

Efecto de la ingestión de fluoruro de sodio en la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en el eritrocito de rata

José Gutiérrez Salinas,* Leticia Cruz Tovar,* María del Carmen Chima Galán,** Liliana García Ortiz,** Juan Carlos Pérez Razo**

RESUMEN

Objetivo: determinar los efectos en la concentración de malondialdehído y la actividad de las enzimas antioxidantes en el eritrocito de ratas tratadas con fluoruro de sodio.

Material y métodos: se utilizaron ratas machos cepa Wistar, divididas en grupo control (sin tratamiento) y experimental (tratadas con 50 ppm de NaF). Se sacrificaron semanalmente hasta completar ocho semanas de tratamiento. Se obtuvieron los eritrocitos para determinar la concentración de malondialdehído en su membrana celular y estimar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Resultados: el fluoruro de sodio incrementa la concentración de malondialdehído en la membrana del eritrocito, únicamente a las ocho semanas de tratamiento. La actividad de las enzimas antioxidantes se alteró a partir de las cuatro semanas.

Conclusiones: la ingestión de fluoruro de sodio provoca alteraciones en el eritrocito de la rata, lo que indica la inducción de estrés oxidativo.

Palabras clave: catalasa, enzimas antioxidantes, eritrocito, estrés oxidativo, fluoruro de sodio, glutatión peroxidasa.

ABSTRACT

Objective: To determine the effects on malondialdehyde levels in erythrocyte membranes and the activity of antioxidant enzymes from rats treated with sodium fluoride.

Material and methods: Male Wistar rats were divided in the following study groups: 1) controls; 2) experimental animals treated with NaF to 50 ppm. They were sacrificed every week until for eight weeks. Erythrocytes were isolated and malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase were determined.

Results: Intake of NaF produces an increase in malondialdehyde only at eight weeks of treatment. Antioxidant enzymes were altered at four weeks of treatment.

Conclusions: Intake of NaF produces alterations in the erythrocyte of male rats as an indicative of oxidative stress.

Key words: catalase, antioxidant enzymes, erythrocyte, oxidative stress, sodium fluoride, glutathione peroxidase.

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental.

** Laboratorio de Medicina Genómica.

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

Correspondencia: Dr. José Gutiérrez Salinas. Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. San Lorenzo 502, segundo piso, colonia Del Valle, CP 03100, México, DF. Correo electrónico: quauhtlicutli@yahoo.com
Recibido: julio, 2007. Aceptado: febrero, 2009.

Este artículo debe citarse como: Gutiérrez SJ, Cruz TL, Chima GMC, García OL, Pérez RJC. Efecto de la ingestión de fluoruro de sodio en la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en el eritrocito de rata. Rev Esp Med Quir 2009;14(2):71-77.

La versión completa de este artículo también está disponible en:

El fluoruro es un elemento químico abundante en la superficie de la tierra, que cuando el humano se expone a él, puede producir alteraciones agudas o crónicas. La fluorosis (intoxicación por fluoruro) es una alteración causada por la ingestión aguda o crónica de fluoruros; clínicamente se distingue por alteraciones dentales y del sistema musculoesquelético y nervioso.¹⁻³

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demuestran que la intoxicación con fluoruro produce diversas alteraciones metabólicas en las células (inhibición de la glucólisis, alteración de receptores membranales, del

equilibrio energético total, rotura del ADN y apoptosis).⁴⁻⁷ Para evaluar los efectos nocivos del fluoruro en el organismo se han desarrollado modelos de intoxicación con fluoruro de sodio, el cual se administra en animales experimentales por diferentes vías, dosis y tiempos de acción.⁴⁻⁸ Entre éstos destacan los que utilizan el compuesto químico adicionado en el agua de bebida.⁴⁻⁸ Estos modelos muestran diferentes ventajas metodológicas, como facilidad de aplicación del tóxico (en el agua de bebida); el manejo de la dosis requerida, facilidad de vigilancia y control de los animales tratados.

