



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA HUMANA**

**“EFECTOS DEL ALUMINIO  
Y DE LA HEPATECTOMÍA PARCIAL  
SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL HIERRO  
Y PARÁMETROS SANGUÍNEOS RELACIONADOS  
CON SU METABOLISMO EN RATAS”**

**Autor: María del Carmen Ada Contini**

**Directora: Dra. Cristina E. Carnovale**

**Co-Director: Dr. Claudio A. Bernal**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR**

**SANTA FE  
2006**

*A mis padres, por la generosidad de regalarme la vida.  
A mi esposo, con quien comparto cada minuto de mi existencia.  
A mis hijos, que son mi orgullo y mi desvelo.*

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis fueron publicados en revistas y presentados en reuniones científicas que se enumeran a continuación.

## **TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS**

- “Efecto del aluminio sobre la absorción y reservas plasmáticas de hierro en ratas con hepatectomía parcial”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. XII Congreso Latinoamericano de Nutrición SLAN. Buenos Aires, 12 al 16 de noviembre de 2000. Argentina.
- “Intoxicación subcrónica con aluminio: análisis del metabolismo de hierro en ratas con hepatectomía parcial”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. IV Congreso Rosarino XX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 4 y 5 de diciembre de 2000.
- “Metabolismo del hierro en ratas con hepatectomía parcial: influencia del sexo y del aluminio”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. XXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 26 y 27 de noviembre de 2001.
- “Hierro (Fe) y estrés oxidativo en intestino de ratas parcialmente hepatectomizadas y tratadas con aluminio (Al)”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. V Congreso y XXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 4 y 5 de diciembre de 2002.

- “Colesterol plasmático, forma y deformabilidad eritrocitaria en ratas tratadas con aluminio (Al) y hepatectomizadas. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Carnovale, Cristina. XXIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario, 4 y 5 de diciembre de 2003.
- “Deformabilidad y resistencia osmótica eritrocitaria en ratas tratadas con aluminio (Al) y hepatectomizadas. Posible relación con el colesterol plasmático”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Chiarotto, Marcelo; Carnovale, Cristina. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) XLVII Reunión Científica y Sociedad Argentina de Inmunología (SAI) LI Reunión Científica. Mar del Plata, 19 al 22 de noviembre de 2003. Argentina.
- “Transporte intestinal de glucosa en regeneración hepática de ratas expuestas crónicamente al aluminio”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. Congreso Alimentación Siglo XXI. Asociación Latinoamericana de Nutrición. Mendoza, 2 al 4 de octubre de 2003. Argentina.
- “Efectos del aluminio (Al) sobre la viscosidad plasmática de ratas hepatectomizadas: análisis de la influencia de proteínas”. Contini, María del Carmen; Mahieu, Stella; González, Marcela; Carnovale, Cristina; Bernal, Claudio. Reunión Anual de CASLAN y XXVII Jornadas de Nutrición y Salud. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Santa Fe, 11 al 13 de noviembre de 2004. Argentina.
- “Influencia del fibrinógeno y colesterol plasmático sobre el comportamiento fluido de la sangre en ratas tratadas con aluminio y hepatectomizadas”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Hernández, Gladis; Mahieu, Stella; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. Congreso

Conjunto de Sociedades Biomédicas. Mar del Plata, 16 al 20 de noviembre de 2004. Argentina.

- “Grado de ordenamiento de la bicapa lipídica de eritrocitos de ratas tratadas con aluminio(Al) y hepatectomizadas (HP)”. Contini, María del Carmen; Gennaro, Ana María; González, Marcela; Mahieu, Stella; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas. Mar del Plata, 16 al 20 de noviembre de 2004. Argentina.
- “Estudio de la cinética de agregación eritrocitaria en ratas tratadas con aluminio (Al) y parcialmente hepatectomizadas (HP)”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; González, Marcela; Mahieu, Stella; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas. Santa Fe, 16 al 18 de junio de 2005. Argentina.
- “Homeostasis del hierro en ratas tratadas con aluminio”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Mahieu, Stella; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. XXVIII Reunión anual de CASLAN y XXII Jornadas Regionales de Bromatología y Nutrición. Gualeguaychú, 13 y 14 de octubre de 2005. Entre Ríos. Argentina.

## **PUBLICACIONES DE RESÚMENES**

- “Subchronic intoxication with aluminium: Analysis of iron metabolism in partially hepatectomized rats”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. Biocell. ISSN: 0327-9545. 25 (2). 203. Mendoza. Argentina.2001.

- “Iron metabolism in rats with partial hepatectomy: influence of sex and of aluminum”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. *Biocell*. ISSN: 0327-9545. 26 (1).124. Mendoza, Argentina. 2002.
- “Colesterol plasmático, forma y deformabilidad eritrocitaria en ratas tratadas con aluminio (Al) y hepatectomizadas”. Contini, María del Carmen; Bazzoni Graciela; Carnovale, Cristina. *Publicación anual XXIII Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario*. ISSN: 1668-0154. 48. Rosario. Argentina. 2003.
- “Deformabilidad y resistencia osmótica eritrocitaria en ratas tratadas con aluminio (Al) y hepatectomizadas. Posible relación con el colesterol plasmático (Co)”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Chiarotto, Marcelo; Carnovale, Cristina. *Revista Medicina*. Buenos Aires. ISSN: 00257680. 63 N° 5/2. 554. Buenos Aires. Argentina. 2003.
- “Iron (Fe) and stress oxidative in intestine of partially hepatectomized aluminum (Al) treated rats”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. *Biocell*. ISSN: 0327-9545. 27 (2). 240. Mendoza. Argentina. 2003.
- “Plasmatic cholesterol, erythrocyte shape and deformability in aluminium (Al) treated and hepatectomised rats”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Carnovale, Cristina. *Biocell*. ISSN: 0327-9545. 28 (2). 214. Mendoza. Argentina. 2004.
- “Influencia del fibrinógeno y colesterol plasmático sobre el comportamiento fluido de la sangre en ratas tratadas con aluminio y hepatectomizadas”. Contini, María del Carmen; Bazzoni, Graciela; Hernández, Gladis; Mahieu, Stella; González, Marcela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. *Revista*

Medicina. ISSN 0025-7680. 64 (supl II). 190. Buenos Aires. Argentina. 2004.

- “Grado de ordenamiento de la bicapa lipídica de eritrocitos de ratas tratadas con aluminio(Al) y hepatectomizadas (HP)”. Contini, María del Carmen; Gennaro, Ana María; González, Marcela; Mahieu, Stella; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina. Revista Medicina. ISSN 0025-7680. 64 (supl II). 190. Buenos Aires. Argentina. 2004.

## **PUBLICACIONES DE TRABAJOS COMPLETOS**

### **NACIONALES**

- “Evaluación de eventos antioxidantes en mucosa intestinal de ratas en regeneración hepática tratadas con aluminio”. Contini, María del Carmen; González, Marcela; Mahieu, Stella; Carnovale, Cristina; Bernal, Claudio. FABICIB. Revista Anual de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. ISSN 0329-5559. 8. 59-66. Santa Fe. Argentina. 2004.
- “Alteración de parámetros reológicos en sangre de ratas crónicamente expuestas al aluminio y con hepatectomía parcial”. Contini, María del Carmen; Bernal, Claudio; González, Marcela; Mahieu, Stella; Carnovale, Cristina. FABICIB. Revista Anual de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. ISSN 0329-5559.10. 11-19 Santa Fe. Argentina. 2006.

### **INTERNACIONALES**

- “Study of iron homeostasis following partial hepatectomy in rats with chronic aluminum intoxication”. Contini, María del Carmen; Ferri, Alejandro; Bernal,

Claudio; Carnovale, Cristina E. *Biological Trace Element Research*. Vol. 115. 2006. (En prensa).

- “Study of hemorheological parameters following partial hepatectomy in rats with chronic aluminum intoxication”. Contini, María del Carmen; Mahieu, Stella; Bazzoni, Graciela; Bernal, Claudio; Carnovale, Cristina E. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. Vol. 35. pág.431-439. 2006.



	Pág.
<b>ÍNDICE</b>	1
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	5
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	8
1.2. ALUMINIO	
1.2.1. Generalidades	9
1.2.2. Aluminio en soluciones acuosas y líquidos biológicos	11
1.2.3. Efectos tóxicos del aluminio	14
1.3. HEPATECTOMÍA	
1.3.1. Cirugía Hepática	16
1.3.2. Proliferación de hepatocitos	18
1.3.3. Nutrición y Proliferación celular	19
1.3.4. Hepatectomía y estrés oxidativo	20
1.4. METABOLISMO DEL HIERRO	
1.4.1. Generalidades	21
1.4.2. Transporte de hierro por las células de la mucosa intestinal	22
1.4.3. Transporte sérico de hierro por la transferrina	25
1.4.4. Transporte intracelular de hierro	26
1.4.5. Homeostasis celular del hierro	27
1.4.6. Hierro y estrés oxidativo	29
1.4.7. Hierro y fluidez sanguínea	32
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	
2.1. OBJETIVO GENERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA</b>	
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	40
3.2. TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES	40
3.2.1. Procedimientos Quirúrgicos	41
3.2.2. Evaluación del proceso de regeneración hepática	43

3.2.3. Determinación del contenido de aluminio	44
3.3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	
3.3.1. Parámetros hemáticos	44
3.3.1.1. Hematocrito (Hto)	44
3.3.1.2. Concentración de Hemoglobina (Hb)	44
3.3.1.3. Volumen corpuscular medio (VCM)	45
3.3.1.4. Hemoglobina corpuscular media (HCM)	45
3.3.1.5. Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	45
3.3.2. Parámetros séricos	
3.3.2.1. Determinación de hierro sérico	46
3.3.2.2. Determinación de transferrina sérica	46
3.4. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO ( $^{59}\text{Fe}$ ). MODELO DE ASA INTESTINAL IN SITU	46
3.5. PREPARACIÓN DEL TEJIDO INTESTINAL	47
3.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	
3.6.1. Determinación del contenido de hierro en tejido hepático e intestinal	48
3.6.2. Evaluación del nivel de lipoperoxidación de las células intestinales	48
3.6.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de las células intestinales	49
3.6.3.1. Contenido de glutation (GSH)	49
3.6.3.2. Determinación de la actividad glutation peroxidasa	50
3.6.3.3. Determinación de la actividad enzimática de catalasa	51
3.6.4. Medida de la concentración de proteínas en la mucosa intestinal	51
3.7. ANÁLISIS DE PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS	51
3.7.1. Filtrabilidad	52
3.7.2. Viscosidad de sangre entera ( $\eta_s$ )	52
3.7.3. Viscosidad plasmática ( $\eta_p$ )	52
3.7.4 Viscosidad sanguínea relativa corregida	53

3.7.5. Forma celular	53
3.7.6. Agregación eritrocitaria	54
3.7.7. Fragilidad osmótica	55
3.7.8. Análisis de la fluidez de las membranas de los glóbulos rojos	55
3.7.9. Dosaje de colesterol de membrana de eritrocitos	59
3.8. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN SANGRE	
3.8.1. Colesterol total	60
3.8.2. HDL colesterol	60
3.8.3. LDL-colesterol	61
3.8.4. Triglicéridos	61
3.8.5. Fibrinógeno	61
3.8.6. Proteínas totales	62
3.8.7. Albúmina	62
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b>	
4.1. CONTENIDO DE ALUMINIO EN SUERO, TEJIDO HEPÁTICO E INTESTINAL	64
4.2. ESTIMACIÓN DEL PROCESO PROLIFERATIVO	65
4.3. ESTUDIO DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	66
4.4. TRANSPORTE INTESTINAL DE HIERRO ( <sup>59</sup> Fe)	68
4.5. CONCENTRACIONES DE HIERRO EN HÍGADO Y MUCOSA INTESTINAL	69
4.6. NIVEL DE LIPOPEROXIDACIÓN DE LAS CÉLULAS INTESTINALES	71
4.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS INTESTINALES	72
4.7.1. Contenido de glutation (GSH)	72
4.7.2. Actividad de la enzima glutation peroxidasa (GSH-Px)	73
4.7.3. Actividad de la enzima catalasa (CAT)	74
4.8. PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS	75
4.8.1. Índice de rigidez	75

4.8.2. Viscosidad plasmática	76
4.8.3. Viscosidad sanguínea relativa corregida a hematocrito 40%	77
4.8.4. Forma celular	78
4.8.5. Agregación eritrocitaria	79
4.8.6. Fragilidad osmótica	80
<b>4.9. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA FLUIDEZ DE MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS</b>	
4.9.1. Contenido de colesterol en la membrana de eritrocitos	82
4.9.2. Fluidéz de la membrana eritrocitaria	82
<b>4.10. PARÁMETROS RELACIONADOS AL COMPORTAMIENTO HEMORREOLÓGICO</b>	
4.10.1. Concentración de fibrinógeno plasmático	85
4.10.2. Niveles de colesterol total en plasma	87
4.10.3. Niveles de colesterol HDL y colesterol LDL en plasma	88
4.10.4. Niveles de triglicéridos en plasma	90
4.10.5. Niveles de proteínas totales, albúmina y relación albúmina/ globulinas	90
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	92
<b>CAPÍTULO 6: RESUMEN – SUMMARY</b>	102
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA</b>	109
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	128

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\tau$ : tensión

$\gamma$ : velocidad de cizallamiento

$\eta_{rHto\ 40\%}$ : viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto estándar de 40%

$\eta_p$ : viscosidad plasmática

$\eta_s$ : viscosidad de sangre entera

$2K_2 n_0$ : velocidad del proceso de agregación

ADN: ácido desoxirribonucleico

Al: aluminio

ALAS: aminolevulinato sintetasa

ANOVA: análisis de variancia paramétrico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosin trifosfato

C: control

CAT: catalasa

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media

cp: centipoisse

DCT1: divalent cation transporter

DMT1: transportador de metales divalentes

DTNB: 5,5 ditiobis (2 ácido nitrobenzoico)

EDTA: tetra acetato de etilendiamina

EEM: error estándar de la media

EPR: resonancia paramagnética nuclear

Fe: hierro

fl: fentolitros  
Fpn: ferroportina  
GK: glicerol kinasa  
GPO: glicerol fosfato oxidasa  
GR: glóbulo rojo  
GSH: glutation reducido  
GSH-Px: glutation peroxidasa  
GSSG: glutation oxidado  
GTPasa: guanosina trifosfatasa  
Hb: hemoglobina  
HCM: hemoglobina corpuscular media  
HDL: lipoproteína de alta densidad  
HP: hepactotomía parcial  
Hto.: hematocrito  
IκB: inhibidor kappa B  
i.p.: intraperitoneal  
IM: índice morfológico  
IR: índice de rigidez  
IRE: iron responsive element  
IREG1: proteína de transmembrana transportadora de hierro  
IRP: iron regulatory proteins  
IRPs: proteínas citosólicas reguladoras del hierro  
KDa: kilo Dalton  
LDL: lipoproteínas de baja densidad  
LPO: lipoperoxidación  
MDA: ácido malondialdehído  
MTP1: metal transporter protein  
NADH: nicotin adenin dinucleótido (forma reducida)  
NADPH: nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (forma reducida)  
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratoty Standards  
NFκB: factor nuclear kappa B

Nramp2: natural resistance associated macrophage protein  
NTBI: hierro no unido a transferrina  
PBTS: piridil bis-fenil triazina sulfonato  
PM: peso molecular  
PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo ( $\alpha$ -toluen sulphonyl fluoride)  
POD: peroxidasa  
ROS: sustancias oxígeno reactivas  
RTf: receptor de transferrina  
S: grado de ordenamiento  
SASL: ácido doxil esteárico  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
SH: sham (cirugía simulada)  
 $S_0/n_0$  = coeficiente de agregación  
SOD: superóxido dismutasa  
TBA: ácido tiobarbitúrico  
TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricloroacético  
Tf: transferrina  
UTR: regiones no codificantes o no traducidas  
VBC: colorante bromo cresolsulfon ftaleína o verde de bromocresol  
VCM: volumen corpuscular medio  
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad  
 $X_{50}$ : resistencia osmótica

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La exposición humana oral al aluminio ha aumentado durante las últimas décadas por diferentes causas: así, por ejemplo, la aplicación de determinados métodos de purificación del agua se traduce en la aparición del aluminio en el agua potable como contaminante (Yokel y McNamara, 2001); al igual que en la elaboración de productos alimenticios tales como cereales, queso, sal, etc. (Nieboer y col., 1995; Saiyed y Yokel, 2005).

Asimismo, los productos farmacéuticos, los cosméticos y los tratamientos médicos constituyen una importante fuente de incorporación de aluminio. Por ejemplo, el hidróxido del aluminio se utiliza como antiácido y como adyuvante en vacunas; y los desodorantes también contribuyen significativamente a la exposición del ser humano al aluminio (Yokel y McNamara, 2001). También en pacientes dializados (Alfrey y col., 1976) y en aquellos sometidos a nutrición parenteral total durante lapsos prolongados, se ha observado una mayor acumulación de aluminio en diversos órganos, producto de su elevada exposición (Klein, 1993).

Los efectos tóxicos del aluminio en el ser humano incluyen encefalopatías (Alfrey y col., 1976), enfermedades óseas (Ward y col., 1978) y anemia (Vittori y col., 1999). También se encontró un alto contenido de aluminio en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer, donde el metal se puede co-depositar con el  $\beta$  amiloide (Solomon y col., 2001; Exley y col., 1993).

Por lo tanto, debido a su ubicuidad y a la exposición durante el transcurso de la vida, aun las personas sanas no están exentas de la potencial acción deletérea del aluminio.

En relación a la hepatectomía parcial en los seres humanos, las resecciones de segmentos o de lóbulos hepáticos son el tratamiento de elección para los tumores primarios o metastáticos hepáticos. También se someten a hepatectomía parcial los donantes vivos, cuyo hígado debe proliferar con posterioridad a la cirugía (Fausto, 2000). En los últimos años, el número de resecciones hepáticas realizadas ha aumentado significativamente debido al desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas que permiten que la cirugía presente menos riesgos para la supervivencia de los pacientes (Skullman y col., 1994; Ravi y col., 1995).

A su vez, es bien conocido que, para la recuperación de la masa y las funciones del hígado después de una hepatectomía parcial es fundamental un adecuado estado nutricional, siendo el hierro uno de los nutrientes más importantes (Milin y col., 2005); lo antedicho es justificado por el requerimiento de este nutriente para la síntesis de una amplia gama de proteínas fundamentales tales como proteínas de transferencia de electrones, hemoglobina y ribonucleótido reductasa necesarias para el metabolismo, el crecimiento y la proliferación celular (Rolfs y Hediger, 1999).

De aquí la importancia que los resultados obtenidos en esta investigación pueden aportar a los conocimientos básicos sobre el metabolismo y la regulación del hierro en personas expuestas crónicamente al aluminio y que deban ser sometidas a cirugías resectivas de la masa hepática.

## **1.2. ALUMINIO**

### **1.2.1. Generalidades**

El aluminio (Al) es el tercer elemento más común en la tierra después del oxígeno y del silicio, existiendo primariamente como aluminosilicatos polimorfos en rocas y

suelos. El 28% de la abundancia relativa de ambos elementos favorece la formación de aluminosilicatos, los cuales son insolubles (Cox, 1995). De esta manera se alcanza un equilibrio geoquímico natural que reduce la biodisponibilidad del aluminio (Exley y Birchall, 1992). Sin embargo, la creciente acidificación del ambiente ha aumentado tanto la solubilización como la conversión de los aluminosilicatos en especies biológicamente activas incrementando la biodisponibilidad del aluminio (Exley y col., 1997).

El aluminio no constituye un elemento esencial para los organismos vivos, ya que no se han descrito mecanismos biológicos que lo involucren con procesos metabólicos (Exley y Birchall, 1992).

Por su ubicuidad en el ambiente, la exposición de la población al aluminio es prácticamente sostenida a lo largo de la vida y puede dar como resultado una sustancial acumulación corporal del mismo. Como se dijo, la exposición tiene su origen en el uso del aluminio en medicina, en la industria farmacéutica, en la elaboración de vacunas, en la preparación de soluciones de soporte nutricional y alimentos, en la manufactura de cosméticos y antitranspirantes, en la fabricación de envoltorios y latas, y a su presencia en el agua de bebida y en el polvo atmosférico (Flaten y col., 1997).

La presencia del aluminio en el agua de bebida deriva de su fuente natural y de los métodos empleados para la potabilización. La cantidad de aluminio que permanece en solución en el agua de red depende de la concentración residual, del pH y de otras sustancias. Sin embargo, en comparación con otras, esta fuente de exposición representa una pequeña proporción de la ingesta diaria de aluminio. La presencia de ciertas especies solubles de aluminio, de bajo peso molecular, químicamente reactivas y más fácilmente absorbibles, sería la responsable de la mayor biodisponibilidad del catión en el medio (Rondeau y Commengenes, 2001).

El contenido de aluminio en los alimentos es altamente variable por su empleo generalizado no sólo en la manufactura sino también durante el almacenaje en contenedores como latas y envoltorios (Pennigton y Schoen, 1995; Greger y Sutherland, 1997). El aluminio es adicionado como aditivo a alimentos derivados de cereales, quesos procesados, durante el procesamiento industrial de conservas de

frutas y es un componente habitual en polvos de hornear, agentes emulsionantes alimentarios y conservadores. Otras fuentes están constituidas por las vacunas, donde el aluminio es utilizado como adyuvante, y por los líquidos de hemodiálisis y formulaciones de soporte nutricional, incluyendo soluciones de nutrición parenterales y enterales. El aluminio también está presente en los cosméticos, como por ejemplo en los antitranspirantes, lo que podría afectar la salud, ya que se ha comprobado que estos compuestos podrían ser absorbidos a través de la piel e incorporarse a la circulación general (Exley, 1998).

Otro aspecto significativo, lo constituye el riesgo de exposición ocupacional vinculado al ingreso del metal a través de la piel o por la inhalación de polvos, vapores y humos al que se ven sometidos los trabajadores de refinerías, fundiciones, canteras, minas e industrias que trabajan con aluminio (Yokel y McNamara, 2001).

### **1.2.2. Aluminio en soluciones acuosas y líquidos biológicos**

En la mayoría de los sistemas naturales sólo una muy pequeña fracción de aluminio se encuentra como ión acuoso simple  $Al^{+3}$ . Así, la absorción, excreción, retención tisular y depósitos estarían dependiendo de las propiedades de los complejos de  $Al^{+3}$  formados con ligandos biológicos (Harris y col., 1997).

El pH fisiológico del entorno celular de los organismos vivos oscila alrededor de 7,40. Los conceptos de biodisponibilidad y toxicidad potencial del aluminio carecen de sentido si no se tiene en cuenta el comportamiento químico del metal en soluciones acuosas neutras.

Como catión trivalente, el aluminio se une fuertemente a ligandos donantes de oxígeno tales como el citrato y el fosfato. La coordinación química del aluminio es variada por la tendencia de los complejos de aluminio a hidrolizarse y formar especies polinucleares, muchas de las cuales son escasamente solubles.

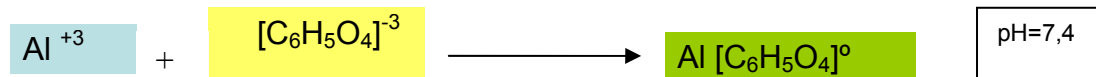
En un sistema acuoso, la hidrólisis de aluminio produce una mezcla compleja de especies mononucleares. A pH menor de 5 existe en solución como una especie hexahidratada  $[Al (H_2O)_6]^{+3}$  la cual sufre sucesivas desprotonaciones a medida que

aumenta el pH. En soluciones neutras precipita  $\text{Al}(\text{OH})_3$  el cual se disuelve en medios alcalinos para formar  $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$  predominante a pH mayor de 6,20. Cuando los valores de pH están comprendidos entre 5,00 y 6,20 se verifica la presencia de una mezcla de todas las especies mencionadas (Martin, 1986; Martin, 1997). La biodisponibilidad y en consecuencia la toxicidad del aluminio dependen de la identidad química de la especie reactiva y de la capacidad de los ligandos presentes en el medio, para interferir en la esfera de hidratación del ión metálico. La especie capaz de reaccionar con ligandos inorgánicos, orgánicos o proteínas en el medio intracelular y extracelular, es el aluminio libre no hidrolizado, es decir,  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+3}$  o  $\text{Al}^{+3}$ .

Las sustancias inorgánicas que pueden influenciar la especiación del  $\text{Al}^{+3}$  coordinan a través de los átomos de Carbono, Nitrógeno, Oxígeno, Azufre, Flúor y Fósforo. La formación de complejos mononucleares estables con fosfato, fluoruro, sulfato y silicato, compite con las reacciones de hidrólisis. En soluciones neutras sólo tienen probabilidad de existencia los complejos con fosfato y fluoruro, aunque con el fosfato predomina la reacción de precipitación (Öhman y Sjöberg, 1988).

Los ligandos orgánicos de mayor interés con los que el aluminio puede formar complejos son aquellos que predominan en sangre como los ácidos policarboxílicos oxálico y cítrico; los monocarboxílicos láctico, acético y propiónico y las proteínas.

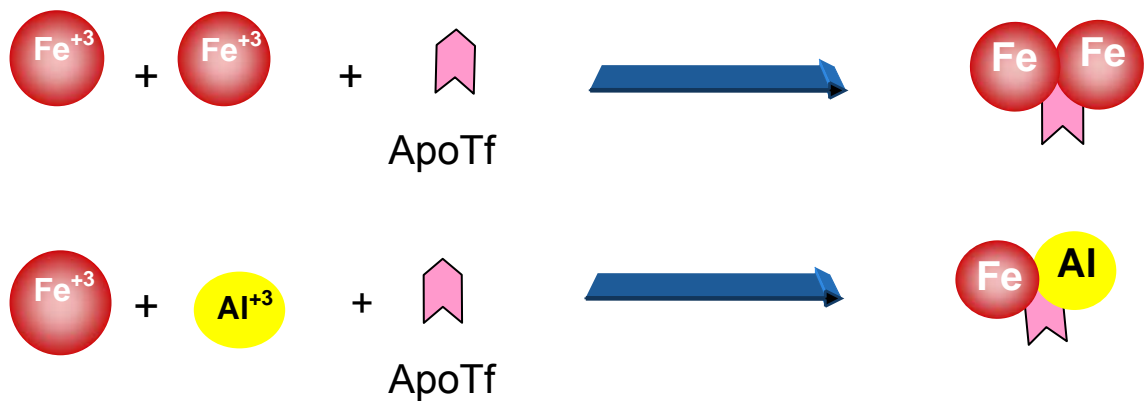
El anión citrato constituye la molécula pequeña más importante capaz de comportarse como potencial ligando del  $\text{Al}^{+3}$ . A pH 7,4 el citrato se halla como trianión y reacciona con el metal no hidrolizado para formar un complejo con carga neta cero. El complejo neutro  $\text{AlCit}^0$  merece especial atención ya que traspasa las membranas biológicas con suma facilidad (Martin, 1986; Öhman y Sjöberg, 1988).



El ligando orgánico más efectivo para el  $\text{Al}^{+3}$  es la proteína transferrina. Con dos sitios disponibles para ligar metales, la transferrina, normalmente tiene entre un 15 a un 55% de su capacidad de unión saturada con el  $\text{Fe}^{+3}$ , ión por el que tiene gran afinidad (Martin y col, 1987; Ganrot, 1986; Harris y Sheldon, 1990).

Algunos estudios sugieren que el aluminio podría unirse débilmente a la albúmina en los sitios de unión del calcio, jugando un rol de poca importancia en el transporte del aluminio en suero (Fatemi y col., 1992; Harris y col., 1997).

En la **Figura 1.1** se esquematiza la interacción entre la apotransferrina y los iones  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$ .



**Figura 1.1:** Unión de la transferrina (Tf) al hierro y al aluminio.

Con la ayuda de sofisticados programas de computación, se realizaron estudios de simulación de la especiación del aluminio en condiciones plasmáticas hipotéticas pero los esfuerzos han sido limitados por lo incierto de la estabilidad de las constantes de los complejos de bajo peso molecular del aluminio con citrato, fosfato e hidróxido (Harris y col., 1997).

La habilidad de diferentes ligandos para solubilizar y transportar  $\text{Al}^{+3}$  a diversos tejidos donde se debe producir la reacción de intercambio para transferir el aluminio entre el ligando y los grupos funcionales de las moléculas blanco, es muy variable dependiendo de la especiación. Este es el motivo primario, si no el exclusivo, por el cual algunos complejos de aluminio son más tóxicos que otros. Compuestos de aluminio con diferente estabilidad hidrolítica y con distintas propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas pueden desencadenar efectos biológicos diferentes tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos (Zatta, 1997).

