

Aumento de la proteína p53 en leucocitos de ratas intoxicadas con fluoruro de sodio

Palabras clave: Daño al ADN, fluorosis, genotoxicidad, leucocitos periféricos, Western-Blot.

Key words: DNA damage, fluorosis, genotoxic damage, leukocytes from blood, Western-Blot technique.

Recibido: 12/05/2010

Aceptado: 03/06/2010

Este artículo también puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medicgraphic.com/patologiaclinica/>

Sigrit Suástequi-Domínguez,* José Gutiérrez-Salinas,* Leticia Cruz-Tovar,* Claudia Ramos-Barragán**

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE.

** Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del Departamento de Vigilancia Epidemiológica, ISSSTE.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas.

Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE,

Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental.

San Lorenzo núm. 502, 2o. piso,

Col. Del Valle, 03100 México, D.F.

Tel: 5200-5003, ext. 14603.

E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

Resumen

Antecedentes: Los sujetos intoxicados con fluoruro de sodio (NaF) presentan cuadros repetitivos de infecciones tanto pulmonares como digestivas, lo que ha llevado a pensar que este tóxico puede tener algún efecto sobre el sistema inmunológico. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del NaF en los leucocitos de ratas tratadas con NaF, usando la determinación de la proteína p53 como indicador de daño. **Métodos:** Ratas macho fueron tratadas con dos concentraciones de NaF (1 y 50 ppm) por ocho semanas. Se usaron como control animales sin ningún tipo de tratamiento. Los animales fueron sacrificados y la sangre fue recolectada para aislar leucocitos, los cuales fueron analizados para determinar su viabilidad y la presencia de la proteína p53 por medio de la técnica de Western-Blot. **Resultados:** A lo largo del tiempo de tratamiento, las ratas que fueron intoxicadas con 50 ppm de NaF presentan una menor viabilidad y un aumento progresivo en la presencia de la proteína p53, en comparación con las ratas control o las que recibieron 1 ppm

Abstract

Introduction. The subjects intoxicated with sodium fluoride (NaF) they present consecutive infections in lung and digestive system. It is hypothesized that this latter substance can have some effect upon the immunologic system. The objective is to determine the effect of the NaF in the leukocytes from rats intoxicated with NaF using p53 protein determination used like sign of damage. **Methods:** Male rats were dealt with two concentrations of NaF (1 and 50 ppm) for eight weeks. As control, rats without NaF was used. Animals were sacrificed and blood obtained for leukocyte isolation. Leukocyte was analyzed for viability and detection of p53 protein by Western-Blot method. **Results:** Along the time of treatment, the leukocytes from rats intoxicated with 50 ppm of NaF present a lower viability and an increase in p53 presence has compared with both the control group and rats intoxicated with 1 ppm of NaF. **Conclusions:** Our results shows that the intoxication with NaF has induced an increase in p53 protein. These latter protein is an important

de NaF. **Conclusiones:** Nuestros resultados muestran que la intoxicación con NaF puede inducir la presencia de la proteína p53, la cual es reconocida como un indicador muy importante de daño al ADN, lo que puede interpretarse como un efecto genotóxico de este compuesto hacia los leucocitos.

Introducción

La fluorosis (intoxicación por fluoruro) es causada por una ingesta aguda o crónica de fluoruros, principalmente en forma de sales de sodio o potasio. La fluorosis en el humano produce alteraciones dentales y de los sistemas musculoesquelético y nervioso.^{1,2}

Experimentos hechos *in vitro* con células o tejidos han demostrado que la aplicación de fluoruro puede producir diversas alteraciones metabólicas tales como inhibición de la glucólisis, alteración de receptores membranales, alteraciones en el balance energético total, ruptura del ADN e inducción de apoptosis.³⁻⁵