Nuestro grupo de trabajo reporta que el consumo de fluoruro de sodio (50 ppm) durante cuatro semanas, en el agua de bebida de ratas, produce estrés oxidativo en la mucosa bucal, que se distingue por incremento en la concentración de malondialdehído (marcador de lipoperoxidación) y alteración en las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.⁸ El estrés oxidativo se origina por aumento en la producción de radicales libres derivados del oxígeno o cuando los sistemas antioxidantes son incapaces de contenerlo.⁸⁻¹²

Los eritrocitos son las principales células utilizadas como marcadores de estrés oxidativo en seres vivos, incluido el humano, porque su membrana y enzimas antioxidantes son sensibles a los radicales libres, tanto a nivel local como general.¹²⁻¹⁴ El acceso por venopunción tiene la ventaja metodológica de obtención de muestras con muy poco daño en los tejidos y en los individuos de donde se obtengan.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto en la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) en eritrocitos de ratas tratadas con fluoruro de sodio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (50 animales), con peso corporal promedio de 240 ± 7 g, obtenidas del laboratorio Harlam (Harlam de México, S.A. de C.V.). Los animales se ubicaron en contenedores individuales para su aclimatación durante una semana, con ciclos de luz-obscuridad de 12 h, y libre acceso al alimento y el agua. La dosis de fluoruro en el alimento (Purina Rat

Pellet Chow; St. Louis, MO, EUA) y el agua de bebida corriente no interfirió con el tratamiento aplicado, pues la cantidad promedio del compuesto fue menor a 0.3 ppm en cada caso.^{7,8,15,16} Todos los procedimientos se efectuaron de acuerdo con los lineamientos del Reglamento sobre Tratamiento de Animales para Cirugía e Investigación de la institución, y coincide con la Ley de Regulación Federal para Animales de Experimentación (SAGAR, México, 1999). Los reactivos se obtuvieron de los laboratorios Sigma (Sigma Chemical St. Louis, MO, EUA), Merck (Merck de México) y Mallinckrot (Mallinckrot de México), con grado analítico y de la mejor calidad posible.

Protocolo de tratamiento

Posterior a la semana de aclimatación, los animales fueron pesados y divididos al azar en dos grupos de estudio (25 por grupo), según los protocolos establecidos,^{7,8,15-17} de la siguiente manera: grupo control, ratas que recibieron alimento y agua en forma libre sin ningún tipo de tratamiento; y grupo experimental, ratas que consumieron 50 ppm de fluoruro de sodio en el agua de bebida y libre acceso al alimento.

El alimento y agua se proporcionaron diariamente; se registró el consumo diario de ambos, resumido en forma semanal. Los animales fueron observados durante el tratamiento para identificar signos de fluorosis (piorección, zonas alopecicas, disminución en la actividad motora general, moteado amarillo de dientes) según los criterios establecidos.^{7,15-18}

Las ratas de ambos grupos se sacrificaron por decapitación cada dos semanas (cinco individuos por grupo) hasta completar ocho semanas, y se examinaron cuidadosamente para identificar signos de fluorosis.

La sangre se obtuvo en tubos con anticoagulante (EDTA) y se centrifugó a 2,000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el plasma y la fracción leucocitaria, y se agregaron tres volúmenes de solución salina isotónica con amortiguador de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos, pH 7.0) a temperatura fría; se centrifugó, nuevamente, a 2,000 rpm durante 15 minutos. El paquete de eritrocitos se lavó dos veces más y fue resuspendido en PBS para obtener un hematócrito de 50% de acuerdo con la técnica descrita previamente.^{13,14,19}

Obtención de la fracción citosólica y membranas celulares

Después de obtener los eritrocitos, se lisaron con una solución amortiguadora hipotónica de fosfatos (5P8; 5 mM de amortiguador de fosfatos, pH 8)^{13,14,19} de la siguiente manera: en un volumen de paquete de eritrocitos se agregan ocho volúmenes de 5P8 y se dejan reposar durante 15 minutos a 4 °C. El resultado se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es recuperado y se considera como la fracción citosólica para determinar la actividad de enzimas antioxidantes. Por su parte, el precipitado es la fracción de membranas celulares que fueron lavadas dos veces más con 5P8 y resuspendidas en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta su utilización.