### 1.2.3. Efectos tóxicos del aluminio

El aluminio acumulado en los tejidos puede inducir toxicidad, sin embargo, su mecanismo no ha sido aún perfectamente definido y puede diferir de acuerdo a los distintos tejidos y sistemas. El aluminio está unido a fosfatos fuertemente básicos, como nucleósidos di o trifosfatos. Los grupos fosfatos de cualquier proteína fosforilada, junto a carboxilos u otro fosfato yuxtapuesto constituyen sitios de unión para el  $Al^{+3}$ , pudiendo ser importante su interferencia con una variedad de procesos metabólicos celulares. Su unión es débil con fosfatos no básicos de los polímeros de ácidos nucleicos en la célula (ADN y ARN) (Martin, 1997).

Se ha propuesto que los efectos tóxicos del aluminio sobre los tejidos pueden explicarse por mecanismos generales de acción, entre los que se destacan: a) disrupción de las membranas celulares, b) alteración del metabolismo mineral, c) daño peroxidativo y d) interacción con la proteína G (guanosina) (Jeffery y col., 1997). El aluminio podría afectar las membranas celulares por su unión a componentes de la misma, por alteración del funcionamiento de compuertas de canales iónicos o por aumento de la lipoperoxidación. La unión del  $Al^{+3}$  a moléculas de fosfolípidos en la membrana celular puede alterar las propiedades fisicoquímicas de las mismas modificando su composición y funcionamiento. Esto puede producir cambios en la homeostasis del calcio intracelular provocando diversos signos de toxicidad celular (Jeffery y col., 1997).

Los efectos reconocidos de intoxicación crónica de aluminio sobre la biodisponibilidad de los metales esenciales incluyen al hierro, cobre, zinc, manganeso y al magnesio (Abreo y col., 1994; Perez y col., 2002; Röllin y col., 1993; Golub y col., 1993; Miller y col., 1989).

Si bien el aluminio tiene un número de oxidación fijo y no puede participar directamente en reacciones de óxido – reducción, la peroxidación lipídica está

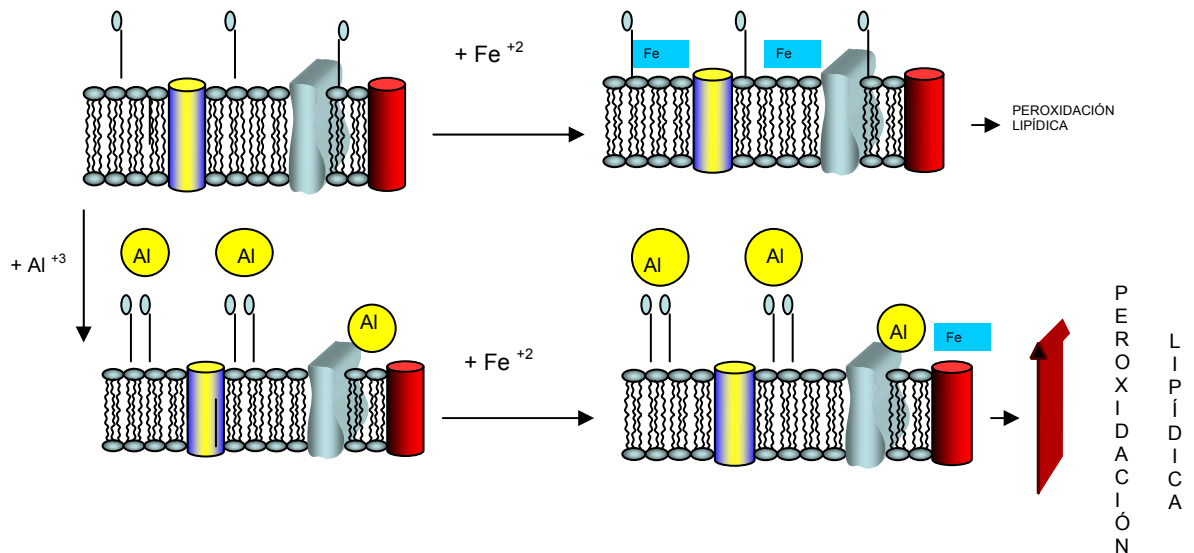
aumentada en presencia del mismo, haciendo a las células más susceptibles al efecto de los radicales libres (Domínguez y col., 1995).

Los mecanismos por los cuales el aluminio induce peroxidación son desconocidos, aunque pueden involucrar alteraciones en el metabolismo del hierro, dando como resultado una mayor disponibilidad de hierro intracelular libre y reducido (Xie y Yokel., 1996; Jeffery y col., 1997).

Los estudios de Van Rensburg y col. (2000) confirmaron que la transferrina se une tanto al hierro como al aluminio. El aluminio exagera el daño inducido por el hierro a la membrana celular a bajo pH, pudiendo la transferrina actuar como “caballo de Troya”, conduciendo los iones de los metales (Fe y Al) dentro de la célula, siendo capaces de causar daño oxidativo (Van Rensburg y col., 2000).

El aluminio puede promover la peroxidación desencadenada por el hierro, a través de su unión a fosfolípidos de membrana, induciendo cambios en su organización y en la distribución de lípidos que pueden facilitar la propagación de la peroxidación lipídica (Gutteridge y col., 1985; Oteiza, 1994; Verstraeten y col., 1998).

En la **Figura 1.2** se presenta en forma esquemática la interacción del aluminio con fosfolípidos de la membrana en presencia del ión  $Fe^{+2}$ .



**Figura 1.2:** Acción del aluminio como pro-oxidante en las membranas.



Otro mecanismo propuesto está vinculado con la formación de un radical iónico superóxido de aluminio  $[AlO_2^{\bullet}]^{+2}$ , debido a la interacción entre el metal y el anión radical superóxido  $[O_2^{\bullet-}]$ , que podría explicar, en parte, la actividad pro-oxidante del aluminio (Kong y col., 1992; Exley, 2004).

Cierto número de evidencias indican que el aluminio acumulado intracelularmente es responsable de efectos estimulatorios e inhibitorios de procesos celulares. Estos efectos suelen ser bifásicos, estimulatorios a bajas concentraciones e inhibitorios a altas concentraciones (Exley y Birchall, 1992).

Frecuentemente la respuesta celular está asociada con los sistemas de los segundos mensajeros, sugiriéndose como mecanismo tóxico la interferencia del aluminio sobre el ciclo de la enzima GTPasa (guanosina trifosfatasa), particularmente sobre la función de la proteína G, lo que podría producir profundos efectos sobre la función celular (Exley y Birchall, 1992).

Otros eventos intracelulares, tales como un inadecuado aporte de energía debido a la formación de complejos de Al-ATP, y la perturbación de funciones nucleares, podrían estar involucrados en la disfunción celular inducida por el aluminio (Nesse y Garbossa, 2001).

### **1.3. HEPATECTOMÍA**

#### **1.3.1. Cirugía Hepática**

Por muchos años el hígado ha sido un órgano misterioso desde el punto de vista quirúrgico. A comienzos del siglo XX, era un órgano “*do not touch me*”, por su anatomía compleja, el número de funciones y la profusa circulación sanguínea.

En los últimos años, el avance en el conocimiento de la fisiología y la fisiopatología del hígado, ha permitido que la cirugía hepática avanzara adquiriendo nuevas técnicas quirúrgicas, estableciendo menores restricciones para la realización de estos procedimientos quirúrgicos, observándose tasas menores de morbilidad y mortalidad (Chari y Beauchamp, 1995).

La cirugía divide a las enfermedades hepáticas en dos categorías básicas: operables o no-operables. Para los tumores malignos primarios o secundarios, la resección constituye la única oportunidad de curación, ya que el trasplante no ha dado buenos resultados. En cuanto a los tumores benignos, las indicaciones quirúrgicas no son frecuentes. Dentro de la categoría de operables están las enfermedades hepáticas que conducen directamente a la indicación del trasplante (Chari y Meyers, 1993).

La indicación de trasplante hepático incluye a una serie de enfermedades como la cirrosis (post-hepática, autoinmune, criptogénica), la enfermedad hepática colestásica (cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar), el neoplasma, la falla hepática fulminante y el error congénito del metabolismo. En materia de tumores malignos el trasplante sólo proporciona buenos resultados para lesiones de pequeño volumen. Los tumores voluminosos no pueden ser objeto sino de un hepatectomía parcial, que en la actualidad no representan un problema técnico (Huguet, 1993).

Se ha realizado un gran esfuerzo para elegir el mejor tratamiento para una gran cantidad de complicaciones que se presentan en los pacientes que han sido sometidos al trasplante del hígado. Estas complicaciones pueden incluir sangrado post-operatorio, complicaciones técnicas con las anastomosis biliares y vasculares múltiples, infecciones y disfunciones del injerto. Los avances en la preservación del órgano, las técnicas quirúrgicas y los cuidados peri- y post-operatorios han permitido controlar las complicaciones post-quirúrgicas (Reyes y col., 1996).

En humanos, las resecciones de segmentos o de lóbulos hepáticos se realizan para la remoción de tumores y en las situaciones en que debe llevarse a cabo trasplantes a partir de donantes vivos. Los ejemplos de deficiencia funcional hepática involucran necrosis celular y tisular causada principalmente por sustancias químicas y virus (Fausto, 2000). Frente a los estímulos mencionados, los hepatocitos en estadio quiescente (fase  $G_0$  del ciclo celular) se transforman en células proliferativas y proliferan para restaurar tanto la masa perdida como la capacidad funcional. El punto de regulación del crecimiento está dado por la relación entre la masa hepática y la masa corporal, más que por la masa hepática *per se*. La relación

masa hepática/masa corporal adecuada indica que el hígado ha alcanzado un estado en el cual realiza la cantidad de trabajo metabólico necesario para cubrir los requerimientos funcionales del organismo. La capacidad de regulación de la masa hepática no se da solamente en el sentido del crecimiento, sino que también, cuando la masa hepática excede las demandas funcionales, el hígado pierde masa para restaurar el balance entre la masa hepática y la masa corporal. Esto ocurre en la finalización de los tratamientos con drogas que producen hiperplasia hepática seguida de hipertrofia. Cuando cesa el estímulo de crecimiento, se produce la muerte celular por apoptosis de los hepatocitos y restauración de la masa normal (Schulte-Hermann y col., 1995).

El trasplante de un hígado grande en un receptor más pequeño (denominado “*large for size*”) crea una situación en la cual la capacidad funcional del hígado excede las demandas metabólicas. En estos casos se produce apoptosis, de modo que la masa hepática disminuye hasta alcanzar el punto óptimo de equilibrio (Kam y col., 1987).

### **1.3.2. Proliferación de hepatocitos**

Los organismos compensan los daños tisulares por estimulación de la división celular intentando reemplazar las células muertas, con la consecuente restauración de la estructura y la función. En estudios de dosis-respuesta se ha demostrado que la estimulación de la división celular y la reparación tisular son procesos biológicos que ocurren simultáneamente como respuesta a la injuria celular (Rao y Mehendale, 1991; Mangipudy y col., 1995).

Los mecanismos que regulan la proliferación de las células hepáticas son de interés biomédico con aplicación directa en clínica médica. La proliferación de los hepatocitos es crítica para la supervivencia del paciente en muchas enfermedades hepáticas.

Cuando la habilidad regenerante del hígado está alterada se produce la muerte. Si la división celular puede ser estimulada después de un daño hepático masivo por

algún mecanismo terapéutico compatible, es posible prevenir la muerte ante cualquier injuria hepatotóxica (Chanda y Mehendale, 1996).

El pronóstico en fallas hepáticas severas depende de la habilidad de los hepatocitos remanentes para regenerarse. La estimulación de la reparación del tejido hepático puede incrementar la sobrevivencia de los pacientes que sufren de fallas hepáticas agudas y reducir el tiempo de recuperación, luego de una resección hepática masiva. Sin embargo, las posibilidades de modular la reparación hepática en la práctica clínica son limitadas, a pesar de las extensas investigaciones que se han realizado. En los seres humanos el proceso regenerativo es similar al de los roedores, por lo cual los animales de experimentación más frecuentemente utilizados para realizar los estudios de regeneración son las ratas y los ratones.

Hay métodos *in vivo* e *in vitro* de los que disponemos para evaluar los efectos de algunas sustancias para reparar el tejido hepático dañado y la proliferación de hepatocitos. La contribución de modelos *in vitro*, particularmente cultivos celulares, en la evaluación de los efectos de sustratos nutricionales sobre la reparación hepática es limitada debido a la ausencia de respuestas neurohormonales que están presentes *in vivo*.

La hepatectomía parcial (**HP**), que consiste en la resección del 65% al 70% de la masa hepática (remoción de los lóbulos medio o central y lateral izquierdo) según describen Higgins y Anderson (1931) es el modelo experimental *in vivo* más frecuentemente utilizado para estudiar el proceso de regeneración hepática. Comparada con otros estímulos de regeneración como el tratamiento con tóxicos, la **HP** no se asocia con injuria e inflamación y el comienzo del proceso se puede definir de manera exacta (es el momento en que se resectan los lóbulos correspondientes) (Michalopoulos y DeFrances, 1997). Por otro lado, la desventaja de los modelos que utilizan tóxicos para estimular el proceso de regeneración en el hígado, presentan la dificultad de no poder separar los efectos de la sustancia en particular sobre los procesos de reparación hepática, de los efectos sobre la hepatotoxicidad intrínseca de la noxa utilizada, por ejemplo, los efectos sobre vías de biotransformación y rutas de eliminación.

### 1.3.3. Nutrición y Proliferación celular

Existen diferentes caminos para estimular la reparación hepática, incluyendo la administración de factores de crecimiento hepático, hormonas y citoquinas. La nutrición puede afectar significativamente el desarrollo de la regeneración hepática, por ejemplo en animales en ayunas se observa una marcada reducción de velocidad de síntesis del ADN y de la actividad mitótica de los hepatocitos (Doyle y col., 1968; Jasper y Brasel, 1974).

Los estudios realizados por Delany y col. (1994) demuestran que la alimentación enteral provee la carga calórica perdida por la resección hepática en ratas, de una manera más eficiente que la alimentación parenteral. La sobrevida de las ratas después de una hepatectomía parcial del 70% está marcadamente influenciada por la ruta de administración de los nutrientes. Los mecanismos de las diferentes respuestas, luego de una hepatectomía parcial del 70%, frente a las diversas vías de alimentación (parenteral *versus* enteral) están relacionados con las diferencias en la función gastrointestinal y en la modulación hormonal del metabolismo de nutrientes (Delany y col., 1994).

### 1.3.4. Hepatectomía y estrés oxidativo

Durante la característica proliferación celular que se produce luego de una hepatectomía parcial se ha observado un aumento del nivel de lipoperoxidación debido a una excesiva producción de radicales libres a diferentes tiempos después de la cirugía, que no pueden ser totalmente neutralizados por los antioxidantes naturales intracelulares (glutathion, vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa, etc.) (Aguilar-Delfín y col., 1996). Cambios en la lipoperoxidación pueden tener participación en los cambios bioquímicos, enzimáticos y en la fluidez de membranas plasmáticas que se observan en el hígado regenerante (Lambotte y col., 1989). La lipoperoxidación es un mecanismo autocatalítico que conduce a la destrucción oxidativa de las membranas celulares, afectando, por lo tanto, la integridad celular. Estas

modificaciones podrían iniciar un proceso de muerte celular o apoptosis, que permitiría la remoción de células dañadas o senescentes sin alterar el medio ambiente celular (Kurose y col., 1997; Laster y col., 1996). Algunos autores han propuesto que el mecanismo por el cual las sustancias oxígeno reactivas (ROS) causantes de la lipoperoxidación, inducen apoptosis, sería la activación de la caspasa-1, la cual produce degradación de la proteína NFκB, lo cual conduciría a una respuesta anti-apoptótica (Krishnamoorthy y col., 1999). Por el contrario, otros investigadores sostienen que la señal oxidativa activaría al NFκB, produciendo una respuesta anti-apoptótica (Schreck y col., 1991).

## **1.4. METABOLISMO DEL HIERRO**

### **1.4.1. Generalidades**

El hierro (Fe) es un nutriente mineral esencial para el metabolismo energético y oxidativo. Se encuentra en todas las células, estableciéndose dos compartimentos: el funcional y el de reserva. El primero comprende del 70% al 95% del total corporal; la mayor parte se encuentra ocupando la posición central de un anillo porfirínico de hemo-proteínas, cuya función es el transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina circulante y mioglobina muscular); una mínima proporción forma parte de las enzimas hemínicas (citocromos, catalasa, peroxidasa, etc.) y no hemínicas (flavo-proteínas, NADH deshidrogenasa, xantino-oxidasa, etc.) e interviene en la activación de sistemas enzimáticos (aconitasa, fosfoenol-piruvato-carboxilasa, ribonucleótido-reductasa, etc.). El compartimento de reserva representa del 5 al 30% del total corporal, se sitúa en el hígado, el bazo, la médula ósea y el sistema retículo endotelial; está unido a proteínas (ferritina y hemosiderina) y es movilizado cuando las demandas no son cubiertas por la ingesta. En plasma no se encuentra libre y circula unido a una proteína lábil, la transferrina (Pita Martín de Portela, 2003).

La deficiencia de hierro es un problema importante, en los seres humanos es responsable de 400 a 500 millones de casos de anemia, cantidad que equivale a un

tercio de la población mundial. Por otro lado, el exceso de hierro es tóxico, pudiendo observarse en algunos cuadros patológicos como la hemocromatosis, que es uno de los más frecuentes desórdenes genéticos, con una frecuencia estimada de 1/200 en la población caucásica del norte europeo. Por lo tanto, no sorprende que la homeostasis del hierro sea una preocupación fundamental en la prevención de la salud humana (Crichton y col., 2002).

En soluciones acuosas, el hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables:  $\text{Fe}^{+2}$  (ferroso) y  $\text{Fe}^{+3}$  (férrico). Esta propiedad lo hace capaz de participar en reacciones que abarcan gran parte de la bioquímica, incluyendo aquellas que controlan el flujo de electrones a través de rutas bioenergéticas, la síntesis de ADN y el aporte de oxígeno a los tejidos (Aisen y Litowsky, 1980).

#### **1.4.2. Transporte de hierro por las células de la mucosa intestinal**

El hierro puede ser absorbido a lo largo de todo el intestino, si bien este proceso es más eficiente en el duodeno.

El hierro dietario se encuentra principalmente en estado férrico o como hierro hemínico, mientras que el incorporado a través de productos farmacológicos usualmente está presente como sal ferrosa. El  $\text{Fe}^{+3}$  es insoluble en soluciones con pH mayor a 3, por lo que, en el estómago, se forman complejos solubles del metal que aumentan su disponibilidad para ser absorbido en el duodeno. Por otra parte, en la luz intestinal se forman cantidades variables de iones ferrosos como consecuencia de la reducción del hierro férrico por agentes de la dieta (por ejemplo, ácido ascórbico). En consecuencia, ambos iones (ferroso y férrico) pueden presentarse ante las células intestinales (Pérez y col., 2005).

Un sujeto normal ingiere de 12 a 18 mg Fe/ día en la dieta, principalmente como  $\text{Fe}^{+3}$ , de los cuales 1 a 2 mg es absorbido. En la **Figura 1.3** se observa una representación esquemática de los mecanismos de absorción del hierro en una célula madura de la mucosa intestinal de un sujeto normal.

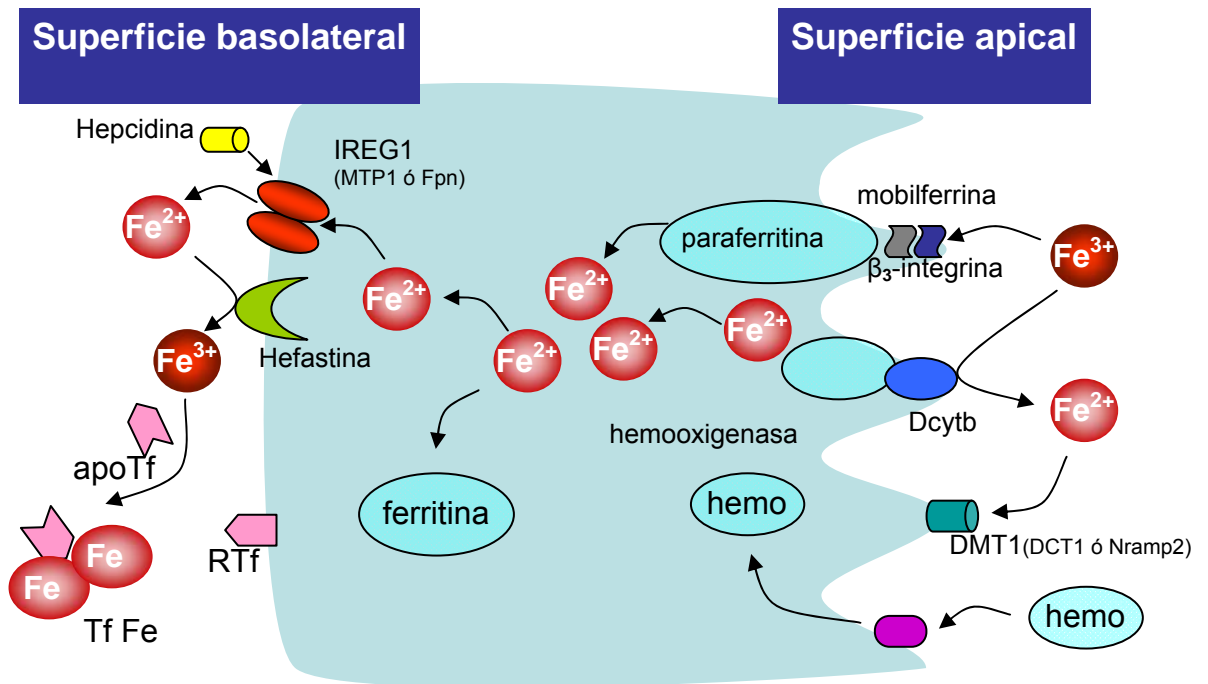


Figura 1.3: Mecanismos de absorción intestinal de hierro.

Los dos sistemas de captación del hierro de la dieta, denominados hemo y no-hemo, requieren reducción de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ .

El primer mecanismo involucra un receptor hemo sobre la membrana apical del enterocito y el transporte del hemo a través del citosol al retículo endoplásmico, donde la hemoxigenasa microsomal libera  $Fe^{+2}$ , porfobilinógeno y monóxido de carbono (Beale y Yeh, 1999).

En el segundo mecanismo el  $Fe^{+3}$  de la dieta debe ser reducido a  $Fe^{+2}$  por la citocromo b reductasa férrica duodenal (Dcytb) (McKie y col., 2001) antes de que sea transportado al enterocito por vía del transportador de metales divalentes (DMT1) también conocido como *divalent cation transporter* (DCT1) o *Natural resistance associated macrophage protein* (Nramp2), el cual tiene la función de transferir protones (Gunshin y col., 1997).

Una vez que el hierro ( $Fe^{+2}$ ) ha entrado en la célula de la mucosa, tiene dos posibilidades: 1) interactuar con una molécula de ferritina, que lo incorpora como  $Fe^{+2}$ , luego se oxida a  $Fe^{+3}$  y queda atrapado como  $Fe^{+3}$  en la estructura proteica; 2)



ser transportado a la membrana basolateral. En una situación normal, hay muchas moléculas de ferritina disponibles y la mayor parte del hierro va a ser atrapado por la ferritina y retenido en la célula de la mucosa intestinal, resultando en una baja transferencia de hierro.

Los iones ferrosos que no son almacenados en la ferritina y pueden alcanzar la membrana basolateral del enterocito son conducidos por la proteína transportadora de transmembrana ferroportina (Fpn), también llamada *iron-regulated transporter* (IREG1) o *metal transporter protein* (MTP1). La proteína de transmembrana hefastina (que es un homólogo de la ceruloplasmina) promueve la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ , facilitando de esta manera su incorporación a la proteína plasmática apotransferrina (Kaplan, 2002).

El  $\text{Fe}^{+3}$  así formado se unirá rápidamente a ligandos plasmáticos, fundamentalmente a la principal proteína transportadora de hierro, la apotransferrina, excepto en situaciones de saturación de la capacidad de unión del transportador plasmático, donde podría unirse a otros ligandos como citrato, constituyendo el llamado *pool* de hierro no unido a transferrina (NTBI). Uno de los importantes roles de la ceruloplasmina en el suero, es facilitar la oxidación del  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ , el cual se une rápidamente a la transferrina, siendo entregado a las células que expresan receptores para transferrina IRP-regulados, entre las cuales están los hepatocitos.

La membrana basolateral del enterocito expresa receptores para transferrina (Tf) que permiten la entrada del hierro, el cual es transportado en plasma por esta proteína. El metal incorporado en este proceso “informa” a la célula sobre el *status* férrico del organismo, regulando la captación vía DMT1 e integrina-mobilferrina (Conrad y Umbreit, 2000).

Sin embargo, algunos autores han establecido que el transportador basolateral IREG1 sería el principal punto de regulación de absorción del hierro de la dieta en respuesta a los requerimientos sistémicos, mientras que la regulación del transporte apical serviría de mecanismo de seguridad, evitando el efecto potencialmente tóxico del exceso de hierro (Muñoz Gómez y col., 2005).

La hepcidina es un pequeño péptido antimicrobiano producido por el hígado que juega un rol protagónico como la principal responsable de esta regulación. De

acuerdo con este modelo, la producción hepática de hepcidina estaría regulada por el grado de saturación de la Tf y el nivel de receptores para esta proteína a nivel hepático, de modo que cuando la relación Tf diférrica/ RTf aumenta, se induce la secreción de hepcidina. La unión de esta hormona proteica a la IREG1 induce la internalización y posterior degradación de la proteína de transporte. Como consecuencia de la disminución de la exportación de hierro, se produce la inhibición de su unión a la Tf plasmática y el aumento de la concentración del metal en el enterocito que, a su vez, conduciría a una inhibición de su transporte apical. Por el contrario, cuando la relación Tf-diférrica/RTf disminuye, cesa la producción hepática de hepcidina y se restaura la absorción de hierro (Nemeth y col., 2004).

La regulación post-traducciona de la IREG1 por la hepcidina completa el ciclo homeostático. El hierro regula la secreción de hepcidina, la cual, a su vez, controla la concentración de IREG1 en la superficie basolateral de los enterocitos (Leong y Lönerdal, 2004; Nemeth y col., 2004).

En la deficiencia de hierro, o en condiciones de producción incrementada de glóbulos rojos (eritropoyesis), la célula de la mucosa intestinal difícilmente produce ferritina y la mayor parte del hierro que ingresa a la célula queda disponible para ser transportado a través de la célula hacia la membrana basolateral. Aquí la difusión de  $Fe^{+2}$  a través de la membrana basolateral está facilitada por IREG1 (McKie y col., 2000).

### **1.4.3. Transporte sérico de hierro por la transferrina**

El hierro está presente en el suero en concentraciones de 0,7 a 1,6  $\mu g/ ml$  en sujetos normales y se encuentra predominantemente unido a transferrina, con una pequeña asociación a la albúmina u otras especies químicas de bajo peso molecular.

La molécula bilobular de transferrina puede unir fuertemente y en forma reversible a dos iones  $Fe^{+3}$ , con unión concomitante a dos aniones carbonatos. Estudios recientes de estructuras de alta resolución de la transferrina sérica humana,

pusieron en evidencia que la protonación del anión carbonato es el primer paso para la liberación del hierro de la transferrina (McGillivray y col., 1998).

Estudios previos establecieron que la transferrina unida al hierro es rápidamente depurada de la circulación (tiempo de vida media = 1,7 hs), la proteína recicla varias veces (tiempo de vida media = 7,6 días) indicando que la molécula de transferrina es sometida a más de 100 ciclos de unión, transporte y liberación de hierro, antes de ser removida de la circulación. Por lo tanto, está claro que la captación del hierro en casi todas las células humanas está mediada por los receptores de transferrina (RTf), los cuales son bisulfuros unidos a homodímeros constituyentes de dos subunidades idénticas glicosiladas de PM= 90 KDa. La estructura del RTf en el enterocito humano ha sido determinada por los estudios de rayos X (Lawrance y col., 1999).

#### **1.4.4. Transporte intracelular de hierro**

El hierro está predominantemente unido a transferrina y en pequeña proporción a albúmina o a otros ligandos que son especies químicas de bajo peso molecular. La cantidad de hierro requerida diariamente es captada por la Tf en las células intestinales y en los lugares de degradación de la hemoglobina (sistema mononuclear- fagocítico) (Conrad y Umbreit, 2000). Estas proteínas transportan y ceden el catión en los sitios de síntesis de la hemoglobina y de las enzimas que contienen hierro.