Por otro lado, se sabe que mamíferos (incluyendo al ser humano) que son expuestos a una intoxicación aguda o crónica con metales pesados, insecticidas, o algún otro compuesto tóxico, pueden presentar alteraciones en los leucocitos circulantes, denotadas por alteraciones en su metabolismo intermedio e incluso daño del ADN. En este último caso, el daño al ADN es antecedido por la activación de varias proteínas consideradas como «supresoras de estrés» de las que destaca la proteína p53, la cual responde al daño genotóxico inducido por el tóxico.⁴⁻¹⁰

La proteína p53 originalmente actúa en coordinación con otras proteínas del ciclo celular como un supresor del crecimiento tumoral. Sin embargo, ha sido observado que el daño genotóxico (ruptura en la cadena de ADN inducido por un tóxico) y el estrés metabólico inducen su expresión o la aumentan, lo que trae como consecuencia que se active la muerte celular, llamada también apoptosis, cuando existe un mayor daño a la célula.⁴⁻¹²

indicator of DNA damage. These can be interpreted like a genotoxic damage to the leukocytes.

Ha sido descrito que la aplicación de fluoruro de sodio (NaF) como principal fuente de fluoruro a células en cultivo puede inducir un exceso en la expresión de la proteína p53 que es una proteína que se expresa cuando existe daño al ADN.^{5-7,13-15} Por otro lado, ha sido descrita la inducción de apoptosis en células epiteliales de pulmón humano cultivadas con cantidades crecientes de NaF; y que la inclusión de fluoruro en la dieta en animales de experimentación puede ocasionar daño al hígado expresado como apoptosis.^{5-7,13-15}

Tal como se comentó en anteriores párrafos, un daño genotóxico aumenta la expresión de la proteína p53, por lo que su determinación en tejidos y/o células puede ser un indicador de daño celular y probablemente de la instalación de un fenómeno de apoptosis. Con base en esto, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la exposición a NaF en animales de laboratorio tiene efecto sobre la presencia de la proteínas p53 como indicadora de un daño genotóxico.

Material y métodos

Ratas macho de la cepa Wistar (Laboratorio Harlam-Méjico; 250 ± 5 g peso) fueron colocadas en contenedores individuales y adaptadas a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas con libre acceso al agua y al alimento. Los procedimientos fueron hechos de acuerdo con el Reglamento Sobre Tratamiento de Animales para Cirugía e Investigación de nuestra institución que está acorde con la Ley de Regulación Federal para Animales de Experimentación (SAGAR, México).

Tratamiento. Los animales fueron tratados de acuerdo a protocolos ya establecidos en donde se expone a los mismos a concentraciones conocidas

de fluoruro de sodio (NaF) que es agregado al agua de bebida corriente¹⁶⁻¹⁸ y monitoreando los cambios semanalmente.

Las ratas fueron divididas en forma aleatoria en los siguientes grupos de estudio (25 animales por grupo): a) Grupo control. Ratas sin tratamiento alguno que ingieren alimento (Rat Pellet Chow, Purina Inc. MO, USA) y agua en forma libre. El agua se obtuvo de un distribuidor comercial local en garrafones de 20 litros (Embotelladora Electropura, SA de CV, México). De acuerdo a los análisis químicos, dicha agua presenta una concentración de fluoruros < 0.5 ppm, considerándose dentro de límites normales y sobre la que se ha reportado que no interfiere en el experimento.¹⁶⁻¹⁸ b) Grupo experimental NaF-1. Al agua de bebida de este grupo se le agregó una concentración de NaF equivalente a 1 ppm de fluoruro. Tuvieron libre acceso al alimento. c) Grupo experimental NaF-2. Se agregó una concentración de NaF equivalente a 50 ppm de fluoruro en el agua que beberían estos animales. Tuvieron libre acceso al alimento.

Durante todo el tiempo que duró el tratamiento, el agua era sustituida cada 24 horas por agua fresca y los datos bromatológicos fueron registrados semanalmente. Una vez iniciado el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas semanalmente (cinco ratas por grupo) hasta por ocho semanas.