Determinación de malondialdehído

La concentración de malondialdehído (MDA), como índice de lipoperoxidación, se determinó de las membranas de los eritrocitos según el método de Gutiérrez y col.^{8,13} basado en Ohkawa y col.²⁰ Se incubó una muestra de membranas de eritrocitos (300 mg de proteína total) con 1 mL de amortiguador de Tris (Tris-HCl, 0.15M, pH 7.0) a 37 °C durante 30 minutos. Al término de la incubación, se agregan 1.5 mL de ácido acético (5% v/v) y 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8% p/v) y se incubó durante 60 minutos a 90 °C. Después de la incubación se agregan 1 mL de KCl (2% p/v) y 3 mL de una mezcla de butanol/piridina (1:10 v/v). La mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 3,000 rpm y la interfase butanol/piridina se recupera y analiza en un espectrofotómetro (Jenway 6 300, Cielovista, Cal., EUA) a 532 nm. La concentración de MDA se calcula a partir de su coeficiente de extinción ($1.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresa en nM/mg de proteína.

Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

En la fracción citosólica de los eritrocitos se determina la actividad específica de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa de la siguiente forma: antes de la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes se elimina el exceso de hemoglobina, según el método de Bannister y Bannister.²¹ Un volumen de fracción citosólica se mezcla con

uno de etanol/cloroformo (5/3, v/v), se agitan continuamente durante 10 minutos y se agrega 1/5 de volumen de NaCl isotónico. El resultado se centrifuga a 3,000 rpm durante 60 minutos, se descarta el precipitado y se considera al sobrenadante como la fracción citosólica libre de hemoglobina (FCsHb), utilizada para la determinación de la actividad de las enzimas.

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) fue determinada de acuerdo con la técnica de McCord y Fridovich,²² mediante la formación de formazan a partir de cloruro 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT). Brevemente, se prosiguió como sigue: se colocó una muestra de FCsHb diluida 10 veces con amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4 , 10 mM, pH 7.0) y se agregaron 170 μL de mezcla de reacción (xantina 0.05 mM; INT 0.025 mM). La reacción se inició con la adición de 25 μL de xantina oxidasa (80 U/L) y 10 μL de H_2O_2 (3% en agua), vigilando la absorbancia a 500 nm durante 210 segundos. La actividad específica se reporta en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.²³

La actividad de catalasa se determinó con el procedimiento de Aebi:²³ en una muestra de FCsHb, incubada durante cinco minutos con un volumen de PBS a 37 °C, se inició la reacción al agregar 10 mM de H_2O_2 y se siguió por 45 segundos a 240 nm. La actividad resultante se expresa en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

La actividad específica glutatión peroxidasa (Glp) se determinó con un equipo comercial (Glutathione peroxidase cellular activity assay kit, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) siguiendo las instrucciones incluidas por el fabricante y con base en el método de Paglia y Valentine,²⁴ la actividad se expresa en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

La cantidad de proteína total en la fracción membranar y la fracción citosólica libre de hemoglobina se determinó según el procedimiento estándar de Lowry²⁵ con albúmina sérica bovina.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en valores promedio \pm error estándar, y se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., EUA). Se estimó la diferencia de medias entre grupos con la prueba de χ^2 al cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los datos de ganancia de peso de ambos grupos, además del consumo de agua y alimento por semana. La ganancia de peso final no mostró diferencias significativas entre grupos (control 156.9 ± 6.2 vs experimental 157.9 ± 5.4 ; $p > 0.5$). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de agua o alimento que consumieron semanalmente las ratas. Además, a partir de la cantidad de agua consumida, se calculó la cantidad de fluoruro de sodio ingerido mensualmente, lo que resultó en 171.44 mg/kg de peso corporal. De acuerdo con los parámetros clínicos usados y reportados previamente para definir la intoxicación por fluoruro en la rata^{7,8,15-18} y con la dosis calculada que recibieron durante ocho semanas, no se encontraron datos clínicos perceptibles de fluorosis.