La transferrina diférrica se une a sus receptores en la superficie celular y el complejo transferrina–receptor es internalizado en vesículas revestidas por clatrina (Wileman y col., 1985). Las vesículas pierden su cubierta y se fusionan con endosomas. El interior del compartimento endosomal se mantiene a un pH aproximadamente igual 5,5 por la acción de la bomba de ATP- dependiente de protones en la membrana endosomal, la cual impulsa los protones a la luz endosomal desde el citosol. El hierro es liberado desde el complejo transferrina – receptor como  $Fe^{+3}$ . La unión cooperativa metal-bicarbonato no sólo es importante para la

asociación del hierro a la Tf, sino también para su liberación. La unión anión-Tf, relativamente lábil, parece proveer un mecanismo para la remoción fisiológica del hierro. El carbonato se pierde primero y, por ello, la unión metal-Tf es fácilmente desestabilizada, produciéndose la liberación del hierro mientras que la proteína permanece intacta. Posteriormente, el metal es reducido por una ferri-reductasa endosomal y transportado al citoplasma por un transportador de cationes divalentes de la membrana endosomal (Fleming y col., 1998; Gruenheid y col., 1999).

Una vez que el hierro entra a la célula, puede incorporarse a proteínas que contienen hierro como la ferritina, la cual está involucrada en la oxidación del  $\text{Fe}^{+2}$  que se deposita en la estructura proteica esencialmente como ferrihidrato.

La ferritina puede cargar 4500 átomos de hierro por molécula. En condiciones de sobrecarga de hierro la ferritina es transferida a los lisosomas donde es transformada a la forma conocida como hemosiderina (Aisen y col., 1999).

#### 1.4.5. Homeostasis celular del hierro

La homeostasis del hierro en células de mamíferos es regulada por el balance entre la captación del hierro, los depósitos celulares y la utilización. Esto es ejecutado predominantemente a nivel de la síntesis de proteínas (translación de ARNm en proteínas), más que a nivel de la transcripción (síntesis de ARNm).

Las secuencias regulatorias IRE (*iron responsive element*) están localizadas en regiones no codificantes o no traducidas (UTRs) del ARNm, en ambas extremidades de las partes codificantes de la secuencia del ARNm, 5' y 3': las IREs situadas en la región UTR 5' actúan regulando la unión del mensajero al ribosoma o sea están asociadas con la iniciación de la traducción, aquellas ubicadas en la región UTR 3' modulan la degradación o estabilidad del ARNm, por acción de endoribonucleasas (Crichton, 2001).

El mecanismo de regulación es mediado por interacciones específicas entre secuencias IRE localizadas en los respectivos ARNm y proteínas citoplasmáticas (ahora conocidas como proteínas reguladoras de hierro-IRPs-*iron regulatory*

*proteins*), designadas como IRP1 e IRP2. Ellas actúan como sensores del contenido celular de hierro esencialmente por existir en dos conformaciones diferentes.

La IRP1 es una proteína bifuncional que puede actuar como aconitasa citoplasmática o unirse a secuencias IRE. Posee un *cluster* [4Fe-4S] en su sitio activo y puede convertirse reversiblemente en su forma activa [4Fe-4S] o inactiva [3Fe-4S] en respuesta a modificaciones en la disponibilidad de hierro. Bajo condiciones de depleción del metal, la apo-IRP1 puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE. Contrariamente, cuando el aporte de hierro aumenta, la IRP1 incorpora un átomo del metal al *cluster* [4Fe-4S] adoptando una conformación en la cual es incapaz de interactuar con el ARN, aunque posee actividad aconitasa (Kadly y col., 1999).

La IRP2 posee 62% de homología con la IRP1 pero a diferencia de ella, carece de *cluster* [4Fe-4S] y no posee actividad aconitasa. Tiene capacidad de unirse con gran afinidad a secuencias IRE localizadas en los mensajeros. En su región terminal contiene una secuencia rica en cisteína que es responsable de la degradación de la proteína vía proteosoma cuando los niveles intracelulares de hierro son altos (Iwai y col., 1995). Por el contrario, cuando el aporte del metal disminuye, se produce la síntesis de novo de la IRP2.

El sistema IRE-IRP permite a las células regular en forma coordinada la biosíntesis de las proteínas involucradas en la captación (RTf), utilización  $\delta$ -aminolevulinato sintetasa (ALAS) y almacenamiento (ferritina) de hierro, durante las variaciones fisiológicas de su biodisponibilidad. En un estado de depleción de hierro, el objetivo de la célula es incrementar la captación del metal y disminuir su utilización o almacenamiento. Las IRP activas se unen a las secuencias IRE, aumentando la síntesis de RTf mientras que disminuyen la síntesis de ferritina y ALAS. Inversamente, cuando los niveles de hierro son altos, el metal es utilizado o almacenado y su incorporación debe ser disminuida. Las IRP se disocian de las IRE y, como consecuencia, el ARNm del RTf es degradado y la síntesis de ferritina y ALAS aumenta (Crichton y col., 2002).

Como síntesis de lo descripto, en la **Figura 1.4** se esquematiza la homeostasis celular del hierro.

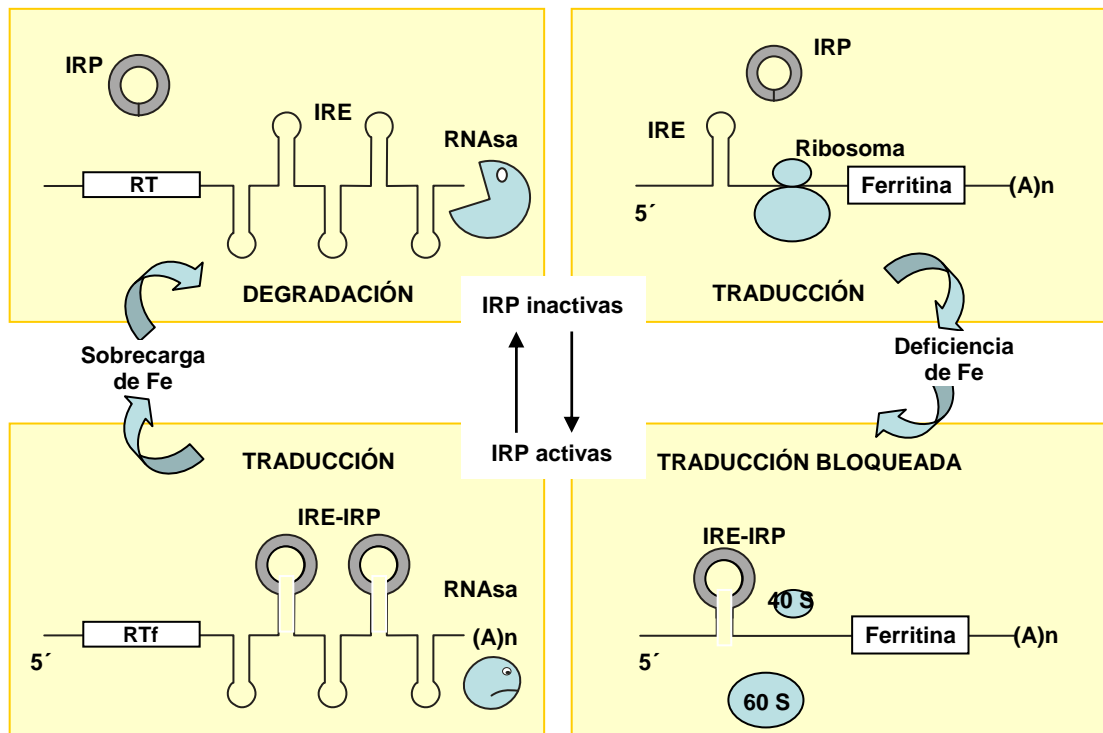
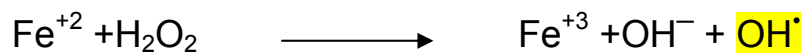


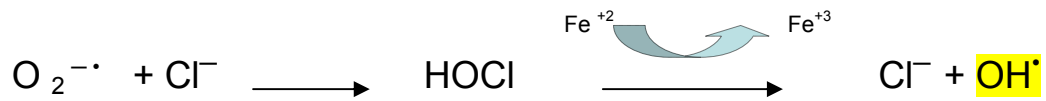
Figura 1.4: Homeostasis celular del hierro.

### 1.4.6. Hierro y estrés oxidativo

La acumulación de hierro en los tejidos (particularmente si el pool intercambiable está incrementado), está asociada con daño tisular. Así el hierro de bajo peso molecular puede actuar como catalizador de la reacción de Fenton para potenciar la toxicidad del oxígeno por la generación de una amplia gama de especies de radicales libres, incluyendo radicales hidroxilo, OH<sup>•</sup>:



El hierro también participa de la reacción con el ácido hipocloroso que da como resultado el anión cloruro y un radical hidroxilo:



Los radicales hidroxilos son las especies de radicales libres más reactivas y tienen habilidad para reaccionar con un amplio espectro de constituyentes celulares, incluyendo residuos aminoacídicos y bases púricas y pirimidínicas del ADN, así como también atacando las membranas lipídicas para iniciar una reacción en cadena de radicales libres conocida como peroxidación lipídica (Ravia y col., 2005).

Las especies oxígeno reactivas (ROS) son generadas a partir de células como parte de mecanismos celulares normales. Las células están provistas de enzimas citoprotectoras y compuestos no enzimáticos antioxidantes que evitan la toxicidad de los ROS. Tales mecanismos protectores no actúan independientemente unos de los otros sino que funcionan corporativamente en forma de cascada (Crichton y col., 2002).

Entre las enzimas antioxidantes encontramos: la catalasa y la glutatión peroxidasa que actuarían catalizando la transformación de agua oxigenada en agua, disminuyendo el sustrato para la reacción con el  $\text{Fe}^{+2}$ . Es interesante notar que la glutatión peroxidasa es una de las pocas enzimas que necesitan selenio (Se) como co-factor para su funcionamiento.

El compuesto no enzimático antioxidante más importante es el glutatión reducido ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinilglicina) GSH que es un sulfhidrilo no proteico y está involucrado en diversas reacciones en el cuerpo. Este es un sulfhidrilo *buffer* que mantiene en estado reducido a los residuos de cisteína en la hemoglobina y en otras proteínas de los glóbulos rojos, participa en el transporte de aminoácidos a través de membranas celulares, etc. Este tripéptido también actúa como co-sustrato en la reacción catalizada por GSH-peroxidasa detoxificando al peróxido de hidrógeno y puede ser reducido nuevamente por NADPH y la glutatión reductasa (Acworth y Bailey, 1995).

Cuando altos niveles de ROS son generados en la célula eucariota, ciertos mecanismos de respuesta son activados para evitar sus efectos perjudiciales. Estos efectos pueden involucrar cambios en la expresión de genes en la célula, por ejemplo: cambios transcripcionales. El Factor Nuclear kappa B (NFκB) fue el primer factor de transcripción que muestra respuesta directa al estrés oxidativo. En la mayoría de las células, el NFκB está presente en el citosol como un heterodímero inactivo (p50/p65) unido a tres subunidades del Inhibidor kappa B (IκB). La remoción de las subunidades inhibitoras es la señal para la translocación del factor de transcripción desde el citoplasma al núcleo para unirse a la secuencia de reconocimiento del ADN.

El NFκB juega un rol clave en la regulación de numerosos genes involucrados en las respuestas patógenas y en los mecanismos de defensa celular. Estos incluyen muchos genes inmunológicamente relevantes, citoquinas y receptores de citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular, cada una de los cuales contiene sitios de unión funcionales para el NFκB en su región promotora.

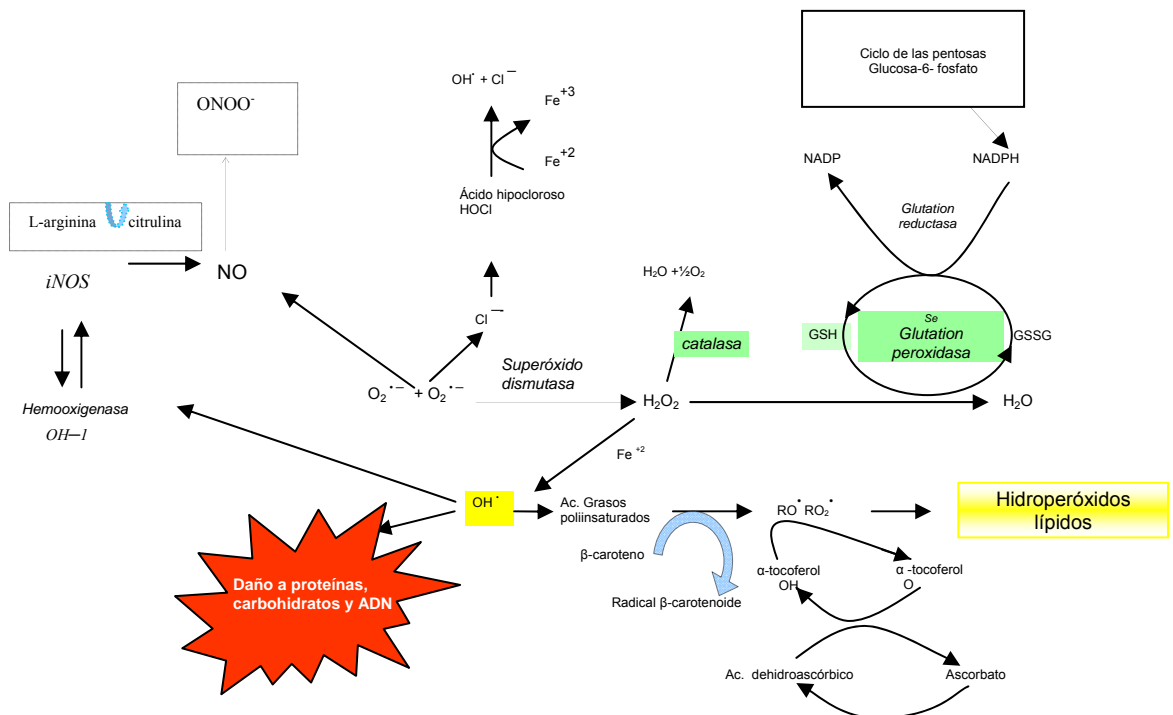


Figura 1.5: Mecanismo de producción de ROS y defensas antioxidantes celulares.



En la **Figura 1.5** se esquematizan los mecanismos celulares de producción de ROS y de las defensas antioxidantes naturales que tratan de evitar el daño oxidativo.

La acumulación de hierro en los tejidos ha sido asociada con la patogénesis de varias enfermedades. El grado de toxicidad depende de la localización del hierro en la célula (citoplasma o lisosomas), de su forma bioquímica (ferritina o hemosiderina) así como de la habilidad de la célula para prevenir la generación y propagación de ROS por la amplia gama de compuestos antioxidantes y enzimas citoprotectoras presentes en ellas (Ward y col., 2000; Ward y col., 1994).

#### **1.4.7. Hierro y fluidez sanguínea**

La sangre es un líquido heterogéneo, una suspensión de elementos formes en un líquido complejo que es el plasma. Su misión fundamental es transportar, a través del sistema circulatorio, las sustancias necesarias para el metabolismo celular y los productos de dicho metabolismo. Además interviene en los mecanismos de inmunidad y en la comunicación entre los diversos órganos, convirtiéndose en un órgano altamente especializado pero fácilmente alterable.

La viscosidad de la sangre es la combinación de todos los elementos que la componen y de sus comportamientos particulares. La viscosidad sanguínea puede definirse como la resistencia al flujo a consecuencia de una fricción interna; vale decir que cuanto mayor sea esa resistencia, mayor será la viscosidad de la sangre.

Es importante señalar que la sangre posee un comportamiento “pseudoplástico” es decir, que su viscosidad aumenta a medida que disminuye la velocidad del flujo y esto sucede fundamentalmente cuando disminuye el diámetro capilar y se acerca al de los hematíes. Como el plasma también constituye un líquido “pseudoplástico”, la sangre se vuelve un elemento complejo con un comportamiento de fluido no newtoniano; esto significa que su viscosidad no permanece constante cuando se le aplican diferentes fuerzas. Por lo tanto, la viscosidad de la sangre no es constante y

depende de la velocidad del flujo y de la concentración de partículas en suspensión (Dintefass y Lake, 1977; Copley y Smith, 1985).

Las propiedades viscosas se pueden predecir considerando las características de sus componentes, de los cuales describiremos los que tienen especial importancia en nuestro desarrollo de tesis:

- el **plasma**: que es un líquido con comportamiento newtoniano pero su viscosidad depende fundamentalmente de la concentración de proteínas anisométricas como el fibrinógeno y las inmunoglobulinas, cuya concentración varía especialmente durante los procesos de defensa. También depende en forma marcada del estado de hidratación del organismo, aumentando en forma brusca cuando hay pérdida de agua.

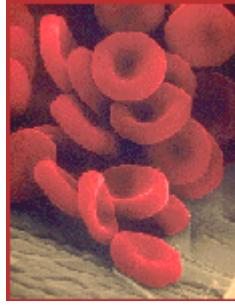
- los **glóbulos rojos**: que son partículas de gran tamaño, presentes en un número tan importante que constituyen casi el 50% del volumen de la sangre, tienen propiedades muy especiales de deformabilidad y capacidad de agregación que los hacen netamente diferentes de las partículas que constituyen las suspensiones no biológicas. El eritrocito posee una elevada capacidad de adaptación a las condiciones de flujo en los diferentes sectores vasculares de modo que en condiciones normales la viscosidad de la sangre no presenta una sustancial diferencia con la del plasma libre de células. La composición química de la membrana del glóbulo rojo consta de un 40% de lípidos y un 60% de proteínas (porcentaje sobre peso seco). Teniendo en cuenta los pesos moleculares medios de los componentes hallados, se calcula que existe una molécula proteica por cada 75 moléculas de lípidos. Los lípidos, en su mayor parte (98%), tienen un polo hidrófilo y un polo hidrófobo. Las especies químicas más abundantes (% en peso) son los fosfolípidos (55% del total de lípidos) seguidos del colesterol (25%) y los glicolípidos (18%). Considerando el peso molecular de cada tipo de componente sobresale el alto contenido de colesterol cuando se compara con otros tipos de membranas. Estudios experimentales sobre agregados de lípidos en bicapas han demostrado las propiedades fluidificantes y el aumento de flexibilidad por la presencia de colesterol.

La eritropoyesis es el proceso por el cual se produce la proliferación y diferenciación de las células madres eritropoyéticas para convertirse en eritrocitos.

Cada día se renuevan alrededor del 1-1,5% de todos los eritrocitos circulantes. Este proceso, que se lleva a cabo en la médula ósea y tarda unos 5-7 días, finaliza con la liberación de los reticulocitos, que se convierten en eritrocitos maduros tras un día de circulación en sangre periférica. La eritropoyesis está regulada de forma muy precisa, siendo la eritropoyetina, sintetizada y liberada por las células intersticiales del riñón en respuesta a la hipoxia tisular, quien desempeña el papel principal.

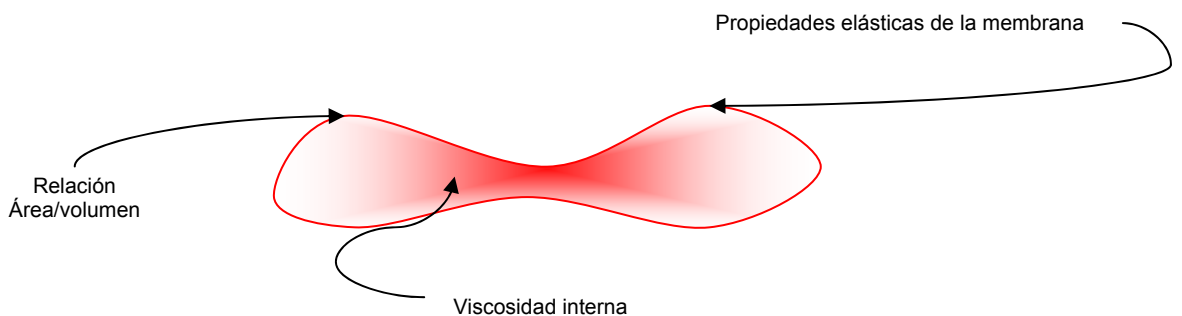
Sin embargo, para que la eritropoyesis se desarrolle de manera efectiva, además de eritropoyetina es necesario que haya un aporte adecuado de hierro, vitamina B12 y ácido fólico. El hierro presenta un metabolismo muy complejo y la corrección de su déficit es a menudo poco satisfactoria (Muñoz Gómez y col., 2005).

El eritrocito es una célula anucleada con la forma de disco bicóncavo. Esta forma en reposo se explica por el exceso de membrana y por las características mecánicas de la misma, que le permiten deformarse sin que la membrana sea distendida cuando actúa sobre él una fuerza asimétrica (Copley, 1952). El glóbulo rojo tiene en su interior una suspensión viscosa de hemoglobina, la cual es una proteína que fija hierro y al modificarse las concentraciones de la hemoglobina por las variaciones de hierro, pueden variar a su vez, la viscosidad interna del glóbulo rojo y alterar su deformabilidad (Luquita y col., 1996). En pacientes con anemia por deficiencia de hierro se comprobó que el acortamiento de la vida media del eritrocito se relaciona con la disminución de la deformabilidad de glóbulo rojo (Vaya y col., 2005). En las anemias las alteraciones fisiopatológicas a nivel de sistema circulatorio son respuestas compensatorias tales como: aumento del gasto cardíaco, desviación de la curva de disociación de oxígeno para aumentar la liberación de oxígeno, reducción de la viscosidad de la sangre por aumento del flujo y retención de líquidos (Brittenham y col., 2000).



**Figura 1.6:** Imagen que muestra eritrocitos con la forma normal de disco bicóncavo.

La elevada capacidad de adaptación del eritrocito a las fuerzas hidrodinámicas de la sangre en flujo y a los distintos tamaños de la luz vascular se basa en la favorable relación superficie/volumen del eritrocito anucleado, la fluidez del contenido celular, que no tiene estructuras elásticas en el citoplasma y a las propiedades viscoelásticas de su membrana que es una bicapa lipídica con proteínas intercaladas.



**Figura 1.7:** Esquema de los factores que influyen sobre la deformabilidad eritrocitaria.

La gran fluidez de los eritrocitos es fundamental para la libre circulación sanguínea a través de los capilares donde adoptan la forma típica de “babuchas”. Esta adaptación a la circulación hace que en los capilares la viscosidad efectiva no presente una diferencia sustancial con la viscosidad del plasma libre de células.

Además la membrana se moviliza relativamente rápido alrededor del citoplasma líquido, provocándoles a éste un movimiento más lento. Así la adaptación al flujo siempre se acompaña de un mezclado de la hemoglobina en el contenido celular. Este proceso, a su vez, facilita el intercambio de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> con el espacio intersticial (Robert y Weed, 1970).

Un enlentecimiento del flujo sanguíneo se puede deber a modificaciones de la viscosidad sanguínea, de la deformabilidad eritrocitaria o de la agregabilidad eritrocitaria, estas dos últimas son a su vez importantes factores determinantes del “comportamiento anómalo” de la viscosidad sanguínea.

La viscosidad sanguínea y la viscosidad plasmática son los más conocidos parámetros que caracterizan las propiedades del flujo sanguíneo. Estos parámetros dependen de las condiciones del flujo (gasto cardíaco, velocidad de cizallamiento alta o baja) como de factores plasmáticos y de factores celulares sobre todo eritrocitarios.

La viscosidad plasmática depende de la concentración de proteínas plasmáticas y más particularmente de macromoléculas como el fibrinógeno. El fibrinógeno juega un rol más importante que las inmunoglobulinas y que las lipoproteínas en el aumento de la viscosidad plasmática; esta molécula es capaz de adsorberse sobre la superficie celular y establecer puentes entre los hematíes que aumentan más su tendencia agregante a nivel del territorio capilar (Le Dèvehat y col., 2000; Lominadze y Dean, 2002). Estos dos últimos factores tienen ellos mismos un impacto superior a la albúmina sobre la viscosidad plasmática.

La viscosidad sanguínea está determinada por la viscosidad plasmática, por la concentración celular de la sangre (hematocrito) y por la deformabilidad y la agregabilidad de glóbulos rojos (Chien, 1987).

A nivel de los vasos en donde el flujo sanguíneo es lento (vénulas) o donde las situaciones patológicas inducen una disminución del gasto cardíaco (más allá de una estenosis arterial) los agregados de glóbulos rojos se forman regularmente. Esta agregación juega un gran papel en la viscosidad de la sangre y explica que la hiperviscosidad sanguínea se produzca cuando existe un gasto cardíaco bajo.

Por el contrario, cuando la velocidad del flujo sanguíneo aumenta, los *rouleaux* de glóbulos rojos se disocian y la viscosidad disminuye. La agregación de los glóbulos rojos depende de las condiciones del flujo sanguíneo, así como de factores plasmáticos (fibrinógeno, inmunoglobulina) y de factores celulares (hematocrito, adhesión entre eritrocitos y deformabilidad globular).

Existen diferentes situaciones que, cursando con deficiencia de hierro, producen un aumento de la viscosidad interna del eritrocito y, por lo tanto, variaciones en la forma alterando las propiedades que los caracterizan (Brugnara, 2003; Clark, 1988).

Además, el aumento del contenido de la hemoglobina sobre su valor normal puede producir una alta viscosidad citoplasmática, la cual afectaría la respuesta de la célula a las distintas tensiones de cizallamiento. Así, los tres factores clásicos que gobiernan la deformabilidad del eritrocito son la relación área/volumen de la superficie celular, las características reológicas de la membrana, y la viscosidad citoplasmática, y ellos se correlacionan de una manera compleja (Mohandas y col., 1983; Nash y Meiselman, 1983; Kim y col., 2006).

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Como ha sido expuesto en la introducción, el aluminio, debido a su ubicuidad, puede estar presente en el organismo de la mayoría de las personas. Además, la cantidad de personas que pueden ser sometidas a resección hepática por diferentes patologías o como donantes vivos ha ido incrementándose en las últimas décadas. Así, por ejemplo, en España se han superado en promedio de los últimos 6 años los 1000 trasplantes anuales, habiéndose realizado 435 trasplantes hepáticos en los primeros cinco meses del año 2006. Por lo tanto, no es sorprendente que un paciente que deba ser sometido a hepatectomía parcial contenga en su organismo aluminio.

Por otro lado, el hierro constituye uno de los nutrientes fundamentales para la recuperación de la masa y las funciones hepáticas.

Por ende, el análisis de la absorción intestinal del hierro y de parámetros sanguíneos relacionados con su metabolismo en ratas expuestas al aluminio y/o sometidas a hepatectomía parcial constituye un aporte importante a los conocimientos básicos sobre este tema.

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia del aluminio y/o de la hepatectomía parcial sobre parámetros relacionados con el metabolismo global del hierro.



## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratas tratadas con aluminio y/o sometidas a hepatectomía parcial:

1. Evaluar la absorción intestinal del hierro.
2. Determinar el nivel de lipoperoxidación y la capacidad antioxidante en mucosa intestinal.
3. Analizar parámetros hematológicos, séricos y hemorreológicos.

## **CAPÍTULO 3**

### **METODOLOGÍA**

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos, adultas de 300-360 g de peso. Los animales fueron mantenidos en ambiente acondicionado, el ciclo luz - oscuridad se alternó en intervalos de 12 horas, la temperatura del bioterio fue mantenida entre 20 y 24°C. Los animales fueron mantenidos en condiciones de dieta estándar y agua *ad libitum*, de acuerdo a normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio (“Guide for Care and Use of Laboratory Animals”, National Institutes of Health, EEUU, 1989).

Para evitar variaciones debidas al ritmo circadiano, los animales fueron sacrificados todos a la misma hora, entre las 08:00 y 10:00 horas.

#### 3.2. TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

- 1) Control (C): recibieron una inyección i.p. de 0,5 ml de solución fisiológica, solvente de la solución de hidróxido de aluminio, 3 veces por semana durante 90 días.
- 2) Control más cirugía simulada (C+SH): animales tratados como los del grupo Control fueron sometidos a una cirugía simulada (sham) que consistió en la escisión del abdomen con exteriorización y cuidadosa manipulación de los lóbulos hepáticos durante el tiempo de duración de una hepatectomía parcial, siendo sacrificados a las 48 horas de la cirugía.

- 3) Control más hepatectomía parcial (**C+HP**): los animales del grupo Control fueron sometidos a una hepatectomía parcial (**HP**) del 65% según la técnica de Higgins y Anderson, siendo sacrificados a las 48 horas de la cirugía.
- 4) Aluminio (**Al**): recibieron una inyección i.p. de hidróxido de aluminio en solución fisiológica en una dosis de 80 mg/Kg de peso corporal, equivalente a 27 mg de Al elemental/ kg de peso corporal, 3 veces/semana durante 90 días (Degiorgis y col., 1987).
- 5) Aluminio más cirugía simulada (**Al+SH**): los animales del grupo **Al** fueron sometidos a una cirugía simulada (sham), al finalizar los 90 días del tratamiento; siendo sacrificados a las 48 horas de la cirugía.
- 6) Aluminio más hepatectomía parcial (**Al+HP**): los animales del grupo **Al** fueron sometidos a una hepatectomía parcial del 65%, al finalizar los 90 días del tratamiento, siendo sacrificados a las 48 horas de la cirugía.