Obtención de leucocitos. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación como ya ha sido descrito previamente¹⁹ y la sangre fue recuperada en un recipiente con anticoagulante (EDTA) y colocada en un tubo de ensayo junto con una cantidad equivalente de Histopaque (Sigma Chemical, 1077-1, St. Louis, USA). Las muestras fueron centrifugadas 15 minutos a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) y los leucocitos recuperados y lavados tres veces (centrifugación de 10 minutos a 1,200 rpm) con solución salina isotónica fría (PBS, pH 7). Los leucocitos fueron contados en un hemocitómetro, ajustando la concentración a 2×10^6 células/mL.

Determinación de la actividad metabólica de los leucocitos. Para evaluar la actividad

metabólica de los leucocitos como un índice de viabilidad, se usó un kit comercial (Leucognost, Hematologie, Merck Germany), siguiendo el instructivo incluido. El procedimiento se basa en lo reportado por Lokaj y colaboradores,²⁰ usando como marcador metabólico la producción de formazán. En breve, se procedió como sigue: A 3 mL de la solución de leucocitos se le agregaron tres volúmenes de solución de Dulbelco con glucosa (5 mM) y se dividieron en dos muestras. Una de ellas fue incubada junto con 1% de almidón de papa, 1% de dimetil sulfóxido y 0.1% de cloruro de 3-4,indofenil-2,4,nitrofenil-5,fenil tetrazolium (INT). La otra muestra fue colocada bajo las mismas condiciones que la anterior, pero sin almidón. Ambas muestras fueron incubadas por 45 minutos a 37 °C en agitación constante. Al término de la incubación, se agregaron dos volúmenes de metanol absoluto y se agitó fuertemente por tres minutos. El sobrenadante fue leído a 485 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal, USA). La actividad metabólica de los leucocitos fue expresada en nmoles formazán/106 células de acuerdo con el procedimiento descrito en el instructivo del kit.

Detección de la proteína p53. Una muestra de leucocitos fue diluido con partes equivalentes (v/v) de un buffer de lisis (Tris, 0.01 M; sacarosa 0.25 M; EGTA 0.3 mM; pH 7.4, agregado de inhibidores de proteasas) frío y homogeneizado con un sonificador (Ultra-Turrax, 205; Thompson Inc, USA) con tres golpes de 30 segundos cada uno. El homogenizado fue centrifugado a 10,000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado y considerado como extracto total de leucocitos en donde se determinó la concentración de la proteína total por el método de Lowry,²¹ usando albúmina bovina como estándar.

El Western-Blot para detectar la presencia de la proteína p-53 fue hecho, usando geles de acrilamida (acrilamida/bis-acrilamida a 12%/0.1% p/p, respectivamente) siguiendo la técnica de Laemmli,²² seguido de un blot en papel de nitrocelulosa de

acuerdo a métodos ya establecidos.²³ La transferencia se llevó a cabo por 80 minutos y 100 mA, al término de la cual la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de rojo de Ponceau-S (Sigma-Aldrich, USA), para determinar la ubicación de las proteínas. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS y se incubó 60 minutos a temperatura ambiente en agitación continua en una solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo y 0.5% de tween-20). Al término de la incubación, se lavó tres veces con PBS y fue expuesta al anticuerpo primario (Santa Cruz Cal, USA) dirigido en contra de la proteína p53 e incubando en agitación continua por 70 minutos y con solución de bloqueo. Para revelar la presencia de p-53, se utilizó un kit comercial de anticuerpo secundario y tetrametilbenzidina (Promega, USA) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La membrana fue escaneada en un equipo Alpha Imagen TM (V-3.3; 1200, USA) con sistema de documentación y análisis para determinar por medio de absorbancia (lectura a 640 nm) la cantidad aparente de proteína tal como ha sido reportado previamente.²⁴