La figura 1 muestra la concentración de malondialdehído en la membrana de los eritrocitos en ambos grupos de estudio. La concentración de malondialdehído tuvo incremento estadísticamente significativo ($p < 0.5$) en las ratas que recibieron fluoruro de sodio, en comparación con el grupo control, únicamente en la octava semana de tratamiento. Debido a que el malondialdehído es un producto de lipoperoxidación de ácidos grasos de la membrana celular y este fenómeno ocurre cuando existe un exceso de radicales libres, se sugiere que las especies reactivas inducidas por la intoxicación con fluoruro de sodio dañan la membrana del eritrocito.

La actividad específica de las principales enzimas antioxidantes del eritrocito durante las ocho semanas de tratamiento se muestran en las figuras 2 a 4.

En la figura 2 se observa el curso temporal de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, proveniente del citosol de los eritrocitos de las ratas experimentales y control. En comparación con la concentración de malondialdehído, la actividad de la enzima superóxido

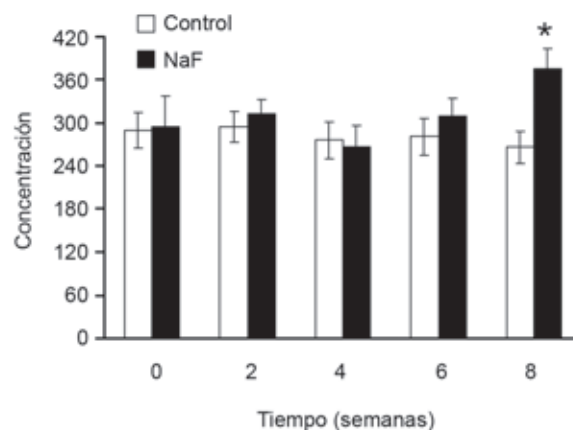


Figura 1. Curso temporal de la concentración de malondialdehído (expresada como nmoles/mg proteína) determinada en la membrana de eritrocitos provenientes de ratas tratadas con 50 ppm de NaF (barras negras) y controles (barras blancas). Los resultados se expresan como promedios \pm EE de cinco ratas por grupo.

* $p < 0.05$ vs grupo control.

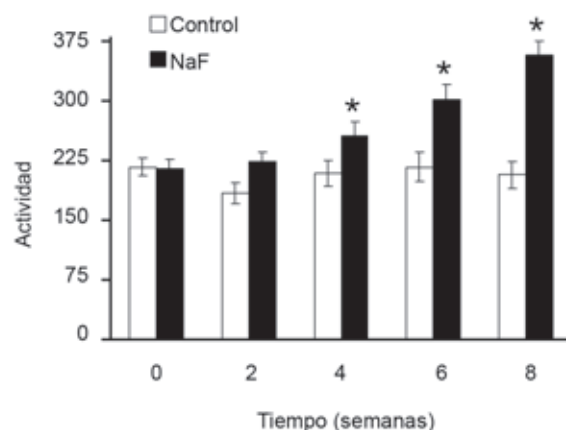


Figura 2. Curso temporal de la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa (expresada como μ moles/min/mg proteína) en citosol de eritrocitos de ratas tratadas con 50 ppm de NaF (barras negras) y controles (barras blancas). Los resultados se expresan como promedios \pm EE de cinco ratas por grupo.

* $p < 0.05$ vs grupo control.

Cuadro 1. Características generales de los animales

Grupo	n	Consumo semanal de alimento (g)	Consumo semanal de agua (mL)	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Ganancia de peso final (g)
Control	25	145.3 ± 8.1	208.3 ± 3.5	253.5 ± 4.2	410.4 ± 3.2	156.9 ± 6.2
Experimental	25	153.2 ± 7.2	219.5 ± 5.4	250.3 ± 4.4	408.2 ± 4.5	157.9 ± 5.4

dismutasa tuvo incremento estadísticamente significativo en el grupo de estudio a las cuatro semanas de tratamiento. Dicho incremento fue cada vez mayor y llegó a 66% (respecto del grupo control) a las ocho semanas de exposición al fluoruro de sodio.