El día del experimento, los animales en ayunas fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) o con éter etílico, según el protocolo experimental al que posteriormente iban a ser sometidos.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca, obteniéndose suero, por centrifugación. También se procedió a obtener plasma, utilizándose diferentes anticoagulantes (EDTA, Heparina o Citrato de sodio) de acuerdo a las especificaciones estipuladas en las determinaciones de las distintas variables a estimar.

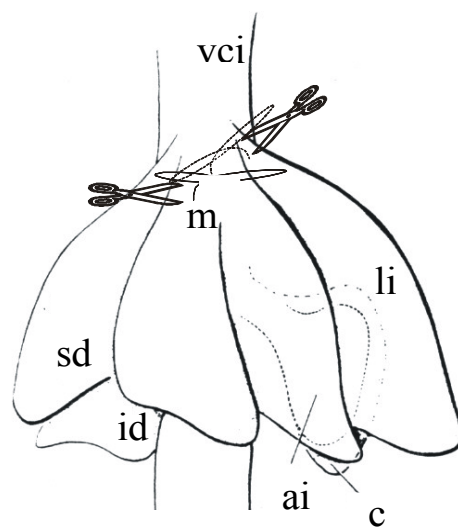
### 3.2.1. Procedimientos Quirúrgicos

Para realizar las intervenciones quirúrgicas, los animales fueron anestesiados con éter etílico. La hepatectomía parcial (**HP**) consistió en la remoción de los lóbulos central y lateral izquierdo como lo describió originalmente Higgins y Anderson (Higgins y Anderson, 1931). Luego de una laparotomía media, se

exteriorizaron los dos lóbulos anteriores (medio y lateral izquierdo). Después de ligar el pedículo vascular de cada lóbulo con hilo quirúrgico, cada uno de ellos fue escindido realizando un corte de 1-2 mm distal a la ligadura (**Figura 3.1**). Finalmente, se retiró cuidadosamente la sangre coagulada de la cavidad abdominal utilizando gasas y se suturaron las capas musculares y la piel.

La cirugía simulada (sham, **SH**) consistió en la escisión del abdomen con exteriorización y cuidadosa manipulación de los lóbulos hepáticos durante el tiempo de duración de una hepatectomía parcial y posterior sutura de las capas musculares y la piel.

En todos los casos, durante y después de la cirugía, los animales fueron mantenidos a temperatura normal ( $36,5 \pm 0,5$  °C) utilizándose lámparas de calentamiento hasta su completa recuperación.



vci, vena cava inferior  
 m, lóbulo medio  
 li, lóbulo lateral izquierdo  
 sd, lóbulo superior derecho  
 id, lóbulo inferior derecho  
 ai, lóbulo anterior izquierdo  
 c, lóbulo caudado

**Figura 3.1:** Hepatectomía parcial. El esquema muestra una vista anterior del hígado de rata donde están representados los lóbulos medio y lateral izquierdo removidos de acuerdo con la técnica quirúrgica de Higgins y Anderson (1931).

### 3.2.2. Evaluación del proceso de regeneración hepática

La evaluación de la velocidad de proliferación celular hepática se realizó aplicando la técnica de la incorporación de Timidina tritiada al ADN (McIntosh y col., 1992).

Los estudios fueron realizados a las 24 horas y 48 horas post-cirugía. Para realizar este estudio, se administró a los animales [<sup>3</sup>H]-timidina (Sigma Chemical Co.) 10 µCi/200 g de peso corporal, i.p.; 1 hora antes del sacrificio. Muestras de hígado se homogeneizaron en agua destilada 1:5 (p/v) y se precipitaron los ácidos nucleicos con TCA 5 % (p/v) frío, se centrifugó y la suspensión del *pellet* se colocó en líquido de centelleo para determinar la radioactividad en contador de centelleo líquido (1214 Rack Beta, Pharmacia). La incorporación se expresó como dpm/mg ADN.

La concentración de ADN se determinó según la técnica de Wannemacher y col. (1965). Para ello el tejido hepático fue homogeneizado al 20% en agua destilada, sometido a precipitación con TCA al 10% (p/v) seguido de una centrifugación. El precipitado resultante fue lavado con etanol saturado con acetato de potasio para extraer el TCA y algunos lípidos. Luego se realizó una nueva extracción lipídica con etanol / éter etílico (3:1) y otra con éter anhidro. Se evaporó el éter remanente. El precipitado fue resuspendido en KOH 0,30 N y se sometió a hidrólisis durante 60 min a 37 °C. Para separar el ADN y el ARN se agregó a la solución resultante HClO<sub>4</sub> al 60% (p/v) helado y se centrifugó a 2000 rpm a 4°C durante 5 min. El precipitado conteniendo el ADN fue lavado exhaustivamente con KClO<sub>4</sub> al 5%. El ADN fue hidrolizado con HClO<sub>4</sub> 0,50N a 96°C durante 45 min. Luego de centrifugar, se tomó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con HClO<sub>4</sub> 0,50 N, volviendo a tomar el sobrenadante. La concentración de ADN fue determinada en una alícuota del sobrenadante por lectura de la diferencia de absorbancia a 265 nm y 290 nm, comparándola con soluciones estándares de ADN de timo de ternera (Sigma Chemical Co.) en HClO<sub>4</sub> 0,20 N.

### 3.2.3. Determinación del contenido de aluminio

La medición de la concentración de aluminio se realizó en tejido hepático, mucosa intestinal y suero. Los tejidos fueron previamente tratados en digestor Milestone Ethos 900 con bombas de teflón en ácido nítrico / agua oxigenada y posterior medición del contenido de aluminio por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer 5000). Las concentraciones fueron obtenidas a partir de una curva de calibrado con estándares acuosos certificados.

## 3.3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca y alicuotadas en dos, una parte anticoagulada con heparina y otra parte sin anticoagulante para separar suero.

### 3.3.1. Parámetros hemáticos

Se utilizó para determinar los parámetros hematológicos un Contador hematológico Cell Dyn 3500.

#### 3.3.1.1. Hematocrito (Hto)

El hematocrito es el porcentaje del volumen de la sangre que ocupa la fracción de los glóbulos rojos. Los resultados fueron expresados como % (v/v).

#### 3.3.1.2. Concentración de Hemoglobina (Hb)

La hemoglobina es uno de los derivados nitrogenados de la ferroprotoporfirina. Es una proteína conjugada que contiene las proteínas básicas incoloras, las globinas y ferroprotoporfirina o hem (el cual consta de una parte orgánica y un átomo de

hierro). Esta proteína es la encargada de transportar el O<sub>2</sub> en la sangre, por poseer el grupo hem, es similar a la mioglobina. Se determinó espectrofotométricamente por el método de la cianometahemoglobina medida a 540 nm. Los resultados fueron expresados en g/dl.

### **3.3.1.3. Volumen corpuscular medio (VCM)**

Es la medida del tamaño del eritrocito. Los resultados se expresaron en fentolitros (fl).

### **3.3.1.4. Hemoglobina corpuscular media (HCM)**

La hemoglobina corpuscular media es la cantidad de hemoglobina por glóbulo rojo (GR).

$$\text{HCM} = \text{Hb/GR}$$

Los resultados se expresaron en pg.

### **3.3.1.5. Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)**

La concentración de hemoglobina (cantidad de hemoglobina relativa al tamaño de la célula) por glóbulo rojo.

$$\text{CHCM} = \text{Hb/Hto}$$

Los resultados se expresaron en g/dl.

## **3.3.2. Parámetros séricos**

### **3.3.2.1. Determinación de hierro sérico**

Se realizó según la técnica hierro-color de Wiener Lab. El hierro sérico se libera de su unión con su proteína transportadora específica transferrina en *buffer* succinato, pH 3,70 y en presencia de un reductor, el ácido mercaptoacético.



Posteriormente reacciona con el reactivo de color, piridil bis-fenil triazina sulfonato (PBTS) dando un complejo color magenta, que se mide a 560 nm. La concentración se expresó en  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

### 3.3.2.2. Determinación de transferrina sérica

La transferrina se determinó por su actividad fisiológica de captar  $\text{Fe}^{+3}$  a pH mayor que 7,20 donde la transferrina se satura en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$  en exceso. El remanente de  $\text{Fe}^{+3}$  no ligado se elimina totalmente por coprecipitación con carbonato de magnesio, según la técnica de Wiener Lab.

El hierro unido a transferrina se libera y determina colorimétricamente según técnica de hierro-color de Wiener Lab. La cantidad de transferrina se expresa como los microgramos de  $\text{Fe}^{+3}$  con que está saturada /dl. A partir de este valor y de la concentración sérica de hierro, se calculó el porcentaje de saturación de transferrina (%).

## 3.4. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO ( $^{59}\text{Fe}$ ). MODELO DE ASA INTESTINAL *IN SITU*

Las ratas utilizadas para esta experiencia tuvieron 24 hs de ayuno en jaulas metabólicas individuales y libre acceso al agua.

La solución empleada para realizar la carga del saco intestinal *in situ* fue *buffer* Ringer bicarbonato (Osmolaridad de la solución: 300 mosmoles, pH= 7,20) adicionada con 500  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Fe}/\text{l}$  como citrato férrico hierro frío: y 0,2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  de  $^{59}\text{Fe}$ : en cada saco intestinal.

Los animales fueron anestesiados con éter etílico, se expuso el intestino delgado mediante un corte en la línea media del abdomen. Se aisló un asa de duodeno de aproximadamente 5 cm, se ligó el extremo distal del saco y se inyectó dentro del segmento desde el extremo proximal a través de una aguja fina, 0,5 ml de solución trazadora [ $^{59}\text{Fe}$ ]  $\text{Cl}_3$  (0,2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  en cada saco), y se ligó el extremo

proximal. Se colocó el intestino dentro de la cavidad abdominal y se suturó el corte. Dos horas más tarde, se anestesió la rata nuevamente con éter etílico, se sacrificó el animal por punción cardíaca obteniendo muestras de sangre entera y anticoagulada con EDTA.

Se extrajo el intestino y se tomó la medida de la longitud del mismo. Luego se midió el contenido de  $^{59}\text{Fe}$  previa hidrólisis del tejido intestinal con ácido nítrico en caliente. La actividad del  $^{59}\text{Fe}$  en el intestino fue determinada usando un contador gamma.

El  $^{59}\text{Fe}$  absorbido en cada segmento fue calculado como la diferencia entre la cantidad de  $^{59}\text{Fe}$  instilada y la cantidad remanente en intestino, al final del período considerado. Se calculó la absorción de hierro en estado estacionario mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol } ^{59}\text{Fe}^{+3} \text{ absorbido/cm intestino} = \{(\text{cpm}_i - \text{cpm}_f) / \text{cpm}_i\} \cdot [\text{Fe}^{+3}] \cdot V_i \cdot (1 / L)$$

$[\text{Fe}^{+3}]$  = concentración de Fe de la solución instilada ( $\mu\text{mol Fe/ml}$ ).

$V_i$  = volumen inicial instilado dentro del segmento intestinal (en ml).

$L$  = longitud del segmento intestinal en centímetros (cm).

El transporte del agua fue calculado como la diferencia entre el volumen mucosal inicial y final. El contenido de agua al final de los experimentos estuvo entre 97 y el 100% de la encontrada al inicio de los mismos.

### 3.5. PREPARACIÓN DEL TEJIDO INTESTINAL

Para realizar las diferentes experiencias los animales de los distintos grupos de ratas fueron mantenidos en ayunas durante 24 hs, en jaulas metabólicas individuales con libre acceso al agua.

Los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal). Se fijaron a la tabla de disección en decúbito dorsal y se les

realizó la incisión en la línea media de la zona abdominal. Se ubicó el píloro y se cortó; luego suavemente se traccionó con la mano desde el píloro hasta el ligamento de Treitz, se cortó y se separó el duodeno. Se extrajo el resto del intestino delgado cortando a la altura de la válvula íleo – cecal. El tejido se extrajo rápidamente previa punción cardíaca. Las porciones de intestino obtenidas se sumergieron en solución fisiológica fría. Se procedió a lavar cada una de estas porciones con solución fisiológica fría con ayuda de una jeringa de punta roma. Cada porción de intestino se colocó sobre una tabla de disección, y se cortó longitudinalmente y con un portaobjeto se realizó el raspado de la mucosa intestinal. La mucosa fue colocada en tubos *ependorff* previamente pesados para luego obtener el peso por diferencia.

Se realizaron los homogenados correspondientes para cada una de las determinaciones.

### **3.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

#### **3.6.1. Determinación del contenido de hierro en tejido hepático e intestinal**

La concentración de hierro se midió en tejido hepático y en mucosa intestinal. Los tejidos fueron digeridos en digestor Milestone Ethos 900 con bombas de teflón en ác. nítrico /agua oxigenada y posteriormente se realizó la medición del contenido de hierro a 248.3 nm por medio del espectrómetro de absorción atómica de llama GBC Modelo 932 AB, usando atomización por llama de aire – acetileno con deuterio como corrector de fondo. Se empleó el método de curva de calibrado con estándares acuosos certificados para obtener las concentraciones (Ferri y col., 2003).

#### **3.6.2. Evaluación del nivel de lipoperoxidación de las células intestinales**

El grado de lipoperoxidación (LPO) se midió en homogenado total y enriquecido en membranas plasmáticas de intestino.

El homogenado total se obtuvo en una relación de 1:9 (p/v) de tejido intestinal: KCl 1,15%, usando un homogeneizador Potter-Elvehjën (Peters, 1988; Carrillo y col., 1989).

La obtención de la fracción enriquecida en membrana plasmática se llevó a cabo siguiendo el método de Jensen y Berndt (1988) modificado por Villar y col. (2005). Para cada preparación se homogeneizó la mucosa duodenal en solución de sucrosa 250mM, HEPES-Tris 5mM (pH=7,40) y PMSF 100 mM. Los homogenados se centrifugaron y en el fondo de los tubos se formó un pellet recubierto por una capa de sustancia más blanda y color beige denominada *fluffy*, la cual representa las membranas plasmáticas crudas (Peters, 1988).

La cantidad de productos aldehídicos formados por lipoperoxidación fue determinada a partir de la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante la técnica de Ohkawa y col. (1979).

La técnica se basa en la reacción colorimétrica del ácido tiobarbitúrico con malondialdehído (MDA), un producto secundario de la peroxidación lipídica, para formar un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 532nm, usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar.

Brevemente, la mezcla de reacción contenía la muestra, dodecil sulfato de sodio (SDS) 8%, ácido acético 20% y TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,8% pH= 3,00 – 3,40. La reacción se llevó a cabo en baño de glicerina a 95°C (1 hora). Posteriormente se enfrió en un baño de agua, se le agregó ácido tricloroacético 5%, se centrifugó y se leyó la absorbancia a 532 nm.

La cantidad de TBARS se expresó en términos de malondialdehído por g de tejido.

### **3.6.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de las células intestinales**

#### **3.6.3.1. Contenido de glutathion (GSH)**

Empleamos para su determinación el método de Ellman G.L. (1959).

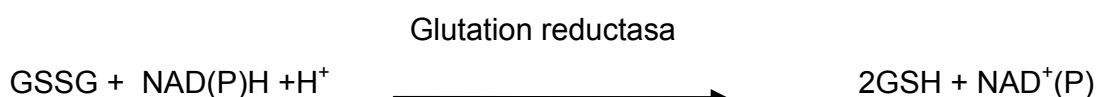
A la mucosa intestinal se le agregó ácido tricloroacético (TCA) al 5% en HCl 0,01 M 1:4 (p/v) y se homogeneizó en frío. Luego se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min.

Se tomó una alícuota del sobrenadante y neutralizó con NaOH 1M. Una vez alcanzado un pH neutro se pipeteó inmediatamente y se realizó la reacción de color con el reactivo 5,5 ditiobis (2 ácido nitrobenzoico) (DTNB) para las incógnitas y para el testigo. Se realizó la lectura dentro de los 5 min a 412 nm. Los resultados obtenidos fueron expresados como  $\mu\text{moles GSH/mg}$  de proteínas.

### 3.6.3.2. Determinación de la actividad glutathion peroxidasa (GSH-Px)

Se utilizó la técnica Paglia y Valentine (1967).

El método se basa en las siguientes reacciones:



La velocidad de formación de GSSG se midió por un decrecimiento en NADPH revelado por la disminución de las densidades ópticas a 340 nm de absorbancia durante 2 o 3 minutos. Se utilizó *buffer* fosfato pH=7,00, glutathion reductasa y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se tuvo en cuenta el coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{\text{NADPH}}$ :  $6,22 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . El resultado fue expresado como micromoles de NADPH calculado sobre la base de la absorbancia molar de la coenzima / minuto/ mg de proteínas en el ensayo.

### 3.6.3.3. Determinación de la actividad enzimática de catalasa

El método utilizado para la medición de la actividad catalasa fue el descrito previamente por Beers y Sizer (1952). Se basa en el seguimiento espectrofotométrico de la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción catalizada por la catalasa es la siguiente:



Para esta determinación se realizaron homogenados (dilución 1:9) preparados con mucosa intestinal en solución de sucrosa 0,25 M.

El medio de reacción contenía *buffer* K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,02 M (pH=7,00) más el sobrenadante de la muestra diluido 1/100. La lectura se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo, siguiéndose la disminución de la absorbancia a 240 nm durante dos minutos. Para el cálculo de la actividad se tuvo en cuenta la parte inicial de la curva (45 s) obteniéndose la pendiente. El coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es ( $\epsilon=0,0394 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). La actividad de la enzima se expresó en U/mg proteínas.

### 3.6.4. Medida de la concentración de proteínas en la mucosa intestinal

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) que utiliza Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0,1 N, CuSO<sub>4</sub> .5 H<sub>2</sub>O al 1%, tartrato de sodio y potasio al 2% en partes iguales y reactivo de Folin. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 660 nm. Los valores obtenidos fueron utilizados para expresar los resultados de otras determinaciones por mg de proteínas.

## 3.7. ANÁLISIS DE PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS

Se realizaron los ensayos reológicos de acuerdo a la guía del Comité para la Estandarización en Hematología (International Committee for Standardization in Hematology, 1986).

### 3.7.1. Filtrabilidad

Fue analizada mediante la técnica descrita por Reid y col. (1976) en un instrumento basado en el modelo diseñado por Kikuchi y col. (1983). Para ello los glóbulos rojos (GR) fueron resuspendidos a hematocrito del 10% en solución salina (PBS) pH: 7,40; 285 mOsm/L y conteniendo 0,25% de albúmina bovina. La suspensión fue filtrada a través de membranas de policarbonato de 13 mm (Nucleopore Corr, USA) con poros de 5 $\mu$ m de diámetro y una presión negativa de 10 cm H<sub>2</sub>O. Los resultados se expresaron como índice de rigidez (IR):

$$IR = (t_s - t_0) / t_0 \times (100/H_{10})$$

Donde  $t_s$  es el tiempo de pasaje de la suspensión de GR;  $t_0$  es el tiempo de pasaje del PBS, y  $H_{10}$  del 10 % de la suspensión de GR, IR estimado por filtrabilidad, es una estimación de la rigidez eritrocitaria que es la inversa de la deformabilidad eritrocitaria.

### 3.7.2. Viscosidad de sangre entera ( $\eta_s$ )

La muestra de sangre entera se obtuvo con EDTA como anticoagulante. Las mediciones fueron realizadas utilizando un viscosímetro cono-plato Wells-Brookfield, a  $H_{10}$  nativo, 37°C y velocidad de corte de 230 s<sup>-1</sup>.

El viscosímetro rotacional de cono-plato consta de un plato fijo y de un cono móvil. Al cono se le pueden imprimir distintas velocidades de rotación lo que determina que sobre el fluido actúen las correspondientes velocidades de deformación y a partir de esto se puede deducir la relación  $\tau - \dot{\gamma}$  (tensión – velocidad de cizallamiento). Los resultados fueron expresados en centipoise (cp).

### 3.7.3. Viscosidad plasmática ( $\eta_p$ )

La muestra de plasma fue obtenida de sangre anticoagulada con EDTA. Las mediciones fueron realizadas usando el viscosímetro de cono-plato Wells-

Brookfield a velocidad de corte de  $230 \text{ s}^{-1}$  (Matrai y col., 1984). Los resultados fueron expresados en centipoise (cp).

### 3.7.4 Viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto estándar de 40% ( $\eta_r$ Hto 40%)

Dado que la viscosidad sanguínea es determinada por la viscosidad plasmática, el hematocrito y la deformabilidad eritrocitaria, se calculó el valor de viscosidad relativa ( $\eta_r$ )= ( $\eta_s/\eta_p$ ) a Hto estándar del 40%, que estima la fluidez de la sangre sin la influencia del Hto mediante la ecuación de Matrai y col. (1986).

$$\eta_r \text{ Hto } 40\% = \eta_r \text{ Hto nativo} \cdot 40/\text{Hto}$$

Las determinaciones fueron realizadas a  $37^\circ\text{C}$ , a un hematocrito ajustado al 40% dado que a esta concentración globular se establece una situación basal, con similar influencia de la fracción celular y del medio de suspensión. Ésta es una condición esencial para determinar la viscosidad relativa de la suspensión globular y poder comparar los resultados con incidencia en las características hemorreológicas de la sangre.

### 3.7.5. Forma celular

Una alícuota de la suspensión salina de eritrocitos normales conteniendo albúmina al 1% se colocó sobre un portaobjeto y se observó con un microscopio invertido.

De acuerdo a la clasificación de Bessis (Bessis, 1973), se pueden distinguir 9 formas y asignarles un valor a cada uno: disco bicóncavo (índice 0); tres tipos de estomatocitos (índices -1, -2, -3); esferoestomatocitos (índice -4); tres tipos de equinocitos (índice +1, +2, +3); esferoequinocitos (índice +4). Se contaron y clasificaron 200 células/muestra y se calculó un índice morfológico (IM) como:

**IM** =  $\Sigma$  (índice de forma x número de células con esa forma)/número total de células



**3.7.6. Agregación eritrocitaria**

Las mediciones fueron realizadas en un instrumento basado en el modelo diseñado por Tomita y col. (1986), que consiste en una cabeza densitométrica que detecta cambios en la transmisión de la luz de una suspensión de glóbulos rojos durante el proceso de agregación y un diodo emisor de la luz infrarroja. Ambos componentes están enfrentados y entre ellos, en un tubo transparente, se coloca la muestra. La cabeza densitométrica está conectada a la computadora. Uno de los extremos del tubo que contiene la muestra se conecta a una bomba de agitación, el circuito de medición registra un gradual incremento de la luz transmitida asociada con la formación de los agregados de los glóbulos rojos. Los resultados experimentales fueron ajustados con la siguiente ecuación, deducida a partir de la cinética del proceso:

$$\frac{\tau}{\tau_0} = \frac{1}{1 + \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{\frac{n_0}{S_0} + 2k_2 n_0 t} - \frac{S_0}{n_0} \right]}$$

Donde:

- $\tau_0$  = intensidad de luz transmitida a  $t=0$
- $\tau$  = intensidad de la luz transmitida a tiempo  $t$
- $n_0$  = nº de partículas independientes a  $t=0$
- $t$  = tiempo en segundos
- $S_0$  = nº de sitios de unión posibles a  $t=0$
- $S_0/n_0$  = nº de sitios de unión por célula a  $t=0$
- $2K_2 n_0$  = velocidad del proceso de agregación

La ecuación anterior tiene dos parámetros:  $S_0/n_0$  y  $2K_2 n_0$ , donde  $S_0/n_0$ , estima el tamaño de los *rouleaux* en el equilibrio y  $2K_2 n_0$ , estima la velocidad de agregación.

### 3.7.7. Fragilidad osmótica

Se utilizó la técnica de Parpart y col. (1947) que se basa en medir la hemólisis de los glóbulos rojos en soluciones que contienen osmolalidades crecientes. Se prepararon soluciones de NaCl cuyas concentraciones osmóticas estaban comprendidas entre 0 y 290 mOsm/kg (0 a 0,145 M NaCl; pH: 7,40). En ellas se resuspendieron glóbulos rojos. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las suspensiones se centrifugaron a 515 g durante 5 minutos.

La hemólisis se determinó fotométricamente a 540 nm, considerando 100% de hemólisis al tubo en el que los glóbulos rojos fueron suspendidos en agua destilada (0 mOsm/Kg).

Con los valores obtenidos se construyeron las curvas de hemólisis (% de hemólisis vs. Concentración de NaCl). La función sigmoidea obtenida se rectificó mediante la ecuación:

$$H = 1 / e^{\beta(x-x_{50})} + 1$$

Donde:

H: porcentaje de hemólisis obtenido a una determinada concentración de NaCl(x).

$\beta$  = parámetro de homogeneidad

X: concentración de NaCl

$X_{50}$  = concentración de NaCl a la cual se obtiene 50% de hemólisis.

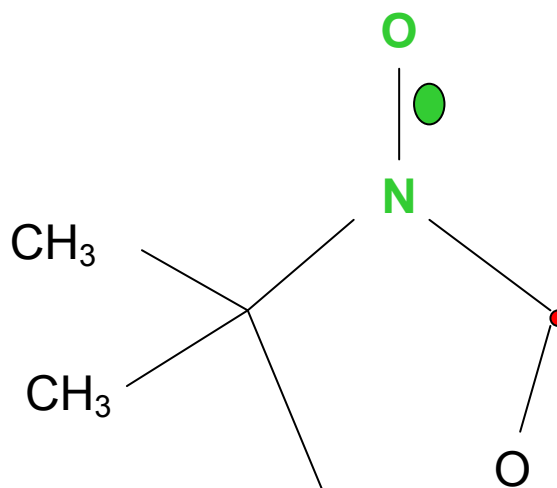
Los parámetros  $X_{50}$  y  $\beta$  fueron utilizados para caracterizar la fragilidad osmótica.

### 3.7.8. Análisis de la fluidez de las membranas de los glóbulos rojos

La resonancia paramagnética nuclear (EPR) es una técnica espectroscópica que detecta electrones desapareados (Campbell y Dwek, 1984). Si la muestra no contiene especies paramagnéticas, como por ejemplo las membranas biológicas, es posible introducir en ella marcadores de espín, que son radicales libres estables. Se utilizaron

marcadores de espín liposolubles n-doxil-ácido esteárico (n-SASL), donde el doxil (4,4-dimetiloxazolidina-N-óxido) reemplaza al carbono n de una molécula de ácido esteárico.

Los marcadores de espín liposolubles utilizados fueron isómeros posicionales del doxil ácido esteárico (n-SASL, n=5, 12, 16) adquiridos en Sigma. Las soluciones stock de los marcadores (8,67mM) se prepararon disolviendo estos últimos en etanol y la conservación se efectuó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



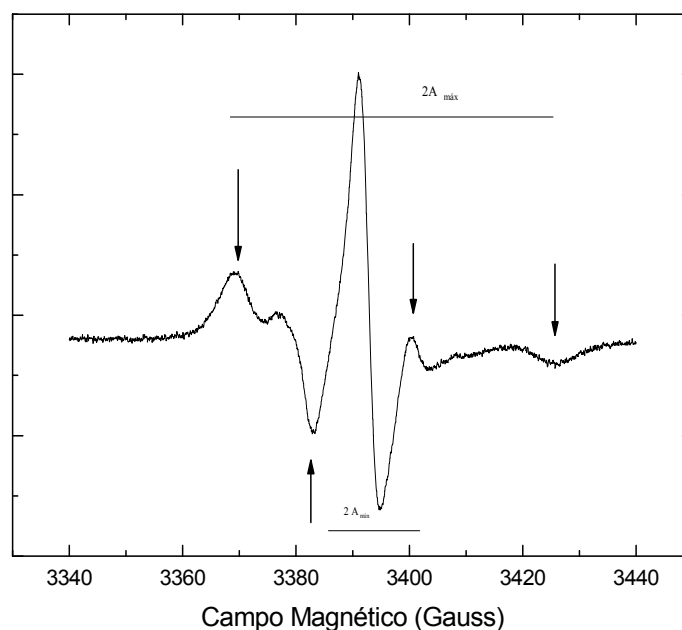
**Figura 3.2:** Estructura del grupo doxil. El grupo nitróxido está señalado en verde y en rojo se encuentra señalado el lugar donde se une químicamente a la molécula del ácido esteárico reemplazando los carbonos 5,12 o 16 de la misma.