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism (V-4; GraphPad Software, San Diego, California, USA), usando una hoja de Excel (Microsoft Co.). Los resultados se expresan como promedios ± error estándar para todos los grupos en estudio. El valor de la intensidad de las manchas en los Western-Blot fue evaluado usando una prueba t

de Student no pareada con corrección de Welch, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Un indicador que es considerado para evaluar el efecto general del NaF en modelos experimentales de laboratorio es la determinación de la ganancia de peso corporal durante el tiempo que dure el tratamiento, ya que refleja cambios en los hábitos alimenticios de dichos animales, los cuales son proporcionales a su intoxicación.¹⁴ En el cuadro I se muestra la ganancia de peso corporal en los grupos de estudio a las ocho semanas de tratamiento. Como se puede observar, ninguna de las dosis de NaF (1 ó 50 ppm) mostró tener efecto significativo sobre la ganancia de peso corporal, comparadas con el grupo control. Tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de agua consumida diariamente por los animales y únicamente se observa un incremento en la cantidad semanal de NaF ingerida por el grupo que recibió la dosis de 50 ppm, lo cual es completamente lógico, ya que dicho grupo consumió una concentración mayor de dicho compuesto en su agua de bebida corriente. Durante el sacrificio de los animales, éstos fueron examinados por un patólogo para denotar si existía algún cambio en la morfología de los órganos (en especial en el hígado y los riñones), no encontrando ningún cambio anatomo-patológico aparente.

Cuadro I. Peso corporal, consumo de agua y dosis de fluoruro de sodio en los grupos de ratas en estudio. Los resultados están expresados como promedios ± error estándar.

Grupo experimental	PPI (g)	PPF (g)	CAR (mL/día)	D-NaF (mg/kg/semana)
Control (n = 25)	252.13 ± 3.14	314.13 ± 5.39	29.05 ± 0.30	0
NaF 1 ppm (n = 25)	252.70 ± 3.32	312.23 ± 3.32	31.05 ± 0.32	0.868 ± 0.01
NaF 50 ppm (n = 25)	251.65 ± 4.81	312.12 ± 5.21	30.48 ± 0.27	42.67 ± 0.38

N= Número de ratas por grupo PPI = Promedio de peso inicial. PPF = Promedio de peso final. CAR = Consumo de agua por rata.

D-NaF = Dosis de NaF.

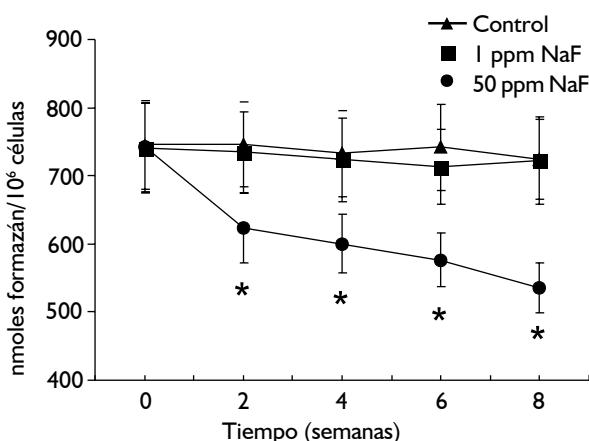


Figura 1. Curso temporal de la actividad metabólica en los leucocitos obtenidos de los diferentes grupos en estudio. Cada punto representa el promedio \pm DE de cinco ratas por tiempo. Los asteriscos denotan diferencia estadística ($p < 0.05$) en relación con el grupo control.