En la catalasa y la glutatión peroxidasa provenientes de eritrocitos de ratas tratadas con fluoruro de sodio se observó un incremento estadísticamente significativo en su actividad específica a partir de las cuatro semanas de tratamiento (figuras 3 y 4): la actividad específica de la catalasa se incrementó 135% con respecto al grupo control. A las seis y ocho semanas el incremento fue de 218 y 298%, respectivamente (figura 3).

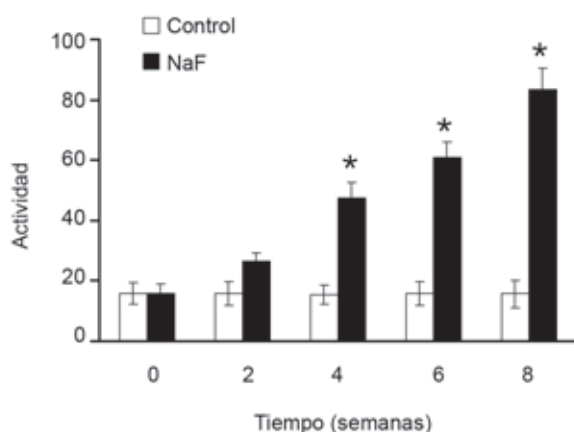


Figura 3. Curso temporal de la actividad específica de la enzima catalasa (expresada como $\mu\text{moles/min/mg}$ proteína) determinada en citosol de eritrocitos de ratas tratadas con 50 ppm de NaF (barras negras) y controles (barras blancas). Los resultados se expresan como promedios \pm EE de cinco ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo control.

La actividad específica de la glutatión peroxidasa mostró un incremento equivalente a 33, 41 y 53% respecto al grupo control, a las cuatro, seis y ocho semanas de tratamiento, respectivamente (figura 4).

DISCUSIÓN

La intoxicación con 50 ppm de fluoruro de sodio (NaF) aplicado en el agua de bebida durante cuatro semanas como mínimo no produce la aparición de datos clínicos de fluorosis.⁸ De la misma manera, las ratas tratadas hasta por ocho semanas con la misma dosis tampoco

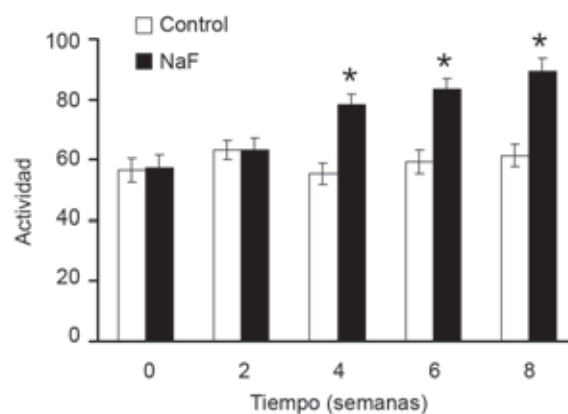


Figura 4. Curso temporal de la actividad específica de la enzima glutatión peroxidasa (expresada como $\mu\text{moles/min/mg}$ proteína) determinada en citosol de eritrocitos de ratas tratadas con 50 ppm de NaF (barras negras) y controles (barras blancas). Los resultados se expresan como promedios \pm EE de cinco ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo control.

muestran datos de intoxicación por fluoruros, según los resultados de este trabajo.

Es característico que las ratas a las que se induce fluorosis (fluoruro de sodio en el agua de bebida) manifiesten falta de ganancia de peso corporal (debida, en parte, a la disminución en ingestión de alimento), además de piloerección, zonas alopecicas, disminución en la actividad motora general y moteado amarillo de los dientes.^{7,15-18} Dichos signos suelen aparecer en animales sometidos a la ingestión de fluoruro de sodio durante más de 12 semanas, a dosis de 100 a 800 ppm.^{7,15-18}