De los espectros puede calcularse un parámetro de orden  $S$ , que depende de la amplitud de los movimientos e indirectamente da información sobre la dinámica molecular a diferentes profundidades de la región hidrofóbica. El parámetro de orden ( $0 \leq S \leq 1$ ) considera el ordenamiento espacial respecto al eje director de un cristal líquido, y caracteriza la fluidez o movilidad molecular del sistema (a mayor  $S$ , menor fluidez).

En eritrocitos enteros se determinó el grado de ordenamiento ( $S$ ) de las cadenas acílicas de la bicapa lipídica de la membrana utilizando 5, 12 y 16 doxil esteárico como marcadores de espín liposolubles a distintas profundidades.

Se utilizaron muestras de sangre entera heparinizada. Se lavaron los glóbulos rojos con *buffer* PBS, dos veces. Utilizando los marcadores C5, C12 y C16 con una dilución 1:5 en PBS, se incubaron con el paquete de eritrocitos lavados 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante.

Se cargaron los capilares no heparinizados con el paquete de glóbulos rojos marcados y se midió en el equipo de EPR. Los espectros fueron procesados en computadora. A partir de cada espectro se calcularon los parámetros de orden a distintas profundidades de la membrana.

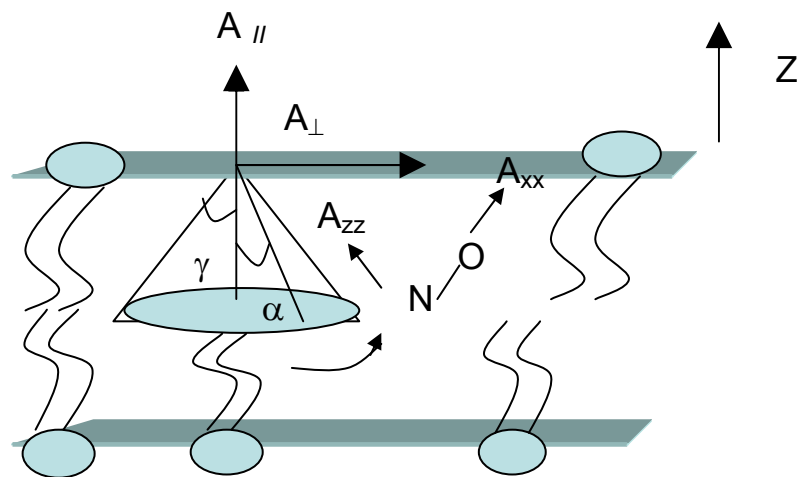


**Figura 3.3:** Modelo de espectro con indicaciones de los valores de los picos del campo magnético que se utilizan para el cálculo de los parámetros de orden.

Cuando los marcadores unidos al ácido esteárico (n-SASL) son incorporados a las estructuras lipídicas, se les impone una restricción en los movimientos que da como resultado un tensor de interacción hiperfina con simetría axial en torno a la dirección normal a las capas lipídicas. De los espectros puede calcularse un parámetro de orden  $S$ , que depende de la amplitud de esos movimientos e indirectamente da información sobre la dinámica molecular a diferentes profundidades de la región hidrofóbica. Siguiendo a Griffith (Griffith y Jost, 1976),  $S$  se calcula a partir de los valores de  $2A_{\text{máx}}$  y  $2A_{\text{mín}}$  tomados del espectro (ver **Figura 3.3**).

El promedio de la anisotropía de un tensor debido a movimientos rápidos se puede definir sobre la base del parámetro de orden S:

$$S = \frac{\text{anisotropía observada}}{\text{máxima anisotropía}}$$



**Figura 3.4:** Movimiento de un grupo nitróxido unido a una cadena de ácido esteárico insertado en una estructura lipídica. El ángulo  $\alpha$  es el que forma el eje z del sistema de ejes principales del tensor  $A$  del grupo nitróxido con el eje principal con el eje normal a la bicapa  $Z$ . El cono de amplitud  $2\gamma$  es el espacio dentro del cual el grupo nitróxido tambalea debido a las isomerizaciones trans-gauche esquematizadas en la base del cono con una trayectoria al azar. El acomplamiento hiperfino medido resultante del promedio rápido de  $A_{zz}$  con  $A_{xx}$  y  $A_{||}$  se denomina  $A_{||}$ . Similarmente  $A_{\perp}$  refleja el promedio del movimiento rápido de  $A_{xx}$  y  $A_{||}$  con  $A_{zz}$ .

La anisotropía observada es  $A_{||} - A_{\perp}$ , y la máxima anisotropía  $A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})$ , donde  $A_{zz}$ ,  $A_{xx}$  y  $A_{yy}$ , son los valores principales del tensor hiperfino para un monocristal, son parámetros conocidos para el marcador doxil y los valores correspondientes son:  $A_{zz} = 32,9$  G,  $A_{xx} = 5,9$  G y  $A_{yy} = 5,4$  G (Ver **Figura 3.4**). En sistemas totalmente ordenados con todas las cadenas hidrocarbonadas con configuración todo *trans* (donde sólo se permite la rotación entorno al eje  $Z$ , con

$\gamma \sim 0$ ) el orbital p del grupo N-O se presenta siempre perpendicular a la superficie de la membrana. En consecuencia, la anisotropía del tensor promediado alcanza su valor máximo con  $A_{II} = A_{zz}$  y  $A_{\perp} = \frac{1}{2} (A_{xx} + A_{yy})$  y  $|S| = 1$ . Cuando las cadenas hidrocarbonadas comienzan a desordenarse, el orbital p deja de estar perpendicular a la superficie de la membrana. En ese caso  $A_{II}$  disminuye su valor pues comienza a contar la contribución de  $A_{xx}$  y  $A_{yy}$ , y  $A_{\perp}$  aumenta por tener la contribución de  $A_{zz}$ . En el caso límite en el que el orbital p efectúa movimientos completamente isotrópicos, el valor de  $A_{\perp}$  se aproxima al de  $A_{II}$  y  $|S| = 0$ .

### 3.7.9. Dosaje de colesterol de membrana de eritrocitos

Dado que la fluidez de membrana puede alterarse por el contenido de colesterol, hemos determinado su concentración en eritrocitos en todos los grupos experimentales.

Se obtuvieron muestras de glóbulos rojos lavados con PBS. Se realizó la lisis de los eritrocitos con agua desionizada. A continuación, se procedió a la extracción de lípidos de membrana siguiendo el método de Rose y Oklender (1965) para lo cual se adicionó 2- propanol mezclando vigorosamente y se dejó una hora en reposo. Luego se agregó cloroformo procediendo de la misma manera que con el solvente anterior. Todo el procedimiento hasta aquí, fue realizado a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó obteniéndose un sobrenadante limpio el cual se separó por inversión directa en un tubo de hemólisis y se evaporó a sequedad en estufa a 37°C. Para resuspender el colesterol se agregó etanol absoluto (Ahmed, 1993) e inmediatamente, luego de agitar bien, se tomaron tres alícuotas en tubos de hemólisis para proceder con la reacción enzimática – colorimétrica con equipo de Wiener Lab. Se agregó el reactivo de trabajo, se incubó a 37°C y se leyó la absorbancia a 500 nm. Se procesaron también testigos con tres concentraciones distintas de colesterol.

A partir de las absorbancias obtenidas para cada muestra, se calculó el promedio y la desviación estándar de las mismas y los miligramos de colesterol contenidos en un mililitro de paquete globular, expresándose los resultados en g/l.

### **3.8. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN SANGRE**

#### **3.8.1. Colesterol total**

Se utilizó el método enzimático colorimétrico de Wiener Lab. para la determinación de colesterol en suero.

Los ésteres de colesterol son hidrolizados por una colesterol esterasa y el colesterol producido en esta reacción, más el colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4- aminofenazona/fenol a un compuesto color rojo. Se lee la absorbancia a 505 nm. Los resultados fueron expresados en mg/dl.

#### **3.8.2. HDL- colesterol**

Se utilizó el reactivo precipitante para la determinación de HDL-colesterol en suero de Wiener Lab.

Se hace una precipitación selectiva mediante el uso de ácido fosfotúngstico en presencia de iones  $Mg^{+2}$ . En el precipitado quedan las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL, VLDL) y en el sobrenadante las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que se separan por centrifugación. Luego se realiza la determinación de colesterol ligado a las HDL, empleando los reactivos correspondientes al dosaje de colesterol por el método enzimático. Los resultados fueron expresados en mg/dl.

### 3.8.3. LDL-colesterol

Se utilizó el reactivo precipitante para la determinación de LDL-colesterol en suero de Wiener Lab.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-AF). Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el colesterol unido a las LDL. Los resultados fueron expresados en mg/dl.

### 3.8.4. Triglicéridos

Se utilizó el método enzimático colorimétrico de Wiener Lab para la determinación de triglicéridos en suero.

Los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerol y ácidos grasos libres, por medio de una combinación especial de lipasas (LPL). El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerol kinasa (GK) y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la glicerol fosfato oxidasa (GPO). El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofantipirina (4-AA) y 4- clorofenol (4-CF), con la acción catalítica de una peroxidasa (POD). Los resultados fueron expresados en mg/dl.

### 3.8.5. Fibrinógeno

La muestra de sangre se tomó con citrato de sodio como anticoagulante en relación 1/9. El ensayo se basa en el método de Clauss designado como



procedimiento de referencia NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Cuando un exceso de trombina se adiciona a un plasma diluido, el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno plasmático. El tiempo de coagulación obtenido se compara posteriormente con una preparación de fibrinógeno estandarizada (Reactivos de Wiener Lab.) Los resultados fueron expresados en mg/dl.

### **3.8.6. Proteínas totales**

Se determinó por el método colorimétrico para proteínas totales en suero de Wiener Lab.

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión  $\text{Cu}^{+2}$  en medio alcalino, para dar un complejo azul-violeta, que se mide a 540 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. Los resultados fueron expresados en g/dl.

### **3.8.7. Albúmina**

Se determinó por el método colorimétrico para la determinación de albúmina en suero de Wiener Lab.

La albúmina del suero se une al colorante bromo cresolsulfon ftaleína ó Verde de Bromocresol (VBC), en un medio de pH= 3,90 para formar un complejo coloreado, cuya intensidad de color se lee a 625 nm y es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra. Los resultados fueron expresados en g/dl.

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos los valores presentados corresponden a la media aritmética  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

Las diferencias estadísticas entre las medias de los parámetros medidos entre grupos fueron analizadas mediante análisis de variancia paramétrico (ANOVA) y no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido por el test de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativamente diferente.

Las correlaciones fueron analizadas por el método de regresión de Spearman.

Para el análisis de los parámetros de orden (S) se utilizó el test de la U de Mann-Whitney para realizar la comparación entre cada uno de los grupos.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONTENIDO DE ALUMINIO EN SUERO, TEJIDO HEPÁTICO E INTESTINAL

Para evaluar el tratamiento con aluminio se determinaron las concentraciones del metal en suero, hígado e intestino, a los 90 días del tratamiento.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca, separándose a continuación el suero donde se determinó la concentración de aluminio (Al), expresándose en ug de Al/l. Los tejidos hepático e intestinal fueron digeridos en Digestor Millestone con bombas de teflón antes de realizar la cuantificación de aluminio por espectrofotometría de absorción atómica, que se expresó en ug de Al/g de tejido húmedo.

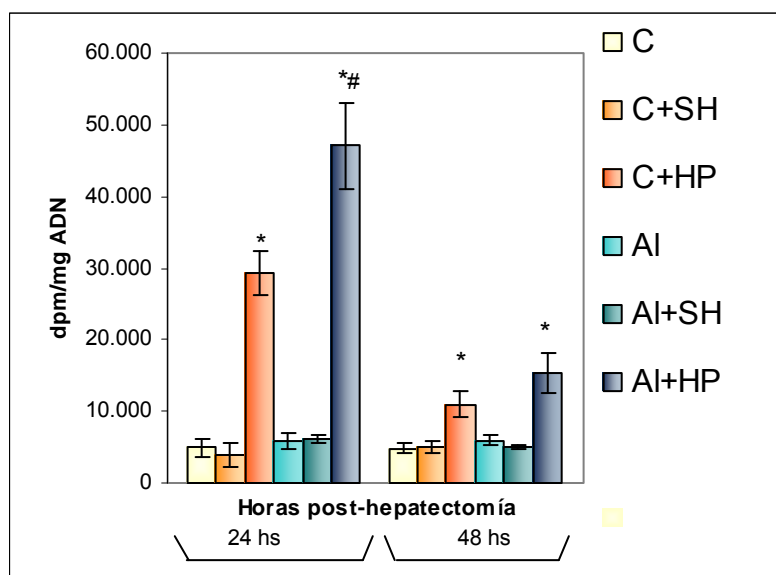
	Hígado ( $\mu\text{g Al/g de tej. húmedo}$ )	Intestino ( $\mu\text{g Al/g de tej. húmedo}$ )	Suero ( $\mu\text{g Al/l}$ )
<b>C</b>	26,0 $\pm$ 9,0	3,5 $\pm$ 0,6	8,5 $\pm$ 4,0
<b>C+SH</b>	22,0 $\pm$ 7,0	2,9 $\pm$ 0,8	8,8 $\pm$ 3,7
<b>C+HP</b>	24,0 $\pm$ 7,0	3,5 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 3,0
<b>Al</b>	130,0 $\pm$ 15,0 <sup>*o</sup>	49,7 $\pm$ 9,2 <sup>*o</sup>	788,0 $\pm$ 47,0 <sup>*o</sup>
<b>Al+SH</b>	124,0 $\pm$ 18,0 <sup>*o</sup>	52,6 $\pm$ 7,4 <sup>*o</sup>	750,0 $\pm$ 51,0 <sup>*o</sup>
<b>Al + HP</b>	110,0 $\pm$ 13,0 <sup>*o</sup>	57,8 $\pm$ 3,1 <sup>*o</sup>	800,0 $\pm$ 40,0 <sup>*o</sup>

**Tabla 4.1:** Concentración sérica y contenidos tisulares de aluminio determinados por absorción atómica. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **Al** vs. **Al+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **Al** según corresponda. \* Diferencia significativa vs. **C**. ° Diferencia significativa vs. **HP** ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. ESTIMACIÓN DEL PROCESO PROLIFERATIVO

La velocidad de regeneración hepática es generalmente evaluada por cambios en la masa hepática, conteo de células en mitosis, y por estimación de la síntesis de ADN por una gran variedad de técnicas, entre las cuales las más utilizadas son: la incorporación al ADN de timidina marcada o de bromodeoxiuridina (Holeček, 1999).

El proceso proliferativo que se produce después de una cirugía resectiva como es la hepatectomía (**HP**) fue monitoreado por la incorporación de timidina tritiada al ADN en el hígado remanente. La **Figura 4.1** muestra la tasa de síntesis de ADN a las 24 horas y 48 horas post-HP. Los animales del grupo Control sin aluminio, muestran el característico máximo a las 24 horas que corresponde al tiempo en el que se produce la mayor síntesis de ADN, que desciende hacia las 48 horas, aunque aún se mantiene elevado al compararlo con un animal SH. El tratamiento con aluminio (**AI**) aumentó el máximo de síntesis a las 24 horas en un 67%, mientras que no produce modificaciones a las 48 hs post-hepatectomía.



**Figura 4.1:** Incorporación de timidina tritiada al ADN: 24 horas y 48 hs después de la cirugía en animales Control, Control + SH y hepatectomizados con y sin tratamiento de aluminio de 80 mg/Kg de peso durante 3 meses. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda. \* Diferencia significativa vs. Control ( $p < 0,05$ ). # Diferencia significativa vs. C+HP 24 hs. ( $p < 0,05$ ).

El tiempo de estudio se fijó a las 48 hs post-hepatectomía parcial, tiempo en el cual se produce la segunda ronda de división celular y la finalización de la activación de los genes tempranos inmediatos (Fausto, 2000).

#### 4.3. ESTUDIO DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Para los grupos control (C), control + cirugía simulada (C+SH), hepatectomizado estudiado a las 48 hs post-cirugía (HP), tratado con hidróxido de aluminio (80 mg/Kg de peso corporal) tres veces por semana durante 90 días (AI), aluminio +cirugía simulada (AI+SH) y la combinación de los dos tratamientos (AI+HP) se muestran en la **Tabla 4.2** los datos correspondientes a la concentración de hierro [Fe] en suero expresada en µg/dl y el porcentaje de saturación de transferrina (% sat. Tf)

	[Fe]	% sat. Tf
C	181,6±3,90	51,9±1,7
C+SH	177,4±4,1	52,3±1,9
C+HP	159,4±3,5*	43,0±2,5*
AI	110,8±2,1*	37,4±2,5*
AI+SH	109,9±1,6*	38,2±1,9*
AI+HP	96,8±2,1* <sup>Φ &amp;</sup>	31,3±2,5* <sup>Φ &amp;</sup>

**Tabla 4.2:** Valores correspondientes a la [Fe] y % sat. Tf: Los datos se expresaron como la media ± EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda.

\* diferencia significativa con respecto al grupo C (p<0,05); <sup>Φ</sup> diferencia significativa entre AI+HP y C+HP (p<0,05); <sup>&</sup> diferencia significativa entre AI+HP y AI (p<0,05); <sup>♦</sup> diferencia significativa entre AI y C+HP (p<0,05).

Como podemos observar en la **Tabla 4.2**, existen cambios significativos en las ratas tratadas con aluminio durante tres meses comparadas con los animales no tratados, la concentración de hierro en suero disminuyó en un 40% y el porcentaje de saturación de transferrina en un 30%. La hepatectomía parcial produce una disminución del 13% en la concentración sérica de hierro y del 17% en la saturación

de transferrina comparados con el grupo control. Ambos tratamientos producen una disminución de la [Fe] del 47% y del % sat. Tf del 40% respecto del grupo control.

Para los grupos control (C), control + cirugía simulada (C+SH), hepatectomizado estudiado a las 48 hs post-cirugía (HP), tratado con hidróxido de aluminio (80 mg/Kg de peso corporal) tres veces por semana durante 90 días (AI), aluminio +cirugía simulada (AI+SH) y la combinación de los dos tratamientos (AI+HP) se muestran en la **Tabla 4.3** los datos correspondientes a:

Hto: hematocrito % ( v/v)

GR: Recuento de Glóbulos Rojos (n° de glóbulos rojos 10<sup>6</sup> / $\mu$ l)

Hb: hemoglobina (g/ dl)

VCM: volumen corpuscular medio (fl:fentolitros)

HCM: hemoglobina corpuscular media (pg)

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl).

	C	C+SH	C+HP	AI	AI+SH	AI+HP
<b>Hto</b>	45,2 $\pm$ 1,40	47,1 $\pm$ 2,3	39,1 $\pm$ 2,4*	40,5 $\pm$ 2,0*	38,6 $\pm$ 1,5*	33,4 $\pm$ 1,9* $\Phi$ &
<b>GR</b>	7,93 $\pm$ 0,12	8,82 $\pm$ 0,41	6,83 $\pm$ 0,25	7,23 $\pm$ 0,78	8,08 $\pm$ 0,68	7,73 $\pm$ 0,6
<b>Hb</b>	12,8 $\pm$ 0,30	13,0 $\pm$ 0,6	9,1 $\pm$ 0,5*	11,7 $\pm$ 0,3*	11,2 $\pm$ 0,4*	10,8 $\pm$ 0,9*
<b>VCM</b>	58,8 $\pm$ 1,10	57,6 $\pm$ 1,5	57,6 $\pm$ 1,6	47,0 $\pm$ 1,7* $\blacklozenge$	48,3 $\pm$ 1,1* $\blacklozenge$	46,0 $\pm$ 1,7* $\Phi$
<b>HCM</b>	17,7 $\pm$ 0,30	16,9 $\pm$ 0,8	17,6 $\pm$ 0,2	15,5 $\pm$ 0,5* $\blacklozenge$	15,1 $\pm$ 0,3* $\blacklozenge$	14,9 $\pm$ 0,4* $\Phi$
<b>CHCM</b>	30,6 $\pm$ 0,74	31,07 $\pm$ 0,53	31,68 $\pm$ 0,66	31,82 $\pm$ 1,13	32,02 $\pm$ 0,78	32,47 $\pm$ 0,72

**Tabla 4.3:** Valores hematológicos en los grupos experimentales: Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda.\* diferencia significativa con respecto al grupo C (p<0,05);  $\Phi$  diferencia significativa entre AI+HP y C+HP (p<0,05); & diferencia significativa entre AI+HP y AI (p<0,05);  $\blacklozenge$  diferencia significativa entre AI y C+HP (p<0,05).

En la **Tabla 4.3** podemos observar que el VCM y la HCM sólo se modificaron significativamente por el tratamiento con aluminio. La Hb disminuye un 29% por la

**HP** comparada con el grupo **C** y sólo disminuye un 9% por el tratamiento con aluminio; ambos tratamientos en forma conjunta producen una disminución del 16%.

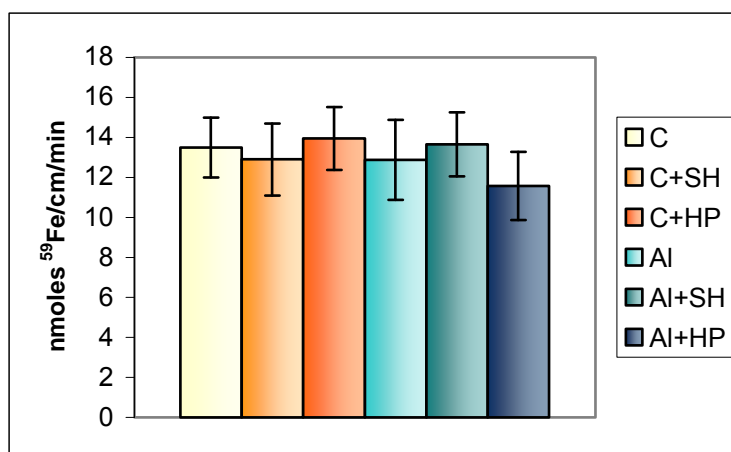
La **HP** produce una disminución del 14% en el Hto; el **Al** una disminución del 11% y cuando las ratas tratadas con aluminio son sometidas a hepatectomía parcial, es decir cuando los tratamientos se realizan en forma conjunta (**Al+HP**), se observa un efecto mayor sobre el Hto, con una disminución del 27%.

#### 4.4. TRANSPORTE INTESTINAL DE HIERRO ( $^{59}\text{Fe}$ )

Dentro de los parámetros hematológicos estudiados observamos que la concentración sérica de hierro se encontraba disminuida. Por lo tanto, consideramos de interés analizar la absorción intestinal de hierro mediante el modelo del asa intestinal *in situ* frente a los tratamientos experimentales, teniendo en cuenta que se produce una regulación de la absorción intestinal del hierro de la dieta en respuesta a requerimientos sistémicos, como podría representar la disminución de la concentración de hierro sérico observada.

Los datos de la absorción intestinal de hierro ( $^{59}\text{Fe}$ ) en los grupos control (**C**), control + cirugía simulada (**C+SH**), hepatectomizado estudiados a las 48 hs post-cirugía (**HP**) y tratado con hidróxido de aluminio (80 mg/Kg de peso corporal) tres veces por semana durante 90 días (**Al**), aluminio +cirugía simulada (**Al+SH**) y la combinación de ambos (**Al+ HP**) se muestran en la **Figura 4.2**.





**Figura 4.2:** Transporte intestinal de <sup>59</sup>Fe. Los datos se expresaron como la media ± EEM de 6 animales por grupo. Las comparaciones estadísticas se realizaron con un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

El transporte intestinal de hierro que fue estudiado por la técnica de asas intestinales *in situ* utilizando <sup>59</sup>Fe, mostró que no existen diferencias significativas en los micromoles de hierro absorbidos por minuto y por centímetro de intestino delgado (duodeno) para el período de estado estacionario (120 minutos) entre los grupos experimentales.

#### 4.5. CONCENTRACIONES DE HIERRO EN HÍGADO Y MUCOSA INTESTINAL

Los tejidos hepático e intestinal fueron digeridos en digestor Milestone Ethos 900 con bombas de teflón en ácido nítrico/agua oxigenada y posteriormente se realizó la medición del contenido de hierro a 248.3 nm por medio del espectrómetro de absorción atómica de llama GBC Modelo 932 AB, usando atomización por llama de aire – acetileno, con deuterio como corrector de fondo. Se empleó el método de curva de calibrado con estándares acuosos certificados para obtener las concentraciones. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.4**.

	<b>Hígado</b> ( $\mu\text{g Fe/g}$ de tejido húmedo)	<b>Intestino</b> ( $\mu\text{g Fe/g}$ de tejido húmedo)
<b>C</b>	107 $\pm$ 12	58 $\pm$ 19
<b>C+SH</b>	105 $\pm$ 13	56 $\pm$ 11
<b>C+HP</b>	110 $\pm$ 10	40 $\pm$ 16
<b>Al</b>	106 $\pm$ 6	34 $\pm$ 16
<b>Al+SH</b>	101 $\pm$ 8	31 $\pm$ 10
<b>Al + HP</b>	93 $\pm$ 11	35 $\pm$ 7

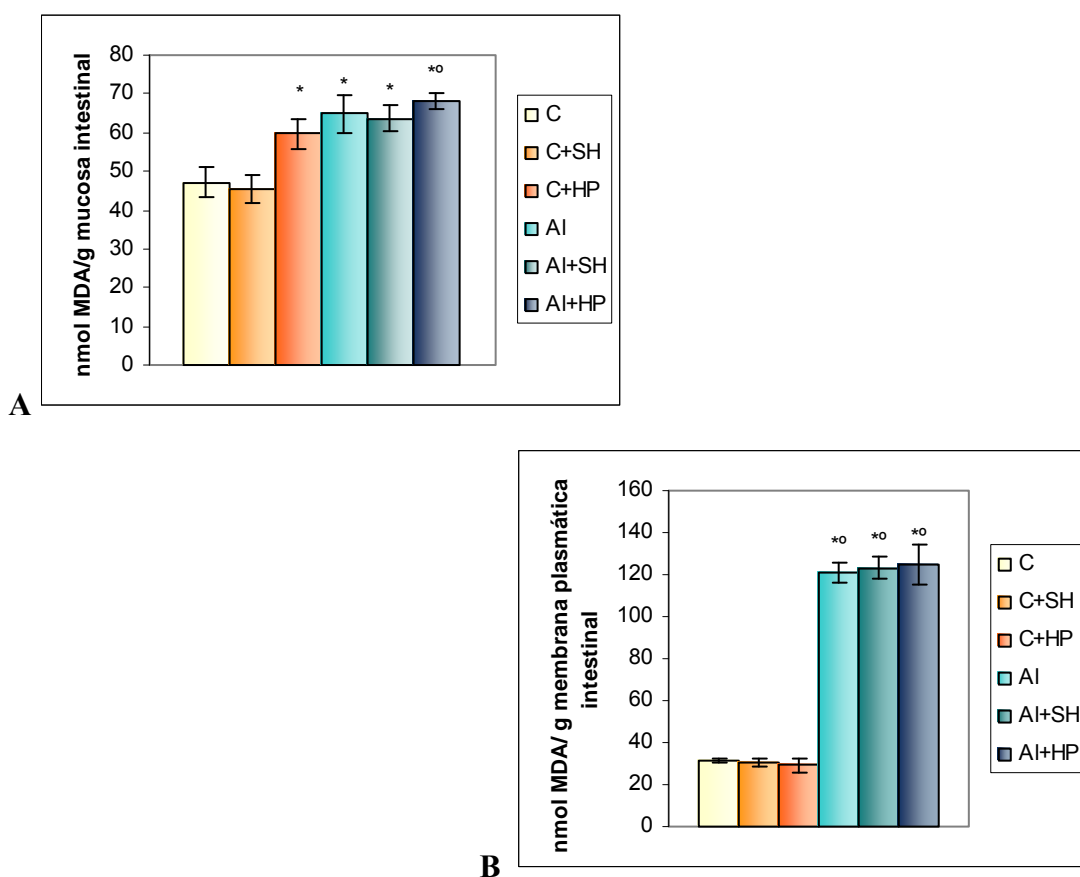
**Tabla 4.4:** Contenido de hierro en hígado e intestino. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo.

El contenido total de hierro en hígado de ratas hepatectomizadas y/o tratadas con aluminio no tiene diferencias significativas al compararla con el grupo control (C). El contenido de hierro en intestino no presenta modificaciones frente a los distintos tratamientos.

Habiendo analizado las concentraciones de hierro en hígado e intestino, y dado que las absorciones intestinales no tuvieron la variación esperada frente a concentraciones plasmáticas disminuidas del hierro y en base a las observaciones de Pountney y col.(1999), nos planteamos analizar el nivel de lipoperoxidación y la capacidad antioxidante de las células intestinales, como una posible explicación de la falta de la respuesta esperada, es decir la ausencia de un aumento en la absorción intestinal del hierro.