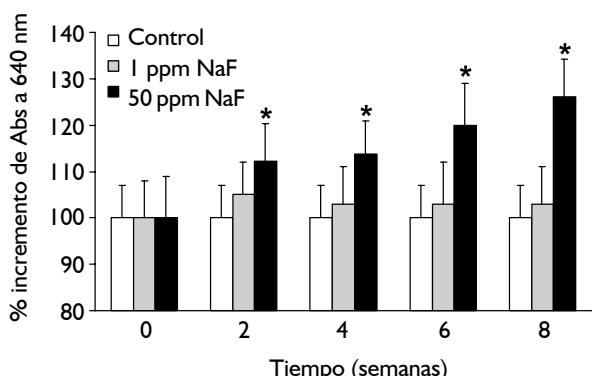


Figura 2. Curso temporal de la expresión de la proteína p53 en los leucocitos de ratas tratadas con 1 ó 50 ppm de fluoruro de sodio hasta por ocho semanas. Los Western-Blot fueron escaneados a 640 nm y la cantidad relativa de proteína se expresa en unidades de absorbancia a lo largo del tiempo. Cada punto representa los escaneos por duplicado de cinco ratas expresado como porcentaje del control \pm desviación estándar (DE). Los asteriscos denotan una $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

La figura 1 muestra el curso temporal de los cambios en la actividad metabólica de los leucocitos en las ratas de todos los grupos en estudio. Como puede observarse, en comparación con el grupo control, las ratas que recibieron la dosis de 1 ppm

de NaF no presentaron cambios importantes en su actividad metabólica. Por el contrario, la dosis de 50 ppm de NaF produce una disminución importante ($p < 0.05$) en dicho parámetro desde las dos semanas de tratamiento hasta disminuir cerca de 20% ($p < 0.05$) a las ocho semanas.

Por su parte, la figura 2 muestra el resultado del escaneo a 640 nm de las membranas de Western-Blot para observar el curso temporal de la presencia de la proteína p53 en los grupos de estudio. El resultado se muestra en porcentaje de incremento en la absorbancia de las proteínas de los grupos tratados con NaF con respecto al grupo control. Como se muestra en la gráfica, el grupo de ratas que recibió el tratamiento con 50 ppm de NaF presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control en la expresión de las proteínas p53. Dicho incremento es de 12.3% con respecto del grupo control, a las dos semanas de tratamiento y se incrementa progresivamente hasta las ocho semanas en donde el valor es de 29.8% superior al del grupo control. Por su parte, el tratamiento de 1 ppm de NaF no produce cambios significativos con respecto al grupo control, en la expresión de dicha proteína.

Discusión

Nuestros resultados muestran que los leucocitos obtenidos de ratas que ingirieron NaF a una dosis de 50 ppm hasta por ocho semanas presentan una disminución importante en su actividad metabólica general, así como un incremento en la expresión de la proteína p53, lo que puede ser un indicio de la presencia de un fenómeno de genotoxicidad en este tipo de células.

Los datos del cuadro I, así como los datos clínicos recabados durante el tiempo que duró el estudio, muestran que el tratamiento con ambas dosis de NaF (1 y 50 ppm) no producen alteraciones generales visibles, las cuales han sido reportadas como potencialmente tóxicas por otros investigadores.^{17,18,25-27} La inspección general de la mucosa y

los dientes de las ratas tratadas con ambas dosis de NaF señalan que no existen signos visibles de fluorosis o algún tipo de signo que denote intoxicación, de acuerdo a parámetros ya establecidos.²⁵⁻²⁷ Es probable que el tiempo de tratamiento que hemos usado (ocho semanas) no sea suficiente para producir, tanto en la mucosa bucal como a nivel general, las alteraciones visibles propias de una fluorosis; sin embargo, los cambios encontrados en la actividad metabólica y en la proteína p53 pueden sugerir que existen cambios metabólicos en el organismo producidos por nuestro tratamiento que, si bien no se traducen en alteraciones clínicas visibles, sí denotan un efecto ocasionado por el NaF, sobre todo a una dosis de 50 ppm.

