumo de flúor siguieron siendo altos en la población evaluada.