#### 4.6. NIVEL DE LIPOPEROXIDACIÓN DE LAS CÉLULAS INTESTINALES

El nivel de lipoperoxidación (LPO) es un parámetro relacionado con el daño oxidativo de las células. La LPO es iniciada por el radical libre  $\cdot\text{OH}$  a través de la extracción de átomos de hidrógeno a los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas celulares.



**Figura 4.3:** Lipoperoxidación. Nivel de lipoperoxidación en homogenado total (A) y en fracción enriquecida en membranas plasmáticas intestinales (B). Los resultados del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico fueron expresados como nmol de malondialdehído/g de tejido (mucosa o fracción enriquecida en membrana plasmática intestinal). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda. \*diferencia significativa vs. C. °diferencia significativa vs. C+HP (p<0,05).

En la **Figura 4.3** se observan los niveles de LPO en el homogenado total de mucosa intestinal y en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas, estimado a

través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en homogenados totales (**A**) y en fracción enriquecida en membranas plasmáticas (**B**), expresados como nmol de malondialdehído /g de tejido húmedo, en el grupo Control y en los grupos **SH** y **HP**, a las 48 horas post-cirugía, tratados con solución fisiológica o con **Al**.

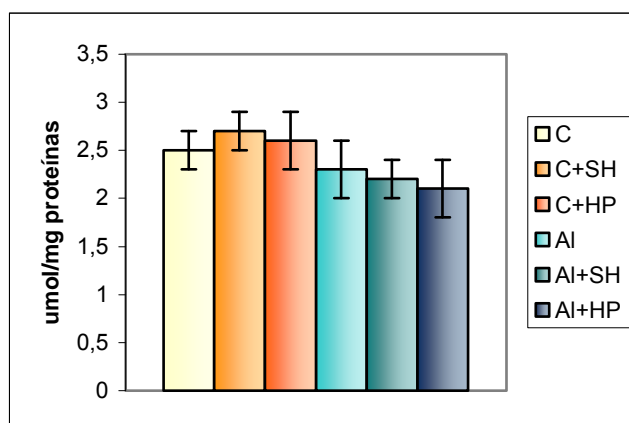
La lipoperoxidación medida en términos de TBARS, fue significativamente incrementada en homogenado total de intestino en los grupos **C+HP** (37%), **Al** (26%) y **Al+HP** (44%) comparados con el grupo control. Por otro lado, el nivel de lipoperoxidación en la fracción enriquecida en membrana plasmática intestinal resultó significativamente mayor al 100% en todos los grupos experimentales tratados con aluminio, comparados con los grupos **C** y **C+HP** (**Figura 4. 3**).

#### **4.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS INTESTINALES**

La célula posee diversos mecanismos para protegerse de los efectos dañinos de los ROS, entre ellos, altos niveles de antioxidantes de bajo peso molecular como el glutathion (GSH) o la vitamina C, y enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutathion peroxidasa (GSH-Px).

##### **4.7.1. Contenido de glutathion (GSH)**

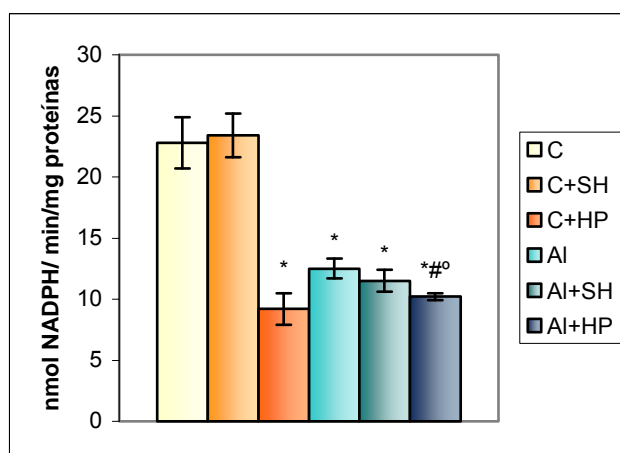
El contenido de glutathion se evaluó como uno de los antioxidantes intracelulares más concentrado, con niveles que van desde 1 hasta 10 mM. Al finalizar el tiempo de tratamiento con **Al** o con solución fisiológica, se sometió a los animales a cirugía simulada o a hepatectomía parcial. A las 48 horas post- cirugía, se procedió a extraer el intestino y a procesarlo como se describe en el ítem **3.5** de metodología. En la **Figura 4.4** puede observarse que el contenido de glutathion no presentó diferencia significativa en los distintos grupos experimentales.



**Figura 4.4:** Contenido de compuestos sulfhidrilos no proteicos (GSH). Los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EEM para 6 animales por grupo.

#### 4.7.2. Actividad de la enzima glutathion peroxidasa (GSH-Px)

La función de la GSH-Px es reducir los hidroperóxidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno utilizando para ambas reacciones selenio como cofactor y glutathion.



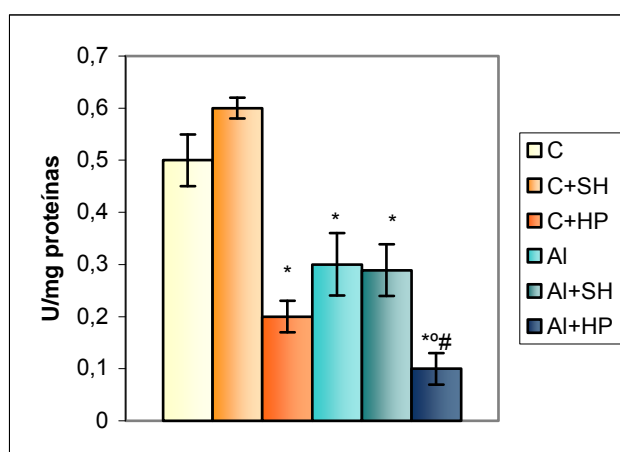
**Figura 4.5:** Actividad de la enzima glutathion peroxidasa. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y Al vs. Al+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. Al según corresponda \* $p < 0,05$  vs. C. #  $p < 0,05$  vs. Al. ° $p < 0,05$  vs. C+HP.

En la **Figura 4.5** puede observarse una disminución de la actividad de la GSH-Px en el grupo **HP** del 61% y una disminución del 44% en el grupo **Al** con respecto al grupo **C**. Cuando los animales fueron sometidos a ambos tratamientos (**Al+HP**) la disminución de la actividad de GSH-Px fue del 57%.

#### 4.7.3. Actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la CAT se determinó con la finalidad de evaluar la capacidad celular para depurar  $H_2O_2$ . Las determinaciones se realizaron en homogenado total de mucosa intestinal de todos los grupos experimentales.

En la **Figura 4.6** se observa la actividad de CAT en los grupos experimentales expresada en U/mg de proteínas de la mucosa intestinal.



**Figura 4.6:** Actividad de la enzima (CAT). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **Al** vs. **Al+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **Al** según corresponda. \* $p < 0,05$  vs. **C**. #  $p < 0,05$  vs. **Al**. \*o#  $p < 0,05$  vs. **C+HP**.

Como puede observarse el tratamiento con **Al** produjo una disminución del 70% en la actividad de la CAT, la **HP** reduce esta actividad en un 57% y al combinar ambos tratamientos, se observa un mayor efecto sobre la actividad de CAT, ya que la misma se reduce en un 87% en el grupo **Al+HP** (**Figura 4.6**).

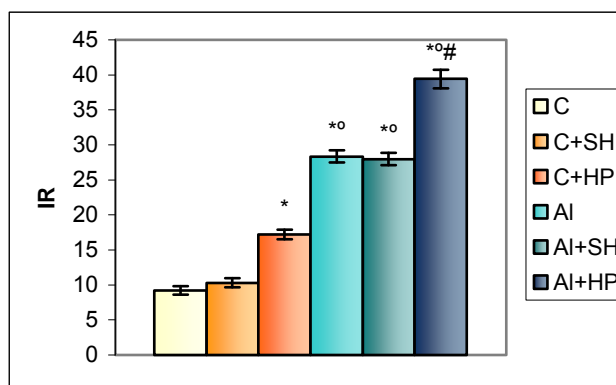
#### 4.8. PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS

Los resultados obtenidos en los parámetros hematológicos estudiados (**Tabla 4.2 y Tabla 4.3**), para los tratamientos con aluminio y hepatectomía parcial, permitió plantear la hipótesis de la existencia de posibles modificaciones en el comportamiento reológico del flujo sanguíneo. Por ende, nos planteamos analizar algunos parámetros hemorreológicos.

##### 4.8.1. Índice de rigidez

El índice de rigidez (**IR**) estimado a través de la técnica de filtrabilidad permite estimar la rigidez eritrocitaria que es la inversa de la deformabilidad de los glóbulos rojos. La técnica de medición de la filtrabilidad es sensible a los cambios en la relación área/volumen de los eritrocitos.

En la **Figura 4.7** se observa el índice de rigidez para cada uno de los grupos experimentales.



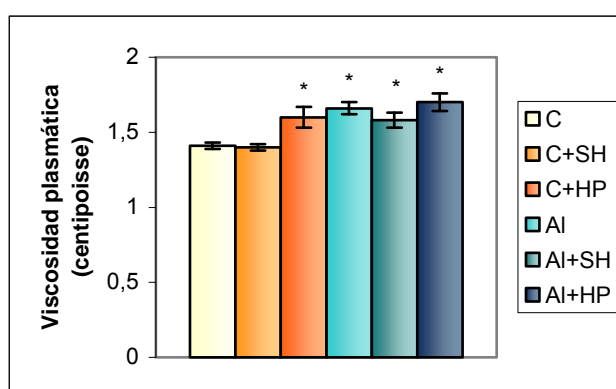
**Figura 4.7:** Índice de rigidez eritrocitaria (IR). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda. \* diferencia significativa con respecto al grupo Control (**C**) ( $p < 0,05$ ). ° diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **AI** ( $p < 0,05$ ). # diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **HP** ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en la **Figura 4.7** el tratamiento con **Al** produce un aumento del 180% en el IR, la **HP** un aumento del 89% y la combinación de ambos tratamientos (**Al+HP**) produce un aumento del IR (glóbulos rojos menos deformables) mucho mayor que cada uno de los tratamientos por separado.

#### 4.8.2. Viscosidad plasmática ( $\eta_p$ )

El plasma es una solución acuosa que contiene macromoléculas proteicas (albúmina, globulinas, fibrinógeno) y sales, así como también pequeñas cantidades de hormonas y productos metabólicos. En general puede considerarse que el plasma presenta un comportamiento reológico de tipo newtoniano o sea que la relación tensión de cizallamiento-velocidad de deformación es lineal, y queda definido por el valor de viscosidad. Las variaciones de la viscosidad plasmática dependen en gran medida de las alteraciones de las proteínas que lo constituyen.

Los resultados de viscosidad plasmática a una velocidad de cizallamiento de  $230s^{-1}$  para los diferentes grupos experimentales se observan en la **Figura 4.8**, estando expresados en centipoise.



**Figura 4.8:** Viscosidad plasmática. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **Al** vs. **Al+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **Al** según corresponda \* diferencia significativa con respecto al grupo Control (**C**) ( $p < 0,05$ ).



La viscosidad plasmática mostró un aumento significativo en todos los grupos tratados con respecto al grupo control, no existiendo diferencias significativas entre los grupos de animales expuestos a los distintos tratamientos.

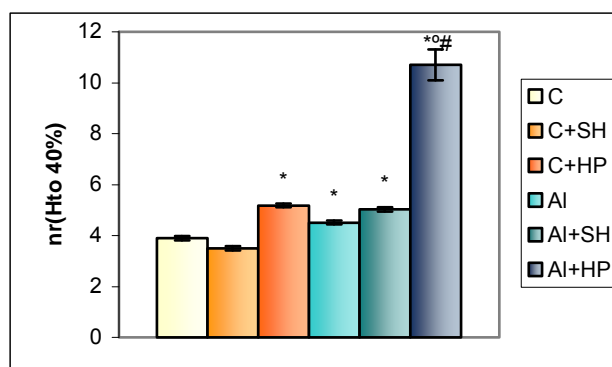
#### **4.8.3. Viscosidad sanguínea relativa corregida a hematocrito 40% ( $\eta_r$ Hto 40%)**

Teóricamente, al cizallar la sangre a altas velocidades de deformación, como lo realizamos en nuestra experiencia a  $230 \text{ s}^{-1}$ , desaparece la agregación de los glóbulos rojos. Cuando la velocidad de deformación es mayor a  $100 \text{ s}^{-1}$  los eritrocitos se desagregan completamente y fluyen en forma individual y por lo tanto es esperable que la sangre, en estas condiciones, presente un comportamiento newtoniano. Así el valor de viscosidad es influenciado por: la viscosidad plasmática, el hematocrito, la deformabilidad eritrocitaria, la temperatura, la concentración de plaquetas y la concentración de leucocitos.

Cuando los hematíes son rígidos no se pueden orientar en la dirección del flujo ni pueden tomar una forma eliptocítica, lo que provoca una importante perturbación de las líneas de corriente y una gran distorsión del flujo que se traduce en aumento de la viscosidad sanguínea. Al calcular la viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto 40%, la viscosidad sanguínea se independiza de la influencia del Hto.

En la **Figura 4.9** se muestran los resultados de la viscosidad sanguínea relativa corregida a hematocrito 40% calculados aplicando la ecuación de Matrai.

Los valores obtenidos muestran un aumento significativo de la viscosidad sanguínea del 28% en **HP** y del 23% en **AI** con respecto al grupo control. El grupo **AI+HP** muestra un aumento del 182% respecto del grupo control, lo que muestra un efecto mucho mayor que cada uno de los tratamientos por separado.

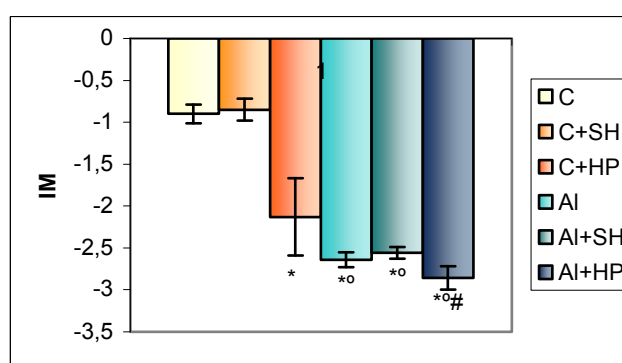


**Figura 4.9:** Viscosidad sanguínea relativa corregida a Hto 40% ( $\eta_r$  Hto 40%). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda. \* diferencia significativa con respecto al grupo **C** ( $p < 0,05$ ). ° diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **AI** ( $p < 0,05$ ). # diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **HP** ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8.4. Forma celular

La clasificación de la forma eritrocitaria se realizó de acuerdo a Bessis, el cual distingue 9 formas, como se indicó en sección metodología 3.7.5. Se contaron y clasificaron 200 células/ muestra y se calculó el índice morfológico (**IM**).

En la **Figura 4.10** se observan los valores del IM obtenido para los diferentes grupos experimentales.



**Figura 4.10:** Índice morfológico eritrocitario. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda \* diferencia significativa con respecto al grupo **C** ( $p < 0,05$ ). # diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **AI** ( $p < 0,05$ ). ° diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo **HP** ( $p < 0,05$ ).

Como podemos observar en la **Figura 4.10** el índice morfológico disminuye significativamente con respecto al grupo control tanto en hepatectomía parcial (**HP**) como en el tratamiento con aluminio (**Al**), lo cual demuestra que existe un aumento de las formas eritrocitarias estomatocíticas.

#### 4.8.5. Agregación eritrocitaria

El proceso de agregación eritrocitaria es reversible y el sentido en el cual procede depende del balance entre fuerzas agregantes de las macromoléculas y las desagregantes de la repulsión electrostática y el efecto de cizallamiento producido por el flujo. Cuando la velocidad de flujo es baja o nula, se forman agregados que se rompen cuando aumenta la velocidad de flujo. Cuando el flujo sanguíneo se enlentece, la formación de agregados produce un aumento de la viscosidad aparente y a la inversa cuando la velocidad aumenta.

La alteración de la forma celular del eritrocito disminuye la velocidad del proceso sin afectar significativamente el tamaño final de los agregados, en tanto que la disminución de la capacidad de las células para deformarse disminuye la tendencia agregante. Ambos factores actuarían interfiriendo en la capacidad de las células para entrar en contacto.

En la **Tabla 4.5** se muestran los valores de los parámetros obtenidos que estiman el tamaño promedio de los *rouleaux* o agregados, a través del coeficiente de agregación  $s_0/n_0$  y la velocidad de agregación de los mismos  $2k_2n_0$ .

	<b>C</b>	<b>C+SH</b>	<b>C+HP</b>	<b>Al</b>	<b>Al+SH</b>	<b>Al + HP</b>
<b><math>2k_2n_0</math></b>	0,61±0,04	0,63±0,02	0,53±0,05*	0,50±0,03*	0,52±0,05*	0,44±0,03* <sup>o</sup> #
<b><math>s_0/n_0</math></b>	1,75±0,01	1,71±0,03	1,74±0,03	1,69±0,01	1,73±0,02	1,70±0,04

**Tabla 4.5:** Velocidad de agregación eritrocitaria ( $2k_2n_0$ ) y coeficiente de agregación  $s_0/n_0$ . Los datos se expresaron como la media ± EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **Al** vs. **Al+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **Al** según corresponda. \* ( $p < 0,05$ ) vs. **C**. <sup>o</sup>( $p < 0,05$ ) vs. **C+HP**. # ( $p < 0,05$ ) vs. **Al**.

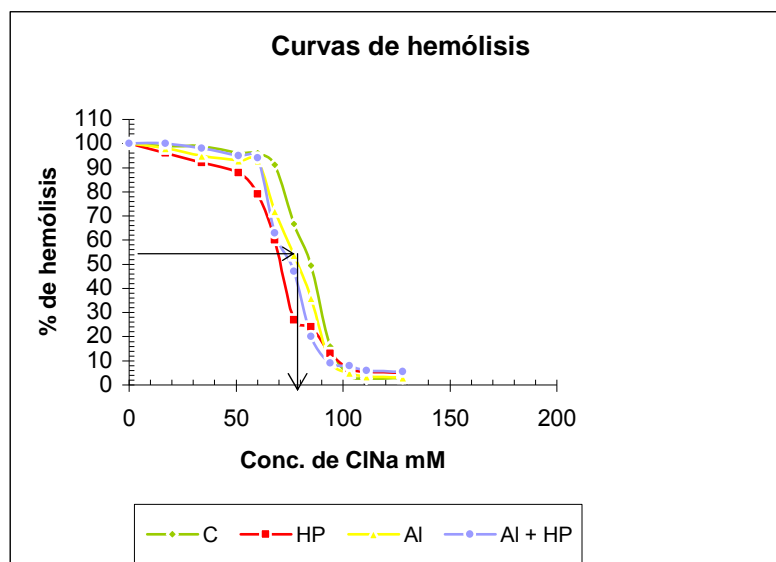
Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de la velocidad de agregación eritrocitaria en los grupos de animales tratados con aluminio (19%) o sometidos a hepatectomía parcial (14%) y también en el grupo **Al+HP** (28%) al compararlos con el grupo **C**.

El coeficiente de agregación (tamaño de los agregados) no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales.

#### 4.8.6. Fragilidad osmótica

Se determinó a través del análisis de las curvas de hemólisis de los glóbulos rojos obtenidos al suspender eritrocitos en solución de ClNa de distintas concentraciones osmolares.

En la **Figura 4.11** se observa un modelo de las curvas de hemólisis obtenidas para los diferentes grupos experimentales.



**Figura 4.11:** Modelo de las curvas de hemólisis donde se marca el  $X_{50}$  (concentración de ClNa a la cual se obtiene el 50% de hemólisis).

A partir de estas curvas se obtuvieron los parámetros  $X_{50}$  y  $\beta$  que fueron utilizados para caracterizar la fragilidad osmótica de los hematíes. Donde  $X_{50}$  es una medida de la habilidad promedio de las células para resistir las desviaciones de la isotonicidad y  $\beta$  es un parámetro de homogeneidad en relación a la población de glóbulos rojos y su respuesta a los cambios de concentración del ClNa, por lo tanto al disminuir  $\beta$  aumenta la heterogeneidad de la respuesta frente a cambios osmóticos.

	<b>C</b>	<b>C+SH</b>	<b>C+HP</b>	<b>Al</b>	<b>Al+SH</b>	<b>Al+HP</b>
<b><math>X_{50}</math></b>	81,56±0,40	80,96±0,50	75,07±0,62 <sup>*#</sup>	69,95±0,24 <sup>*°</sup>	68,87±0,26 <sup>*°</sup>	75,13±0,35 <sup>*#</sup>
<b><math>\beta</math></b>	0,10±0,008	0,09±0,007	0,079±0,005 <sup>*</sup>	0,064±0,003 <sup>*°</sup>	0,059±0,004 <sup>*°</sup>	0,074±0,002 <sup>*#</sup>

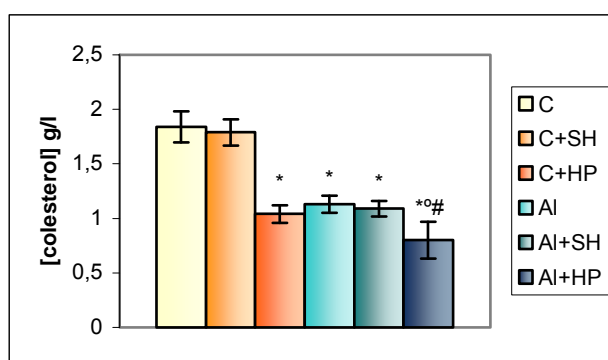
**Tabla 4.6:** Resistencia osmótica ( $X_{50}$ ) y parámetro  $\beta$  para todos los grupos estudiados. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **Al** vs. **Al+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **Al** según corresponda. <sup>\*</sup>( $p<0,05$ ) vs. **C**. <sup>°</sup>( $p<0,05$ ) vs. **C+HP**. <sup>#</sup>( $p<0,05$ ) vs. **Al**.

Como puede observarse los parámetros  $X_{50}$  y  $\beta$  disminuyeron significativamente en todos los grupos tratados al compararlos con el grupo control. En el caso del  $X_{50}$  el grupo **HP** disminuyó 12%, el grupo **Al** disminuyó 14% y la combinación de tratamientos (**Al+HP**) produjo una disminución del 8% con respecto al grupo control. Analizando el parámetro de homogeneidad  $\beta$  observamos que disminuyó un 21% para el grupo **HP**, un 36% para el grupo **Al** y un 26% para el grupo **Al+HP**, comparados con el grupo control. Por lo tanto, tanto la hepatectomía como el tratamiento con aluminio producen aumento de la fragilidad osmótica y mayor heterogeneidad en la respuesta de la población de eritrocitos a los cambios osmóticos.

#### 4.9. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA FLUIDEZ DE MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS

#### 4.9.1. Contenido de colesterol en la membrana de eritrocitos

Dado que el colesterol constituye casi la mitad del componente lipídico de la membrana eritrocitaria, influyendo en sus características, se determinó su concentración en las membranas de los glóbulos rojos de todos los grupos experimentales.



**Figura 4.12:** Concentración de colesterol de membrana de eritrocitos. Los datos se expresaron en g/l, como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda. \*  $p < 0,05$  vs. C. #  $p < 0,05$  vs. AI. °  $p < 0,05$  vs. C+HP.

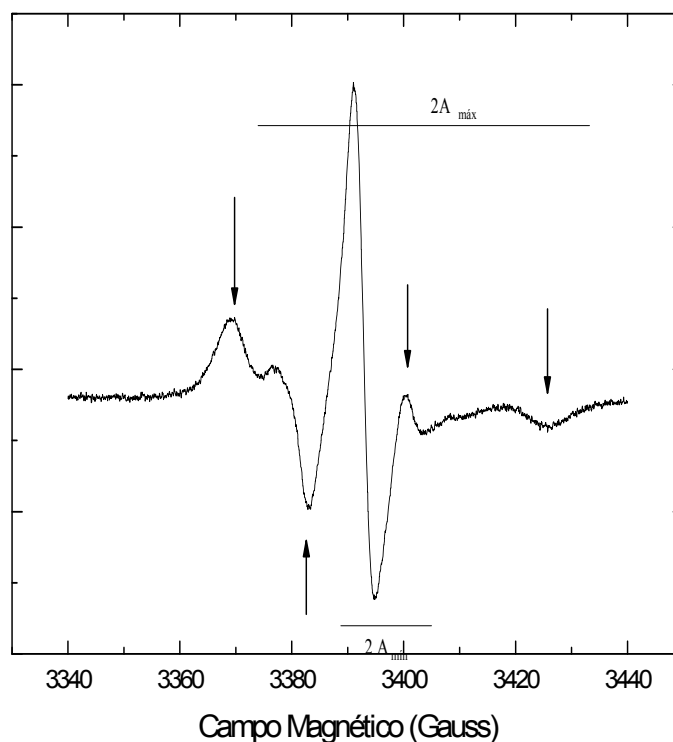
En la **Figura 4.12** se puede observar la disminución significativa de los valores de concentración de colesterol de membrana en los animales con hepatectomía parcial (45%) y en los tratados con aluminio (40%). También se puede apreciar la profundización de este descenso cuando se combinaron los tratamientos en el grupo **AI+HP** (64%).

#### 4.9.2. Fluidez de la membrana eritrocitaria

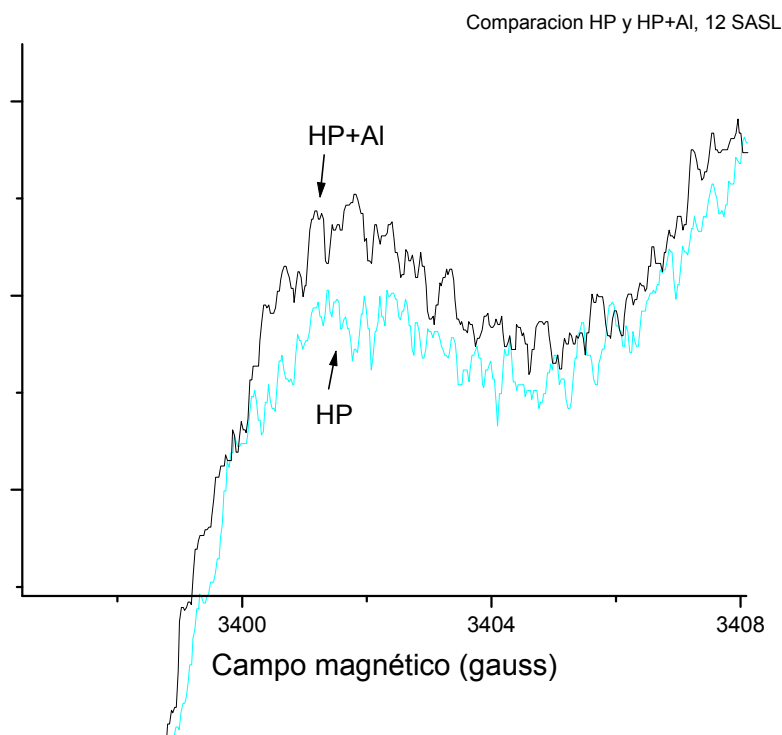
Analizamos la región hidrofóbica de la membrana utilizando los marcadores n-doxil ácido esteárico (n-SASL), con  $n = 5, 12$  y  $16$ . El ácido esteárico se incorpora a las estructuras lipídicas en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Para  $n$  pequeño, el marcador detecta la región interior próxima a las cabezas

polares. Al aumentar  $n$ , el marcador queda cada vez más sumergido en la región hidrofóbica del agregado. A pesar de que el anillo donde se ubica el radical nitróxido es relativamente grande, la proporción de n-SASL utilizada (<1%) no afecta la estructura del agregado.

Estrictamente hablando el parámetro de orden  $S$  ( $0 \leq S \leq 1$ ) se refiere a un ordenamiento espacial respecto al eje director de un cristal líquido. Si suponemos que el ácido graso marcado tiene un movimiento de rotación rápido (en la escala de tiempos EPR) en torno a la normal a la interfase, el movimiento que podemos detectar con EPR es el de *wobbling* originado por la isomerización *trans-gauche* en la cadena hidrocarbonada. El parámetro de orden  $S$ , en este caso, caracteriza la fluidez o movilidad molecular del sistema (a mayor  $S$ , menor fluidez).



**Figura 4.13:** Modelo de espectro con indicaciones de los valores del campo magnético que se utilizan para el cálculo de los parámetros de orden.



**Figura 4.14:** Ampliación de picos con diferencias en los espectros para los grupos **HP** y **Al+HP**.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó aplicando la U de Mann Whitney.