La determinación de la actividad metabólica general ha sido considerada como un indicador de viabilidad de los leucocitos.^{28,29} Se ha descrito en modelos experimentales con células aisladas *in vitro* y con animales de experimentación, que la aplicación de NaF modifica el metabolismo general de los leucocitos con tratamientos mínimos de 300 ppm de NaF para observar algún tipo de cambio en este parámetro.^{4,14,25-27} Tanto las dosis de NaF como el tiempo de tratamiento con este tóxico han sido elegidos por otros investigadores, ya que dichas dosis y tiempos son los mínimos necesarios para encontrar en sus modelos alguna manifestación visible o clínica de intoxicación con NaF. En nuestro modelo de estudio, la disminución en la actividad metabólica de los leucocitos se presenta en las ratas tratadas con 50 ppm de NaF a las dos semanas (*figura 1*) sin que encontremos datos visibles o clínicos de intoxicación, lo cual sería indicativo de que existe una sensibilidad metabólica de los leucocitos a dicho compuesto sin la expresión clínica de una intoxicación por este compuesto.

Por otro lado, el incremento en la expresión de la proteína p53 en los leucocitos de las ratas que recibieron 50 ppm de NaF indican la presencia de un proceso de genotoxicidad, ya que la expresión de dicha proteína es considerada como un indica-

dor de este tipo de procesos en donde existe un daño al ADN.^{11,12,30}

Un agente genotóxico es aquel compuesto químico que puede producir alteraciones en el material genético cuando se encuentra dentro del organismo.³⁰ Como respuesta a dicha agresión química, la célula responde mediante la expresión de proteínas que tienen la finalidad de preservar la integridad del ADN y de modular la transcripción del mismo. La proteína p53 actúa uniéndose al ADN y puede actuar como un regulador positivo o negativo de la transcripción en el ciclo celular, por lo que se considera como una proteína clave dentro de este proceso, ya que puede detener el proceso de la división celular o inducir un fenómeno de apoptosis.^{7,11,12,30}

Por lo anteriormente mencionado, podemos suponer que el incremento en la expresión de p53 en los leucocitos de las ratas que fueron expuestas con 50 ppm de NaF presentan un fenómeno de genotoxicidad a partir de las dos semanas de tratamiento.

El efecto del NaF sobre los leucocitos de la circulación sanguínea que hemos observado en este estudio nos da la pauta para suponer que dicho compuesto químico puede actuar como un agente tóxico para dichas células, al grado de inducirles un proceso de genotoxicidad que pudiera desencadenar a un proceso de apoptosis. Lo anterior es de fundamental importancia, ya que, tal como ha sido reportado previamente, en las zonas geográficas en donde existe un alto contenido de este tóxico en el agua, existe un incremento en enfermedades infecciosas tanto en animales como en humanos, lo que hace pensar que existe un daño importante al sistema inmune provocado por este compuesto.^{1,3,4,13-15,31,32}

Tomando en cuenta nuestros resultados, podemos señalar que los leucocitos de la circulación sanguínea son sensibles a la presencia del NaF, el cual modifica el patrón normal de apoptosis, sobre todo a dosis de 50 ppm. Es claro que se requieren más investigaciones para evaluar con mayor precisión los efectos que el NaF pueda tener sobre este

tipo de células; sin embargo, podemos señalar que nuestro modelo de estudio puede ser útil para investigar con mayor detalle el efecto que este tóxico tiene sobre los leucocitos y sobre otros tipos de células y tejidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Tec. Sergio Hernández Rodríguez (División de Investigación Biomédica del CMN «20 de Noviembre», ISSSTE) por su valiosa colaboración y asistencia técnica.