Los datos del cuadro 1 indican que los animales tratados con 50 ppm de NaF hasta por ocho semanas no muestran cambios en la ganancia de peso corporal total y en el consumo semanal de alimento y agua, en relación con el grupo control. Al observar minuciosamente para identificar piloerección, zonas alopecicas, moteado amarillo de los dientes o disminución en la actividad motora general, no se encontró ningún signo de fluorosis, por lo que el tratamiento propuesto en este estudio es incapaz de inducir “fluorosis clínica”, como lo han descrito otros modelos experimentales.^{7,15-18} Tal como lo señalamos en un artículo previo,⁸ es probable que el tiempo de tratamiento (ocho semanas) no sea suficiente para provocar las alteraciones generales visibles de fluorosis; sin embargo, los cambios encontrados en

la concentración de malondialdehído y en las enzimas antioxidantes demuestran que el NaF induce cambios metabólicos en los eritrocitos, que si bien no resultan en alteraciones “clínicas visibles”, denotan un efecto sobre los sistemas antioxidantes del eritrocito provocado por este tóxico.

La alteración en la actividad específica de enzimas antioxidantes en la célula o los tejidos, además del incremento en la lipoperoxidación (determinado por un aumento en el malondialdehído) de ácidos grasos de las membranas celulares, indican estrés oxidativo. Este proceso se distingue, principalmente, por exceso en la producción de radicales libres derivados del oxígeno o por disminución en los mecanismos antioxidantes.⁸⁻¹¹ Se ha reportado que la intoxicación aguda o crónica con fluoruro de sodio en animales de experimentación y en humanos que viven en zonas fluoróticas produce estrés oxidativo en diferentes órganos, como el riñón, el cerebro, el hígado y las gónadas.²⁶⁻²⁸ Estos sujetos manifiestan los signos clínicos de fluorosis, asociados con alteraciones en la actividad de la enzima superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa e incremento en la concentración de malondialdehído en suero o los ácidos grasos de los tejidos.²⁶⁻²⁸ Aún no se conoce el mecanismo de acción por el cual el fluoruro de sodio induce estrés oxidativo en esos órganos; sin embargo, estudios *in vitro* señalan que puede interactuar con enzimas que contienen un metal de transición como parte de sus cofactores o en su sitio activo; por la naturaleza química de este tóxico es capaz de interrelacionarse con dicho metal y ejercer un proceso de activación o inhibición de su actividad.²⁶⁻²⁸ Las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (importantes antioxidantes en el eritrocito) tienen un metal de transición como cofactor, por lo que el estudio de la interacción de este tóxico con las enzimas puede explicar el comportamiento que expresan *in vivo*.

Los resultados muestran que la membrana del eritrocito tuvo incremento de malondialdehído sólo a las ocho semanas de tratamiento con NaF, lo que contrasta con otros estudios que reportan incremento desde las dos semanas de tratamiento.^{1-4,26-29} Sin embargo, la cantidad de NaF prescrita (250 a 1,000 ppm) y la vía de aplicación (intramuscular o intraperitoneal) pueden ser factores importantes para obtener diversos resultados.

El incremento en los valores de malondialdehído indica estrés oxidativo inducido por radicales libres de oxígeno; no obstante, se ha demostrado que el aumento en la concentración de malondialdehído es posible sólo cuando las “defensas” antioxidantes que ofrecen las enzimas han sido superadas.⁹⁻¹² De esta forma, el daño provocado por los radicales libres en la membrana celular, con la consiguiente producción de malondialdehído, ocurre cuando las principales enzimas antioxidantes de la célula, y principalmente del eritrocito, no pueden “contenerlos” y “escapan” para dañar a los ácidos grasos, lo que resulta en elevadas concentraciones de malondialdehído.

Los resultados obtenidos hacen suponer que el fluoruro de sodio ejerce su acción nociva en la membrana celular a partir de las ocho semanas de tratamiento, y desde las cuatro semanas de exposición al tóxico, la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa muestra cambios en su actividad específica, tal como si hubiese un “preámbulo” en el que los radicales libres de oxígeno, producidos por la intoxicación con NaF, son contenidos por los sistemas antioxidantes enzimáticos del eritrocito. A las ocho semanas de exposición, la actividad de las enzimas antioxidantes del eritrocito es máxima y quizá no puede contener la producción de radicales libres, por lo que ocurre el daño a la membrana celular con el consiguiente aumento de malondialdehído.