En la **Tabla 4.7** se presentan los valores de los parámetros de orden calculados a partir de los diferentes espectros obtenidos para cada uno de los marcadores de carbono: 5, 12 y 16. Se observa un aumento de S12d (disminución de fluidez) para **Al** vs. **C**, y una disminución de S12d (aumento de fluidez) para **Al +HP** vs. **C**. En el grupo **Al + HP** la disminución de S12d indicaría que la **HP** tiende a fluidificar la bicapa lipídica, revirtiendo la rigidización causada por el tratamiento con **Al** y disminuyendo el ordenamiento de las cadenas acílicas. Por otro lado, los parámetros de orden S5d y S16d no muestran modificaciones con respecto al grupo control, de



donde podemos inducir que a esos niveles la bicapa lipídica no está afectada por ninguno de los tratamientos.

	<b>S5d</b>	<b>S12d</b>	<b>S16d</b>
<b>C</b>	0,667±0,004	0,544±0,003	0,236±0,003
<b>C+SH</b>	0,662±0,005	0,540±0,006	0,229±0,004
<b>C+HP</b>	0,683±0,003	0,504±0,009* #	0,232±0,005
<b>AI</b>	0,680±0,002	0,573±0,005*	0,221±0,01
<b>AI+SH</b>	0,675±0,003	0,570±0,006*	0,226±0,02
<b>AI +HP</b>	0,679±0,004	0,527±0,004* #	0,220±0,01

**Tabla 4.7:** Parámetros de orden calculados a partir de los diferentes espectros para cada uno de los marcadores de espín: C5, C12 y C16. Los datos se expresaron como la media ± EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda. \*p<0,05 vs. **C**. # p<0,05 vs. **AI**.

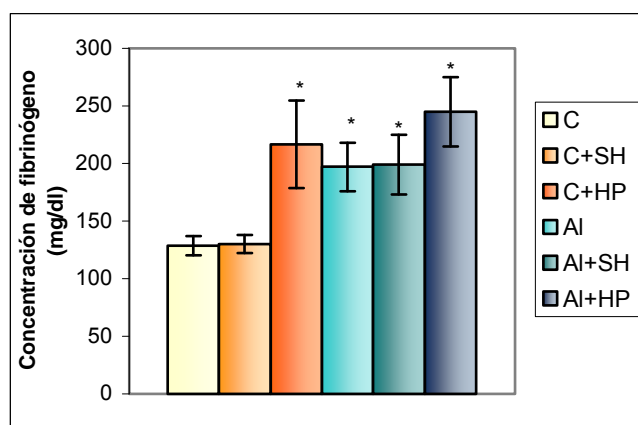
## 4.10. PARÁMETROS RELACIONADOS AL COMPORTAMIENTO HEMORREOLÓGICO

### 4.10.1. Concentración de fibrinógeno plasmático

Entre las distintas sustancias que constituyen el plasma sanguíneo la concentración y la forma de las moléculas proteicas son fundamentales en la

determinación de la viscosidad plasmática. El fibrinógeno, es una de las principales moléculas que interviene en la determinación de la viscosidad plasmática, un segundo lugar ocupan las globulinas y por último la albúmina.

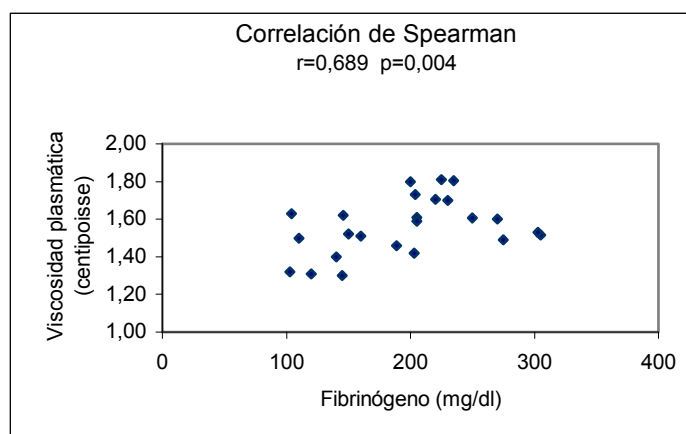
La concentración de fibrinógeno plasmático de animales de los distintos grupos experimentales se presenta en la **Figura 4.15**.



**Figura 4.15:** Concentración de fibrinógeno en plasma. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda.  
\* diferencia significativa con respecto al grupo **C**.  $p < 0,05$ .

La figura muestra un aumento significativo de la concentración de fibrinógeno plasmática en todos los grupos tratados al compararlos con el control, no existiendo diferencia entre ellos.

Como se ha demostrado que la concentración plasmática de fibrinógeno es uno de los factores principales en la determinación de la viscosidad plasmática, se calculó la correlación entre estos dos factores aplicando el coeficiente de correlación de Spearman. En la **Figura 4.16** puede observarse la correlación entre la viscosidad plasmática y la concentración de fibrinógeno.



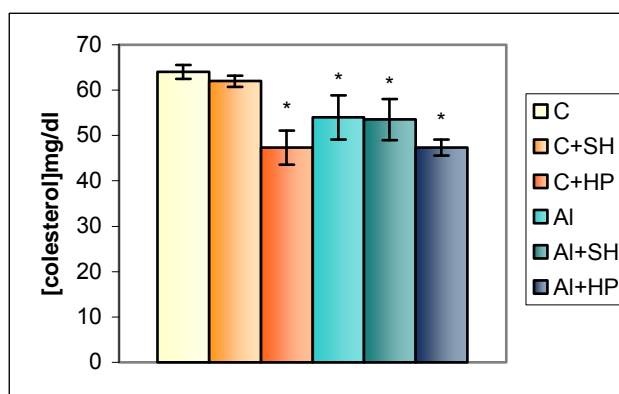
**Figura 4.16:** Correlación entre la viscosidad plasmática y la concentración de fibrinógeno.

Como podemos observar se obtuvo un coeficiente de correlación  $r_s$  de 0,689 con un  $p=0,004$  que evidencia una buena correlación entre las dos variables estudiadas.

#### 4.10.2. Niveles de colesterol total en plasma

El colesterol plasmático participa en el intercambio entre las lipoproteínas plasmáticas y las membranas celulares, entre ellas las membranas de los glóbulos rojos.

En la **Figura 4.17** se presentan los valores de colesterol plasmático obtenidos en los diferentes grupos experimentales.

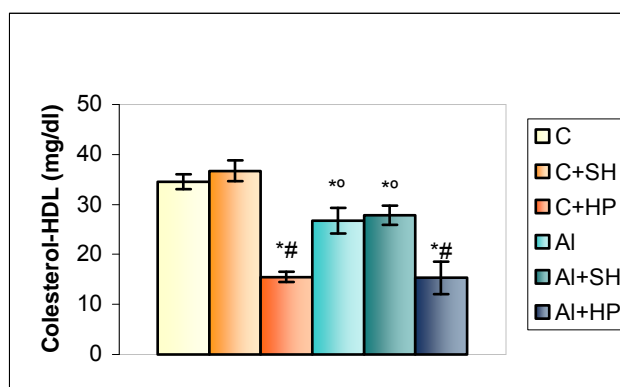


**Figura 4.17:** Concentración de colesterol total en plasma en mg/dl. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda. \* diferencia significativa con respecto al grupo C ( $p < 0,05$ ).

Se puede observar una disminución significativa del colesterol plasmático en el grupo de animales tratados con aluminio del 24% y en HP se observa una disminución del 37% al compararlos con el grupo control, no existiendo diferencia cuando se combinan ambos tratamientos (disminución del 23%).

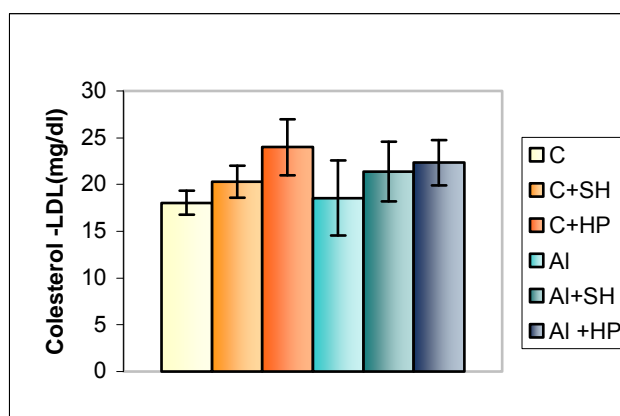
#### 4.10.3. Niveles de colesterol HDL y colesterol LDL en plasma

El contenido de colesterol en % por unidad de peso de lipoproteína, es del 1% en los quilomicrones, 18% en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), 50% en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y 23% en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), teniendo en cuenta que cada una de las mencionadas familias posee distinta actividad biológica, el significado clínico de un aumento o una disminución de colesterol plasmático depende de la o las lipoproteínas que se encuentran en exceso.



**Figura 4.18:** Concentración de colesterol -HDL en mg/dl. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda. \*diferencia significativa con respecto al grupo **C** ( $p < 0,05$ ). °diferencia significativa con respecto al grupo **HP** ( $p < 0,05$ ). #diferencia significativa con respecto al grupo **AI** ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse con respecto al colesterol HDL (**Figura 4.18**) la **HP** produce una disminución del 55%, el **AI** una disminución del 22% y ambos tratamientos una disminución del 55%, al compararlos con el grupo control.

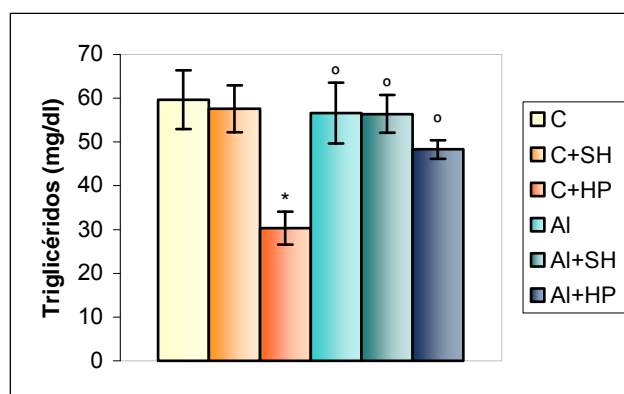


**Figura 4.19:** Concentración de colesterol- LDL en mg/dl . Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo.

La concentración de colesterol LDL no se modificó frente a los distintos tratamientos.

#### 4.10.4. Niveles de triglicéridos en plasma

La concentración plasmática de triglicéridos se determinó por el método enzimático-colorimétrico (Metodología: punto 3.8.4).



**Figura 4.20:** Concentración de triglicéridos en mg/dl. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos C vs. C+SH y AI vs. AI+SH no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. C o vs. AI según corresponda. \*diferencia significativa con respecto al grupo C ( $p < 0,05$ ); ° diferencia significativa con respecto al grupo HP ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en la **Figura 4.20** se produce una disminución significativa de la concentración de triglicéridos solamente en el grupo HP respecto del grupo control, no existiendo diferencias significativas en AI ni en AI+HP al compararlos con el control.

#### 4.10.5. Niveles de proteínas totales, albúmina y relación albúmina/ globulinas

La concentración de proteínas totales interviene en la determinación de la viscosidad plasmática. Si bien el fibrinógeno ocupa el lugar principal, las globulinas y la albúmina también participan en el valor de la viscosidad plasmática observada.

	<b>Proteínas totales</b> g/dl	<b>Albúmina</b> g/dl	<b>Relación</b> Albúmina/Globulinas
<b>C</b>	5,73± 0,08	2,75± 0,02	0,92±0,02
<b>C+SH</b>	5,86±0,05	2,69±0,02	0,84±0,04
<b>C+HP</b>	4,96±0,04*	2,15±0,01*#	0,76±0,01*#
<b>AI</b>	4,70±0,14*	2,48±0,05*°	1,12±0,09*°
<b>AI+SH</b>	4,50±0,08*	2,37±0,03*°	1,11±0,08*°
<b>AI+HP</b>	4,39±0,25*°#	2,096±0,05*°#	1,09±0,01*°

**Tabla 4.8:** Concentración de Proteínas totales y Albúmina en plasma. Relación albúmina /globulinas. Los datos se expresaron como la media ± EEM de 6 animales por grupo. Entre los grupos **C** vs. **C+SH** y **AI** vs. **AI+SH** no existen diferencias significativas por lo tanto sólo se marcan las comparaciones vs. **C** o vs. **AI** según corresponda. \* p< 0,05 vs. **C**; ° p<0,05 vs. **HP**; # p<0,05 vs. **AI**; ♦p<0,05 vs. **AI+HP**.

En la **Tabla 4.8** pueden observarse los valores obtenidos para cada uno de los grupos experimentales. Existe una disminución significativa de las proteínas totales del 18% por el tratamiento con aluminio y del 24% para la hepatectomía. Esta disminución se debería a la menor concentración de la albúmina que baja significativamente un 22% para el grupo **HP** y un 10% para el grupo tratado con **AI**.

La combinación de ambos tratamientos disminuye la albúmina en un 28%. Observamos además que la relación albúmina/globulinas aumenta, a expensas de una disminución de las globulinas plasmáticas en todos los grupos tratados con aluminio, mientras que en el grupo **HP** la relación desciende a expensas de un aumento de las globulinas que podría influir también en el aumento de la viscosidad plasmática.

## CAPÍTULO 5

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los datos mostrados en el presente estudio describen el efecto de la acumulación de aluminio y/o la hepatectomía parcial sobre el metabolismo del hierro en ratas Wistar machos adultas.

Algunos autores han propuesto (Van Rensburg y col., 2000; Mahieu y col., 2000) un mecanismo de competición entre el aluminio y el hierro en su unión a la transferrina, pudiendo esta proteína transportar ambos cationes ya que normalmente sólo el 30% de sus sitios de unión están ocupados por el hierro (Moshtaghi y col., 1992; Hudson y col., 2002).

En este sentido, nuestros resultados indican que el tratamiento con aluminio induce una disminución de la concentración del hierro plasmático y del porcentaje de saturación de transferrina, probablemente por un mecanismo de competición entre ambos cationes.

Por otro lado, el análisis de la concentración plasmática de hierro en pacientes sometidos a hepatectomía parcial ha mostrado una disminución significativa (Hirota y col., 1987). Asimismo, Fouad y col (1992) y Mohammed y col. (1983) han observado una disminución de la concentración plasmática de hierro en ratas sometidas a hepatectomía parcial. En coincidencia con estos autores, observamos que el grupo experimental de ratas sometidas a hepatectomía parcial muestra una disminución significativa de la concentración plasmática de hierro, existiendo también una disminución en el porcentaje de saturación de transferrina que podría estar relacionada con la disminución de las concentraciones séricas de hierro observada en este grupo experimental. Cuando la hepatectomía parcial fue practicada en animales tratados previamente con aluminio, encontramos una disminución mucho mayor tanto en las concentraciones de hierro sérico como en el porcentaje de saturación de transferrina. Estos resultados podrían sugerir que el efecto del aluminio

y la hepatectomía implican mecanismos de acción diferentes sobre la concentración de hierro plasmática y el porcentaje de saturación de transferrina.

Estudios realizados sobre el metabolismo del hierro en ratas con altos niveles de aluminio demostraron que el incremento de los niveles tisulares de aluminio no modifica las concentraciones de hierro en los tejidos hepático e intestinal (Morgan y Redgrave, 1998). En coincidencia con estos estudios, nuestros resultados muestran claramente que las concentraciones de aluminio en tejido hepático e intestinal se incrementaron en animales tratados con el metal por un período de tres meses no existiendo modificaciones en el contenido tisular de hierro.

Dado que el hierro es estrictamente conservado por el organismo (Finch y col., 1998), la absorción intestinal es el punto de regulación de la homeostasis corporal del hierro. En este sentido se ha demostrado que los cuadros de anemia con deficiencia de hierro y disminución del porcentaje de saturación de transferrina están asociados a un aumento en la absorción intestinal del hierro, planteándose como posible mecanismo de regulación al péptido hepático hepcidina cuya expresión está disminuida en esta patología (Nicolas y col., 2002). En cuadros donde existe inflamación aguda la expresión de hepcidina aumenta dramáticamente dando una explicación a la absorción intestinal de hierro disminuida (Brugnara y col., 2003; Ravia y col., 2005).

De hecho, las células de la mucosa de ratas deficientes en hierro casi no producen ferritina y la mayor parte del hierro que incorpora la célula está disponible para el transporte a través de la membrana basolateral, que es facilitada por la proteína de transmembrana transportadora de hierro IREG1 (Ward y col., 2002).

Además, el receptor de transferrina en la membrana basolateral del enterocito puede actuar uniéndose a las proteínas citosólicas reguladoras del hierro (IRPs), regulando, de esta manera, la cantidad de hierro absorbida por el enterocito (Crichton, 2001). Esto implica que la captación de hierro en duodeno de ratas deficientes en hierro es mediada por un número mayor de los mismos transportadores que están presentes en el estado normal (Goddard y col., 1997).

Otros autores (Schümann y col., 1999) han demostrado que la regulación del paso de captación mucosal de hierro parece determinar la fracción movilizable  $^{59}\text{Fe}$

y, de esta manera, el proceso total de la absorción del hierro se adapta a la demanda del organismo. Por otra parte, estudios realizados en ratones con hipotransferrinemia (un defecto genético) exhibieron una absorción de hierro aumentada aun cuando el contenido de ferritina y la concentración de hierro del enterocito no presentaran modificaciones, sugiriendo que la absorción del hierro es regulada por la expresión programada de los transportadores del hierro por los enterocitos (Pountney y col., 1999).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos realizados en asa intestinal *in situ*, donde evaluamos la absorción de hierro utilizando  $^{59}\text{Fe}$ , muestran que no existe diferencia en ninguno de los grupos experimentales estudiados, a pesar de que en todos ellos hay una disminución significativa de la concentración de hierro sérico.

En base a todos los estudios realizados, nuestros resultados ponen de manifiesto una inhabilidad del intestino de las ratas tratadas con aluminio y/o sometidas a hepatectomía parcial para incrementar la absorción intestinal del hierro como respuesta a la disminución de la concentración de hierro en sangre observada en estos grupos experimentales (Figura 4.2).

El aluminio es indiscutiblemente, un agente pro-oxidante *in vivo* (Exley, 2004). En este sentido, estudios realizados con animales de experimentación tratados con aluminio muestran elevados índices de estrés oxidativo en varios órganos; observándose cambios en los niveles de las enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, así como aumento en los niveles de biomarcadores de peroxidación, tales como ácido malondialdehído (MDA) e hidroperóxidos de lípidos (Swain y Chainy, 1998; Abubakar y col., 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que la actividad pro-oxidante del aluminio implica la interacción del metal con las membranas celulares, que induce cambios en los fosfolípidos y un índice más alto de propagación de la lipoperoxidación (Verstraeten y col., 1997; Verstraeten y Oteiza, 2000). Esta interacción entre el aluminio y los fosfolípidos de la membrana puede alterar varios procesos dependientes del fosfatidil-inositol-bifosfato (Sciorra y col., 1999).

En coincidencia con lo descrito en estos trabajos, el análisis de nuestros resultados del nivel de lipoperoxidación en homogenado total y en fracción

enriquecida en membranas plasmáticas de mucosa intestinal de ratas tratadas con aluminio mostró un aumento significativo, que fue acompañado por una disminución de la actividad enzimática antioxidante de catalasa y glutatión peroxidasa.

El procedimiento quirúrgico de la hepatectomía parcial, también actúa produciendo un aumento del nivel de lipoperoxidación en diferentes órganos como intestino e hígado (Alexandris y col., 2004; Carnovale y col., 2000). En coincidencia con lo descrito en estos trabajos, nuestros resultados muestran en las ratas sometidas a hepatectomía parcial un aumento del nivel de lipoperoxidación en homogenados totales de mucosa intestinal y una disminución de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa y catalasa.

En el grupo experimental constituido por ratas con tratamiento crónico con aluminio y luego sometidas a hepatectomía parcial se observó un incremento de lipoperoxidación en homogenado total y en fracción enriquecida en membrana plasmática, así como una disminución de las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa.

El aumento significativo del nivel de lipoperoxidación en intestino de ratas tratadas con aluminio y/o sometidas a hepatectomía parcial, podría ser una de las causas de la inhabilidad del intestino para aumentar la absorción intestinal del hierro frente a la disminución observada en las concentraciones séricas del mismo, probablemente por producir una alteración de los receptores de transferrina y/o su interacción con las proteínas citosólicas reguladoras del hierro. Por otro lado, podríamos postular que modificaciones en los niveles de hepcidina también estarían jugando un papel importante en la inhabilidad del intestino para aumentar la absorción intestinal del hierro, en ambos tratamientos.

En el estudio del metabolismo del hierro ocupa un lugar fundamental su rol en sangre. En ella, no sólo es transportado unido a transferrina sino que también se lo encuentra dentro de los glóbulos rojos formando parte de la hemoglobina, participando tanto en el mantenimiento de la viscosidad interna de dicha célula, como en el desarrollo de las funciones de transporte de oxígeno a los tejidos.

Los eritrocitos son extremadamente deformables y esta deformación es muy importante en la microcirculación porque los eritrocitos deben atravesar los capilares

que tienen un diámetro inferior al diámetro de las células. La rigidez de los eritrocitos está regulada por diversos factores: su geometría (relación superficie/volumen); su viscosidad interna (función de la hemoglobina) y las propiedades elásticas de la membrana celular (ATP, calcio, composición lipídica y proteica).

Dentro de los factores que tienen influencia en las variaciones de la deformabilidad eritrocitaria se encuentran las concentraciones de los lípidos de membrana del eritrocito, entre los cuales el colesterol es uno de los más abundantes.

Estudios experimentales sobre agregados de lípidos en bicapas de eritrocitos han mostrado las propiedades fluidificantes y el aumento de flexibilidad por la presencia de colesterol (Toledano Gasca y Díaz López, 1984)

El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar lípidos *de novo*; por lo tanto, una disminución en los lípidos de membrana debe ser compensada por intercambio con el colesterol del plasma. La disminución de colesterol es acompañada por una disminución en el área superficial y un cambio esferoidal en la forma de los glóbulos rojos (Telen, 1995; Telen y col., 2005).

Estudios realizados en seres humanos y en ratas han puesto en evidencia una correlación negativa entre los niveles de colesterol plasmático y la rigidez del eritrocito (Fawcett y Menkes, 1994; Mengarelli y col., 2001).

Jefferey Field y col. (1985) han demostrado que después de una hepatectomía parcial existe, en ratas, una disminución de los niveles de colesterol plasmático.

Nuestros resultados evidenciaron una disminución del colesterol de membrana de los eritrocitos tanto en el tratamiento con aluminio como en la hepatectomía parcial, incrementándose el porcentaje de disminución cuando los tratamientos se realizaron en forma conjunta. Además, observamos que tanto el tratamiento con aluminio como la hepatectomía parcial y la asociación de ambos producen una disminución del nivel de colesterol en plasma y un aumento del IR, existiendo una asociación negativa entre ellos ( $r_s = -0,62$ ,  $p=0,02$ ).

Además los valores obtenidos de HDL-colesterol en plasma, en todos los grupos tratados con aluminio y/o hepatectomía parcial, muestran una disminución significativa con respecto al grupo control, de donde podemos inferir que la

disminución del colesterol plasmático total es a expensas del HDL-colesterol mostrando una correlación cuyo coeficiente es  $r_s=0,726$  ( $p=0,003$ ).

Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que la disminución del colesterol plasmático se asocia a un aumento en la proporción de eritrocitos no discocíticos, particularmente los estomatocitos, que se caracterizan por ser menos deformables, contribuyendo así a un aumento en el IR (Sheetz y Singer, 1974).

La existencia de un mayor número de eritrocitos no discocíticos se pone de manifiesto por un cambio en el IM calculado según la clasificación de Bessis (Bessis, 1973).

En los grupos tratados con aluminio se observaron las variaciones más importantes tanto en el IR como en el IM al compararlos con los demás grupos experimentales. Estos resultados sugieren que el aluminio puede ser responsable de las características alteradas de la membrana del eritrocito por un efecto indirecto causado por la disminución del contenido del colesterol del plasma y por una interacción directa con los fosfatos presentes en las cabezas de los fosfolípidos de la mitad externa de la bicapa de la membrana eritrocítica, conduciendo a una disminución del área superficial externa de la membrana. Otros autores han demostrado que el aluminio podría causar una redistribución de los lípidos de la bicapa, afectando así la forma bicóncava de los eritrocitos (Suwalsky y col., 2004; Vittori y col., 2002; Vittori y col., 1999; Chien y col., 1996).

En este sentido, nuestros resultados muestran que ambos tratamientos, aluminio y hepatectomía parcial, conducen a una disminución del IM a consecuencia de un aumento de formas no discocíticas, los estomatocitos. En lo que respecta al grupo de ratas sometidas a hepatectomía parcial el aumento de formas estomatocíticas podría ser debido, por lo menos en parte, a la disminución de los niveles de colesterol plasmático observados.

La mayor disminución del IM en el grupo de ratas tratadas con aluminio y sometidas a hepatectomía parcial sugiere un efecto sumativo del descenso del colesterol plasmático producido por el aluminio y la hepatectomía parcial y el efecto directo del aluminio sobre la membrana del eritrocito que conduce al aumento de la

proporción de estomatocitos que podrían contribuir al mayor aumento de IR observado.

Por otro lado, las variaciones del colesterol de membrana de los eritrocitos producen cambios regulares del grado de ordenamiento de las cadenas acílicas en las regiones más profundas de la bicapa (Ge y col., 1999; Mitra y col., 2004), y nuestros resultados mostraron una disminución en la concentración de colesterol de la membrana de los eritrocitos frente a todos los tratamientos. Por esta razón realizamos el análisis por EPR de las membranas de los eritrocitos. El parámetro S determinado por EPR permite estimar el orden de las cadenas acílicas. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con aluminio produce un aumento de un parámetro S12d, es decir una disminución de la fluidez de la bicapa lipídica. En el grupo **HP** se observó una disminución de S12d, es decir un aumento de la fluidez, que indicaría que la hepatectomía tiende a fluidificar la bicapa lipídica. Esta disminución de S12d se observó también en **Al+HP** indicando que la hepatectomía tiende a revertir la rigidización causada por el tratamiento con aluminio, disminuyendo el ordenamiento de las cadenas acílicas. Estos resultados sugieren que la rigidización eritrocitaria puesta de manifiesto por el IR aumentado observada en la hepatectomía parcial no estaría vinculada al comportamiento de la bicapa lipídica. Podríamos postular que la rigidez observada en la hepatectomía parcial podría deberse a cambios conformacionales del citoesqueleto por modificación de las proteínas constitutivas.

La viscosidad sanguínea es determinada por la viscosidad plasmática, el hematocrito y la deformabilidad del eritrocito. La viscosidad relativa corregida a Hto 40 pone en evidencia la fluidez de la sangre sin influencia del Hto y de la viscosidad plasmática. La viscosidad relativa corregida a Hto 40 puede considerarse como una medida indirecta de la deformabilidad eritrocitaria. Nuestros resultados evidencian que los grupos experimentales tratados con aluminio y/o sometidos a **HP** presentan un aumento de la  $\eta_{r40}$  que coincide con el aumento de rigidez de los eritrocitos (pérdida de flexibilidad de la membrana eritrocitaria). Por lo tanto, el aumento significativo del IR determinado por el método de la filtrabilidad y estimado por  $\eta_{r40}$ , se debe al aumento de formas estomatocíticas evidenciado por la disminución del IM en el tratamiento con aluminio y/o en los animales sometidos a **HP**.

La existencia de eritrocitos no discocíticos, menos deformables conduce a una disminución de la resistencia osmótica y al aumento de la heterogeneidad de la población de células en respuesta a cambios osmóticos (Udden, 2002).

Nuestros resultados muestran que ambos tratamientos producen una disminución de la resistencia osmótica y un aumento de la heterogeneidad de la población de las células en respuesta a cambios osmóticos, a consecuencia de las alteraciones del IM observado.

Garbossa y col. (1998) han demostrado que ratas tratadas con aluminio presentan una anemia microcítica e hipocrómica. Por otro lado, se ha descrito en algunas patologías como la falla renal crónica, y en varias enfermedades hematológicas que la disminución del Hto puede deberse a una vida media disminuida del eritrocito. Este hecho podría ser causado por el aumento en la captación por el bazo, los pulmones, los huesos y el hígado debido a la reducción de la deformabilidad de los eritrocitos (Luquita y col., 1994; Wen y col., 1998; Sutura y Krogstad, 1991; Stuart y Nash, 1990).

Nuestros resultados indican que tanto el tratamiento con aluminio como la **HP** conducen a una disminución significativa del Hto, el VCM y la HCM. La combinación de ambos tratamientos (**Al+HP**) profundiza la disminución observada en el Hto, el VCM y la HCM, indicando así una acción más pronunciada de los efectos individuales de ambos tratamientos. Probablemente en nuestro caso, la disminución del IM provocaría un aumento en la captación periférica de los eritrocitos, disminuyendo su vida media.