Referencias

1. Foulkes RG. Thirty-five years of fluoride. Fluoride 2002; 35: 213-227.
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. Holland RL. Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells *in vitro*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1979; 45: 96-101.
4. Monsour PA, Kruger BJ. Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. Fluoride 1985; 18: 53-61.
5. Machalinska A, Machaj-Mokrzynska A, Marlicz W, Stecewicz I, Machalinski B. NaF-induced apoptosis in human bone marrow and cord blood CD34 positive cells. Fluoride 2001; 34: 258-263.
6. Wang AG, Chu QL, He WH, Xia T, Liu JL, Zhang M. Effects on protein and mRNA expression levels of p53 induced by fluoride in humans embryonic hepatocytes. Toxicol Lett 2005; 158: 158-163.
7. Morales-González JA, Bueno-Cardoso A, Marichi-Rodríguez F, Gutiérrez-Salinas J. Programmed cell death (apoptosis): the regulating mechanisms of cellular proliferation. Arch Neurocienc (Mex) 2004; 9: 85-93.
8. Stavridi E, Halazonetis TD. p53 and stress in the ER. Gen Dev 2004; 18: 241-244.
9. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis and stress resistance. Science 2001; 294: 591-595.
10. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Production of free radicals derived from oxygen and hepatocyte damage. Med Int Mex 2004; 20: 287-295.
11. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 1993; 74: 957-967.
12. Lane DP. p53, Guard of the genome. Nature 1984; 77: 1087-1090.
13. Refsnes F, Lag T, Skuland T, Samuelsen J, Schwarze P. Fluoride-induced apoptosis and necrosis in a human lung epithelial cell line: Involvement of PKA and PKC-mediated mechanism. Toxicol Lett 1998; 95 (suppl 1): 107.
14. Hidaro S, Ando M. Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. Arch Toxicol 1996; 70: 249-251.
15. Zhan XA, Wang M, Xu ZR, Li WF, Li JX. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs. Arch Toxicol 2005; 78: 145-156.
16. Gutiérrez Salinas J, Morales González JA. La ingestión de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. Rev Mex Cien Farm 2006; 37 (3): 11-22.
17. Darmani H, Al-Hiyasat AS, Elvetieha AM. Effects of sodium fluoride in drinking water on fertility in female mice. Fluoride 2001; 34: 242-249.
18. Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna Bhat P, Rao S. Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. Fluoride 2002; 35: 197-203.
19. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. Biochem Mol Biol Int 1993; 29: 263-270.
20. Lokaj V, Oburkova P. Tetrazolium-reductase activity in leucocytes. Immunol Zprav 1975; 6: 42-44.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 195: 265-275.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
23. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding. Current status and out-look. J Immunol Methods 1984; 72: 313-340.
24. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA, Vargas-Castro LD, Marichi-Rodríguez F, Esquivel-Soto J. Changes in laminin expression in periodontal ligament from teeth subject to orthodontic pressure in humans. Rev ADM 2005; 62: 171-176.
25. Heindel JJ, Bates HK, Price CJ, Marr MC, Myers CB, Schwetz BA. Developmental toxicity evaluation of sodium fluoride administered to rats and rabbits in drinking water. Fundam Appl Toxicol 1996; 30: 162-177.
26. DenBesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. J Dent Res 1986; 65: 1272-1277.
27. Denvesten PK. Mechanism and timing of fluoride effects on developing enamel. J Public Health Dent 1999; 59: 247-251.
28. Reumaux D, Boer M, Meijer AB, Duthilleul P, Roos D. Expression of myeloperoxidase (MPO) by neutrophils is necessary for their activation by anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) against MPO. J Leukoc Biol 2003; 73: 841-849.
29. Lieschke GJ, Oates AC, Alister CC, Layton JE. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. Blood 2001; 98: 3087-3096.
30. Yang J, Duerksen-Hughes P. A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. Carcinogenesis 1998; 19: 1117-1125.
31. Shashi A. *In vivo* studies concerning toxic effects of sodium fluoride on hepatic function in rabbits. Fluoride 2003; 36: 30-37.
32. Zhi-Zhong G, Pei-Si Y, Nai-Den Y, Zong-Jie Z. An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. Fluoride 1989; 22: 112-118.