Desde el punto de vista metabólico, los eritrocitos de ratas son sensibles al fluoruro de sodio. Dicha “sensibilidad” es patente por los cambios que se observan en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Los datos anteriores, junto con el incremento de malondialdehído a las ocho semanas de tratamiento, demuestran el estrés oxidativo inducido por el NaF.

CONCLUSIONES

El efecto del fluoruro de sodio en los eritrocitos da la pauta para suponer que, probablemente, uno de los mecanismos fisiopatológicos de daño provocado por este tóxico se origina por la alteración de enzimas antioxidantes que, al verse superadas, no pueden contener el daño a la membrana celular y provocan el incremento de

malondialdehído, lo que en conjunto puede interpretarse como la inducción de estrés oxidativo. Se requieren más investigaciones para evaluar con precisión los efectos del NaF en los sistemas antioxidantes del eritrocito, sobre todo en humanos. Los estudios futuros deben encaminarse a resolver este tipo de cuestionamientos.

REFERENCIAS

1. Monsour PA, Kruger BJ. Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. *Fluoride* 1985;18:53-61.
2. Jacyszyn K, Marut A. Fluoride in blood and urine in humans administered fluoride and exposed to fluoride-polluted air. *Fluoride* 1986;19:26-32.
3. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1995;17:169-77.
4. Holland RI. Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Toxicol* 1979;45:96-101.
5. Goh EH, Neff AW. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1501-8.
6. Machalinska A, Machoy-Mokrzynska A, Marlicz W, Steciewicz I, Machalinski B. NaF-induced apoptosis in human bone marrow and cord blood CD34 positive cells. *Fluoride* 2001;34:258-63.
7. Heindel JJ, Bates HK, Price CJ, Marr MC, et al. Developmental toxicity evaluation of sodium fluoride administered to rats and rabbits in drinking water. *Fundam Appl Toxicol* 1996;30:162-77.
8. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Sodium fluoride ingestion induced oxidative stress in buccal mucosa in rat. *Rev Mex Cien Farm* 2006;37:11-22.
9. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex* 2004;20:287-95.
10. Gutiérrez-Salinas J. What do you know about...free radicals? *Rev Mex Cien Farm* 2006;37:69-73.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-14.
12. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 1973;32:1870-4.
13. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. *Biochem Mol Biol Inter* 1993;29:263-70.
14. Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, Dubbelman TMAR. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989;980:175-80.
15. Darmani H, Al-Hiyasat AS, Elvetieha AM. Effects of sodium fluoride in drinking water on fertility in female mice. *Fluoride* 2001;34:242-9.
16. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotox Theratol* 1995;17:169-77.
17. Foulkes RG. Thirty-five years of fluoride. *Fluoride* 2002;35:213-27.
18. Denvesten PK. Mechanism and timing of fluoride effects on developing enamel. *J Pub Heal Dent* 1999;59:274-51.
19. Dodge JT, Mitchell C. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-30.
20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
21. Bannister JV, Bannister WH. Isolation and characterization of superoxide dismutase. In: Lester P, editor. *Methods in Enzymology*. 1st ed. New York: Academic Press, 1984;pp:88-93.
22. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
23. Aebi ABH. Catalasa activity. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M, editors. 1st ed. *Methods in enzymatic analysis*. Florida: John Wiley & Sons Inc, 1983;pp:273-82.
24. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;1:265-75.
26. Chinoy NJ. Fluoride stress on antioxidant defence systems. *Fluoride* 2003;36:138-41.
27. Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z. Interaction between fluoride and biological free radical reaction. *Fluoride* 1998;31:43-45.
28. Sharman A, Chinoy NJ. Role of free radicals in fluoride-induced toxicity in liver and kidney of mice and its reversal. *Fluoride* 1998;31:S26.
29. Denbesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986;65:1272-7.