En cuanto a la viscosidad plasmática, se ha observado que presenta una relación inversa con el colesterol plasmático (Jung y col. (1992), nuestros resultados indican que tanto el tratamiento con aluminio como la hepatectomía parcial, así como la combinación de ambos conducen a una disminución significativa del colesterol plasmático y a un aumento significativo de la viscosidad plasmática.

Algunos autores han demostrado que la molécula de fibrinógeno influye sobre la viscosidad del plasma, debido al hecho de que esta molécula tiene una forma y un tamaño adecuados para facilitar la formación de un puente entre los eritrocitos y de



esta manera aumenta la viscosidad del plasma (Gudmundsson y Bjelle, 1993; Jung y col., 1992).

Nuestros resultados muestran un aumento significativo del fibrinógeno plasmático en los animales tratados con aluminio y sometidos a **HP** y en la combinación de ambos tratamientos, encontrándose una asociación directa con el aumento de la viscosidad del plasma ( $r_s=0,689$ ,  $p=0,004$ ).

Por otro lado, el hecho de que el fibrinógeno facilite la formación de puentes entre los eritrocitos, da lugar a la agregación eritrocitaria que representa la asociación reversible de los glóbulos rojos para formar los *rouleaux* (Razavian y col. 1992; Razavian y col. 1994). En este sentido, algunos autores describieron que existe un aumento de la agregación eritrocitaria frente a un aumento del fibrinógeno (Levin y col., 2004; Reinhart, 2003)

Este fenómeno de agregabilidad eritrocitaria puede tener efectos deletéreos en el flujo microcirculatorio (Weng y col., 1998). De hecho, la agregación patológica de los glóbulos rojos caracterizada por los agregados grandes con acoplamientos intercelulares fuertes está implicada en el tránsito y el estancamiento microcirculatorio, que alteran la resistencia vascular periférica, reduce la transferencia capilar de la perfusión y del oxígeno a los tejidos y causa isquemia, acidosis metabólica local así como la degeneración de la pared y lesiones capilares (Rainer y col., 1987; Soutani y col., 1995; Cabel y col., 1997; Pfafferott y col., 1999; Suckfull y col., 2002).

Contrariamente a lo descripto, en nuestros resultados observamos un aumento de fibrinógeno y una disminución de la velocidad de agregación, debido a que el gran aumento del IR en los grupos tratados se contrapone al efecto de la proteína en los grupos tratados con aluminio y/o sometidos a **HP**.

Scornik y Botbol han demostrado que la variación en la velocidad de degradación del fibrinógeno es el factor más importante que determina el aumento de los niveles de la proteína circulante (Scornik y Botbol, 1976). Por el contrario, en lesiones severas, tal como la hepatectomía parcial, algunos investigadores explican el aumento del fibrinógeno observado, al aumento general de proteínas de fase aguda, entre las cuales se lo incluye al fibrinógeno (Reinhart, 2003; Antovic y col., 1993).

En coincidencia con estos últimos autores, en el grupo experimental **HP** se observó un aumento significativo de la concentración de fibrinógeno plasmático. En lo que concierne al aluminio no hay estudios sobre sus efectos en los niveles de fibrinógeno del plasma. Sin embargo, se ha descrito que la intoxicación con aluminio produce patologías severas en animales de experimentación y en los seres humanos, en quienes una respuesta inflamatoria específica indica la inducción de los genes que pertenecen a las rutas pro-inflamatorias (Bugiani y Ghetti, 1990; Lukiw y Bazan, 2000).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con **Al** produce un aumento significativo del fibrinógeno plasmático; basándonos en lo descrito en el párrafo anterior, planteamos que el aluminio podría inducir el aumento de las proteínas de fase aguda, entre las cuales se encuentra el fibrinógeno, de una manera similar a lo descrito para la hepatectomía parcial.

En conclusión, las alteraciones de los parámetros reológicos evaluados podrían ser factores coadyuvantes de la anemia observada en los animales expuestos crónicamente al aluminio y sometidos a hepatectomía parcial.

Finalmente, el hierro es un metal esencial para la vida de los organismos y está involucrado con un gran número de enzimas y proteínas. No es por lo tanto ninguna sorpresa que la homeostasis del hierro sea una preocupación importante para la salud y el bienestar humano (Crichton y col., 2002).

Este trabajo de tesis demuestra que hay alteraciones en el metabolismo del hierro y como consecuencia también existen alteraciones en el comportamiento reológico de la sangre en los animales expuestos crónicamente al aluminio y sometidos a hepatectomía parcial.

Aunque debemos tomar en consideración la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos en animales de laboratorio al ser humano, las alteraciones del metabolismo del hierro y en el comportamiento reológico de la sangre, podrían ser factores importantes en retardar la recuperación de los pacientes que, estando expuestos al aluminio, deben experimentar una resección hepática parcial ya sea como donantes voluntarios de una parte de su hígado o como única terapia que prolongará substancialmente su supervivencia.

## CAPÍTULO 6

### RESUMEN-SUMMARY

## 6. RESUMEN

El aluminio no constituye un metal esencial para la vida humana, pero durante el último tiempo ha despertado gran interés porque el aumento de su disponibilidad en el ambiente y la exposición crónica durante la vida lo convierte en un elemento potencialmente tóxico o nocivo para el ser humano. Los productos farmacéuticos, los cosméticos y los tratamientos médicos constituyen una importante fuente de incorporación de aluminio. Los efectos tóxicos del aluminio en el ser humano incluyen entre otros, encefalopatías, enfermedades óseas y anemia. Por lo tanto, debido a su ubicuidad, aun las personas sanas no están exentas de la potencial acción deletérea del aluminio, ya que -en mayor o menor medida- todos estamos expuestos a él durante el transcurso de nuestras vidas.

Las resecciones de segmentos o de lóbulos hepáticos son el tratamiento de elección para los tumores primarios o metastáticos hepáticos y también se someten a hepatectomía parcial los donantes vivos, cuyo hígado debe proliferar con posterioridad a la cirugía. A su vez, es conocido que, para la recuperación de la masa y las funciones del hígado después de una hepatectomía parcial, es fundamental un adecuado estado nutricional, siendo el hierro uno de los nutrientes más importantes.

El hierro es un nutriente esencial para la vida, está involucrado en el crecimiento y metabolismo celular y, por lo tanto, existen complejos mecanismos homeostáticos que regulan su adecuada disponibilidad para asegurar el funcionamiento normal del organismo. El balance del hierro es mantenido por medio de una precisa regulación intestinal de transportadores y su concentración en sangre se encuentra íntimamente relacionada con las funciones de los eritrocitos circulantes.

Como ha sido expuesto, el aluminio, debido a su ubicuidad, puede estar presente en el organismo de la mayoría de las personas. Además, la cantidad de

personas que podrían ser sometidas a resección hepática por diferentes patologías o como donantes vivos ha ido incrementándose en las últimas décadas. Por ello, no es sorprendente que un paciente que deba ser sometido a hepatectomía parcial contenga aluminio en su organismo.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia del aluminio y de la hepatectomía parcial sobre parámetros relacionados con el metabolismo global del hierro. Para ello se evaluó la absorción intestinal del hierro, determinándose el nivel de lipoperoxidación y la capacidad antioxidante en mucosa intestinal, y se analizaron parámetros hematológicos, séricos y hemorreológicos relacionados con su metabolismo.

Los tratamientos realizados en este trabajo de tesis fueron: exposición crónica al aluminio administrado por vía intraperitoneal en una dosis de 27 mg de Al elemental/ kg de peso corporal, 3 veces/ semana durante 3 meses (AI), hepatectomía parcial del 65 %, sacrificados a las 48 horas de la cirugía (HP) y asociación de ambos procedimientos (AI+HP).

Las concentraciones séricas de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina disminuyeron significativamente en los grupos tratados con aluminio, hepatectomía parcial y en la asociación de ambos. Estas disminuciones no estuvieron asociadas a un aumento en la absorción de hierro en intestino, como era de esperar por lo descrito por otros autores, no observándose diferencias significativas en los estudios de absorción intestinal *in situ* realizados. En intestino de ratas tratadas con aluminio y/o sometidas a hepatectomía parcial encontramos un aumento de lipoperoxidación y una disminución de enzimas antioxidantes, que podrían ser una de las causas de la desregulación de la absorción intestinal del hierro, debido a que la peroxidación lipídica podría producir alteraciones de los receptores de transferrina y/o de su interacción con las proteínas citosólicas reguladoras del hierro, que son los mecanismos normalmente involucrados en el control de la absorción de hierro.

Los estudios hematológicos, séricos y hemorreológicos evidenciaron modificaciones. En el colesterol de la membrana de los eritrocitos se observó una disminución tanto en el tratamiento con aluminio como en la hepatectomía parcial,

incrementándose el porcentaje de disminución cuando los tratamientos se realizaron en forma conjunta. Además, el tratamiento con aluminio, la hepatectomía parcial y la combinación de ambos, produjeron una disminución del nivel de colesterol en plasma y un aumento del IR, existiendo una asociación negativa entre ellos ( $r_s = -0,62$ ,  $p < 0,02$ ). La disminución del colesterol plasmático total podría ser a expensas del HDL-colesterol, ya que en todos los grupos tratados con aluminio y/o hepatectomía parcial, los valores obtenidos de HDL-colesterol en plasma, mostraron una disminución significativa con respecto al grupo control. Una mayor disminución del IM fue observada en el grupo de ratas tratadas con aluminio y sometidas a hepatectomía parcial sugiriendo un efecto sumativo del descenso del colesterol plasmático producido por el aluminio y la hepatectomía parcial en forma independiente, y el efecto directo del aluminio sobre la membrana del eritrocito que conduce al aumento de la proporción de estomatocitos que podrían contribuir al aumento de IR observado, el cual fue determinado por el método de la filtrabilidad y estimado por  $\eta r_{40}$ . El análisis por EPR de las membranas de los eritrocitos mostró que el tratamiento con aluminio produce una disminución de la fluidez de la bicapa lipídica, mientras que hepatectomía tendería a fluidificar la bicapa lipídica.

Nuestros resultados indican que tanto el tratamiento con aluminio como la hepatectomía parcial conducen a una disminución significativa del Hto, el VCM y la HCM. La combinación de ambos tratamientos (**Al+PH**) profundiza la disminución observada en el Hto, el VCM y la HCM, indicando así una acción más pronunciada de los efectos individuales de ambos tratamientos. Probablemente en nuestro caso, la disminución del IM provocaría un aumento en la captación periférica de los eritrocitos, disminuyendo su vida media.

En cuanto a la viscosidad plasmática, nuestros resultados indican que tanto el tratamiento con aluminio como la hepatectomía parcial, así como la combinación de ambos conducen a una disminución significativa del colesterol en plasma y a un aumento significativo de la viscosidad plasmática. Asimismo, se observó un aumento significativo del fibrinógeno plasmático en los animales tratados con aluminio y sometidos a hepatectomía parcial y en la combinación de ambos tratamientos,

encontrándose una asociación directa con el aumento de la viscosidad del plasma ( $r_s=0,689$ ,  $p=0,004$ ).

Nuestros resultados muestran que el aumento de fibrinógeno se produjo con una disminución de la velocidad de agregación sin modificar el tamaño de los *rouleaux* en los grupos tratados con aluminio y/o sometidos a hepatectomía parcial.

Por lo tanto, las alteraciones de los parámetros reológicos evaluados podrían ser factores coadyuvantes de la anemia observada en los animales expuestos crónicamente al aluminio y sometidos a hepatectomía parcial.

Aunque debemos tomar en consideración la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos en animales de laboratorio al ser humano, las alteraciones del metabolismo del hierro y en el comportamiento reológico de la sangre, podrían ser factores importantes en retardar la recuperación de los pacientes que, estando expuestos al aluminio, deben experimentar una resección hepática parcial, ya sea como donantes voluntarios de una parte de su hígado o como única terapia que prolongará substancialmente su supervivencia.

## SUMMARY

The aluminum does not constitute an essential metal for the human life, but during the last time great interest has waked up because the increase of its availability in the atmosphere and the chronic exhibition during the life turns a potentially toxic or injurious element for the human .The pharmaceutical and cosmetic products, and also the medical treatments constitute an important source of aluminum incorporation. The toxic effects of aluminum in the human are: encephalopathy, bone disease and anemia. Therefore, due to their universal presence, the healthy people are not even free of the potential deleterious action of aluminum, since - in greater or smaller measurement all we are exposed to him during the course of our lives. The resection of segments or hepatic lobes are the treatment of election for the primary or metastatic hepatic tumors, and also are put under partial hepatectomy the alive donors, whose liver must proliferate after the surgery. As well, it is known that, for the recovery of the mass and the functions from the liver after a partial hepatectomy is fundamental an adapted nutritional state, being iron one of the most important nutrients. The iron is an essential nutrient for the life, is involved in the growth and cellular metabolism and therefore, a complex homeostatic mechanisms that regulate their suitable availability for to assure the on-speed operation the organism. The balance of the iron is maintained by means of one precise intestinal regulation of transporters and its concentration in blood is related to the functions of the circulating erythrocytes. Since it has been exposed, the aluminum, due to its universal presence, can be present in the organism of most of the people. Also, in the last decades, the amount of people that could be submitted to hepatic resection by different pathologies or as alive donors have been increased. Therefore, it is not surprising that a patient who must be submitted to a partial hepatectomy contains in his organism aluminum. The objective of the present work was to analyze the influence of aluminum and the partial hepatectomy on the parameters related to the global metabolism of the iron.



For it the intestinal absorption of the iron was evaluated, determining itself the level of lipoperoxidation and the antioxidant capacity in intestinal mucosa, and hematologic, serum and hemorheological parameters were analyzed related to their metabolism. The treatments made in this thesis work were: chronic exhibition to aluminum administered intraperitoneally in a dose of 27 mg of Al/kg of body weight, 3 times a week for 3 months (**AI**), partial hepatectomy of 65 %, killed 48 hours of the surgery (**PH**) and association of both procedures (**AI+PH**). The serum iron concentrations and the percentage of transferrin saturation diminished in the groups with aluminum, partial hepatectomy and in the association of both treatments. These diminutions were not associated to an increase in the iron absorption in intestine, like was to hope by the described by the other authors, not being observed significant differences in the studies of intestinal absorption in situ made. In intestine of rats with aluminum and/or submitted to partial hepatectomy we found an increase of lipoperoxidation and an antioxidant enzyme diminution, that could be one of the causes of the bad regulation of the intestinal absorption of the iron; because the lipid peroxidation could produce alterations of the receptors of transferrin and/or its interaction with the iron regulating cytosolic proteins, which are the normal mechanisms involved in the control of the iron absorption. The hematologic, serum and hemorheological studies demonstrated modifications. In the cholesterol of the erythrocytes membrane a diminution was observed in aluminum and partial hepatectomy, being increased the percentage of diminution when the both treatments were made. In addition, the treatment with aluminum, the partial hepatectomy and the combination of both, produced a diminution of the plasma cholesterol level and an increase of rigidity index (RI), existing a negative association between them ( $r_s = -0.62$ ,  $p < 0.02$ ). The diminution of total the plasma cholesterol could be to expenses of the HDL-cholesterol, since in all the groups aluminum and/or partial hepatectomy (**PH**), the obtained values of plasma HDL-cholesterol, showed to a diminution with respect to the control group. A greater diminution of the Morphological Index (MI) was observed in the group of rats with aluminum and partial hepatectomy suggesting a summative effect of the reduction of the plasma cholesterol produced by aluminum and the partial hepatectomy and the direct influence of aluminum on the membrane of

the erythrocyte that leads to the increase of the proportion of estomatocytes that could contribute to the increase RI observed, which was determined by the method of the filtrability and estimated by  $\eta r_{40}$ . The analysis by EPR of erythrocyte membranes showed that the treatment with aluminum produces a diminution of the fluidity of the lipidic bilayer, whereas hepatectomy produces an increase of the fluidity from lipidic bilayer. Our results as much indicate that the treatment with aluminum as the partial hepatectomy leads to a significant diminution of the Hto, the VCM and the HCM. The combination of both treatments (**Al+PH**) increase the diminution observed in the Hto, the VCM and the HCM, indicating therefore one more an action pronouncing of the individual effects of both treatments. Probably in our case, the diminution of the MI would cause an increase in the peripheral take up of the erythrocytes, having diminished its span life. As far as plasmatic viscosity, our results as much indicate that the treatment with aluminum as the partial hepatectomy, as well as the combination of both leads to a significant diminution of the plasma cholesterol and to a significant increase of plasmatic viscosity. Also, a significant increase of the plasmatic fibrinogen in animals dealt with aluminum, in those submissive to partial hepatectomy, and in the combination of both treatments was observed, being a direct association with the increase of the viscosity of plasma ( $r_s=0.689$ ,  $p=0.004$ ). Our results show that the increase of fibrinogen lead to a decrease of the speed of aggregation without modifying the size of rouleaux in the groups dealt with aluminum and/or submissive partial hepatectomy. Therefore, the alterations in the evaluated rheologics parameters could be helping factors of the anemia observed in animals exposed chronically to aluminum and submissive partial hepatectomy. Although we must take in consideration the difficulty in extrapolating the results obtained in laboratory animals to human beings, the alterations of the metabolism of iron and in the rheologic behavior of the blood, could be important factors in slowing down the recovery of the patients who, being exposed to aluminum, must experience partial a hepatic resection like voluntary donors of part of their liver or like only therapy who will prolong their survival substantially.

## **CAPÍTULO 7**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, K.; Glass, J.; Jain, S. y Sella, M. (1994). Aluminum alters the compartmentalization of iron in Friend erythroleukemia cells. *Kidney Int.* 45:636-664.
- Abubakar, M.G.; Taylor, A. y Ferns, G.A. (2003). Aluminum administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. *Int. J. Exp. Pathol.* 84: 49-54.
- Acworth, I.N. y Bailey, B. (1995). *The handbook of oxidative metabolism.* Protection against Oxidants. (Floyd, R. and Flint Beal, M. Ed.) ESA, Inc. USA. pp.1-13.
- Aguilar-Delfin J.; López Barrera, F. y Hernández-Muñoz, R. (1996). Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrana in two models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CCl4 administration. *Hepatology.* 26: 657-662.
- Ahmed, H.A. (1993). Measurement of cholesterol in membranes. *Methods Mol Biol.* 19: 179-82.
- Aisen P; Litowsky I. (1980). Iron and storage proteins. *Annu Rev Biochem.* 49:357-393.
- Aisen, P.; Wessling-Resnick, M. y Leibold, E. A. (1999). Iron metabolism. *Bio-inorganic chemistry,* 3: 200-208.
- Alexandris, I.H.; Assimakopoulos, S.F.; Vagianos, C.E.; Patsoukis, N.; Georgiou, C.; Nikolopoulou, V. y Scopa, C.D. (2004). Oxidative state in intestine and liver after partial hepatectomy in rats. Effect of bombesin and neurotensin, *Clin Biochem.* 37: 350-356.

- Alfrey, A.C.; Le Gendre, G.R. y Kaehny, W.D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication, N. Engl. J. Med. 294: 184-188.
- Antovic, J.; Djordjevic, V.; Kocic, G. ; Koracevic, D.; Bjelakovic, G. y Bakic, M. (1993). Blood coagulation factors changes during liver regeneration in rats. Arch. Int. de Physiologie, de Biochimie et Biophysique. 101: 357-359.
- Beale, S.I. y Yeh, J.I. (1999). Deconstructing heme. Nat. Struct. Biol. 6:903-905.
- Bessis, M. (1973). *Red Cell Shape*. Physiology, Pathology, Ultra structure. (Bessis, M; Weed, R.I; Leblond, P.F., Ed.) Springer-Verlag. Heidelberg. pp. 1-23.
- Bessis, M.; Mohandas, N. y Feo, C. (1980). Automated ektacytometry and red cell indices. Bloos Cells. 6:315-327.
- Bessis. M. y Mohandas, N. (1975). Deformability of normal, shape altered and pathological red cells. Blood Cells. 1:315-321.
- Brittenham, G.M; Weiss, G.; Brissot, P.; Lainé, A.; Guillygomarc'h, F.; Guyader, D.; Moirand, R. y Deugnier, Y. (2000). Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. Hematology. 39-50.
- Brugnara, C. (2003). Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. Clinical chemistry. 49(10): 1573-1578.
- Bugiani, O. y Ghetti, B. (1990). *Aluminum and Renal Failure*. Developments in Nephrology. Aluminum encephalopathy: Experimental vs. human. (Debroe, M; Coburn, J.W.; Kluwer, J. Ed.). Academia Publishers. Chapter: 26. pp. 109-126.
- Cabel, M.; Meiselman, H.J.; Popel, A.S. y Jonson, P.S. (1997). Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 272: 1020-1032.

- Campbell, I.D. y Dwek, R.A. (1984). *Biological Spectroscopy*. (Benjamin/Cummings, Ed.). Menlo Park. California.
- Carnovale, C.E.; Scapini, C.; Álvarez, M.L.; Favre, C.; Monti, J. y Carrillo, M.C. (2000). Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *J Hepatol*. 32(5): 798-804.
- Carrillo, M.C.; Kitani, K.; Kanai, S.; Sato, Y.; Nokubo, M.; Ohta, M.; Otsubo, K. (1989). Differences in the influence of diet on hepatic glutathione S-transferase activity and glutathione content between young and old C57 black female mice. *Mech Ageing Dev*. 47 (1): 1-15.
- Chanda, S. y Mehendale, H.M. (1996). Role of nutrition in the survival after hepatotoxic injury. *Toxicology*. 111: 163-178.
- Chari, R. y Beauchamp, D. (1995). Surgical treatment of hepatic tumors and its molecular basis. *Liver regeneration and carcinogenesis*. 323-349.
- Chari, R.S. y Meyers, W.C. (1993). *Current Practice of Surgery*. Liver surgery. (Levine, B.A; Copeland, E.M.; Howard, R.J; Surgerman, H.J y Warshaw, A.L. Eds.). Churchill Livingstone. New York. pp. 1-52.
- Chien, H.C.; Huang, C.C.; Huang, J.Y.; Chu, S.H. y Lai, M.K. (1996). Post-renal transplant erythrocytosis. *Changeng Yi Xue Za Zhi*. 19(3): 235-40.
- Chien, S. (1987). *Clinical Hemorheology*. Physiological and pathophysiological significance of hemorheology. (Chien, S; Dormandy, S; Ernst, E; Matai, A. Eds.). Dordrecht, Martinus Nijhoff. pp.125-164.
- Clark, M.R. (1988). Senescence of red blood cells: progress and problems. *Physiol Rev*. 68: 503.
- Conrad, M.E. y Umbreit, J.N. (2000). Iron absorption and transport an update. *Am J Hematol*. 64:287-298.
- Copley JB and Smith BJ. (1985). Continuous ambulatory peritoneal dialysis and scleroderma. *Nephron*. 40(3): 353-6.
- Copley, A. (1952). The rheology of blood. A survey. *J. Colloid Sc*. 7: 323-333.

- Cox, P.A. (1995). *Inorganic Chemistry in the Environment. The elements of earth.* (Oxford University Press). Oxford.
- Crichton, R.R. (2001). *Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanism to clinical consequences.* (Wiley & Sons. Eds.). Chichester, New York. 2da edition. pp.326.
- Crichton, R.R.; Wilmet, S.; Legssyer, R. y Ward, R.J. (2002). Molecular and cellular mechanism of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 91:9-19.
- Degiorgis, N.M.; Itoiz, M.E y Cabrini, R.L. (1987). Modelo experimental para el estudio de las alteraciones óseas producidas por el aluminio. *Actas II Congreso de Osteología y Metabolismo Mineral.* Buenos Aires. Argentina.
- Delany, H.; John, J.; The, E.; Li, C.; Gliedman, M.; Steiberg, J. y Levenson, S. (1994). Contrasting effects of identical nutrients given parenterally or enterally after 70% hepatectomy. *The American Journal Surgery.* 167: 135-143.
- Dintenfass, L. y Lake, B. (1977). Blood viscosity factors in evaluation of submaximal work output and cardiac activity in men. *Angiology.* 28(11):788-98.
- Domínguez, M.C.; Sole, E.; Goñi, C. y Balbriga, A. (1995). Effect of aluminum and lead salts on lipid peroxidation and cell survival in human skin fibroblasts. *Biol. Trace Elem. Res.* 47:57-67.
- Doyle, M.; Wilson, R.B. y Hartrof, W.S. (1968). The effect of starvation on liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *Exp. Mol. Pathl.* 9:400.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archs. Biochem. Biophys.* 82: 70-73.
- Exley, C y Birchall, J.D. (1992). The cellular toxicity of aluminum. *J. Theor. Biol.* 159:83-98.
- Exley, C. (1998). Does antiperspirants use increase the risk of aluminum related disease, including Alzheimer's Disease? *Mol. Med. Today.* 4:107-109.

- Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36:380-387.
- Exley, C.; Pinnegar, J.K. y Taylor, H.J. (1997). Hydroxyaluminosilicates and acute aluminum toxicity in fish. *Theor. Biol.* 189: 133-139.
- Exley, C.; Price, N.C.; Kelly, S.M. y Birchall, J.D. (1993). An interaction of  $\beta$ -amyloid with aluminium in vitro, *FEBS Lett.* 324: 293-295.
- Fatemi, S.J.; Williamson, D.J. y Moore, G.R. (1992). A  $^{27}\text{Al}$  NMR investigation of  $\text{Al}^{+3}$  binding to small carboxylic acids and the proteins albumin and transferrin. *J. Inorg. Biochem.* 46:35-40.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J. Hepatology* 32 (Supl. 1): 19-31.
- Fawcett, J.P. y Menkes, D.B. (1994). Does cholesterol depletion have adverse effects on blood rheology? *Angiology.* 45 (3): 199-206.
- Ferri, A.; Duffard, R.; Stürtz, N. y Evangelista de Duffard, A. M.. (2003). Iron, zinc and copper levels in brain, serum and liver of neonatos exponed to 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol. Teratol.* 25:607-613.
- Finch, C.H; Ragan, H.A.; Dyer, I.A. y Cook, J.R. (1998). Body iron loss in animals. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 59: 335-338.
- Flaten, T.P.; Alfrey, A.C.; Birchall, J.D.; Savoie, J. y Yojel, R.A. (1997). *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology. (Yokel R.A and Golub M.S. Eds.) Taylor & Francis. Bristol. USA. Chapter: 1. pp. 1-15.
- Fleming, M.D.; Romano, M.A.; Su, M.A.; Garrick, L.M.; Garrick, M.D. y Andrews, M.C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrado rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:1148-1153.
- Fouad, F.M.; Farrell, P.G.; Marshall, W.D.; Scherer, R. y Ruhentrost-Bauer, G. (1992). Partially hepatectomized rats: a model for the study of the effect of toxins on the plasma protein profiles of nascent hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* 36: 43-57.



- Ganrot, P.O. (1986). Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65:363-441.
- Garbossa, G.; Gálvez, G.; Castro, M.E. y Nesse, A. (1998). Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 1. Impairment of erythropoiesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 17(6): 312-317.
- Ge, M.; Field, K.A.; Aneja, R.; Holowka, D.; Baird, B. y Freed, J.H. (1999). Electron spin resonant characterization of liquid ordered phase of detergent-resistant membranes from RBL-2H3 cells. *Biophysical Journal.* 77:925-933.
- Goddard, W.P.; Coupland, K.; Smith, J.A. y Long, R.G. (1997). Iron uptake by isolated human enterocyte suspension in vitro is dependent on iron stores and inhibited by other metal cations. *J. Nutr.* 127: 177-183.
- Golub, M.S.; Han, B; Keen, C.L. y Gershwin, M.E. (1993). Developmental patterns of aluminum in mouse brain and effects of dietary aluminum excess a manganese deficiency. *Toxicology.* 81:33-47.
- Greger, J.L. y Sutherland, J.E. (1997). Aluminum exposure and metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34: 439-474.
- Griffith, O.H. y Jost, P.C. (1976). Spin labeling. *Theory and Applications.* (Berliner Ed.). 454-523.
- Gruenheid, S.; Canonne-Hergaux, F.; Gauthier, S.; Hackam, D.J.; Gristein, S. y Gros, P. (1999). The iron transport protein Nramp2 is an integrated membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med.* 189: 831-841.
- Gudmundsson, M. y Bjelle, A. (1993). Viscosity of plasma and blood in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology.* 32: 774-779.
- Gunshin, H.; MacKenzie, B.; Berger, U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F; Boron W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L. y Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388: 482-488.

- Gutteridge, J.M.; Quinlan, G.J.; Clark, I. y Halliwell, B. (1985). Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochim. Biophys. Acta.* 835: 441-447.
- Harris, W. y Sheldon, J. (1990). Equilibrium constants for the binding of aluminum to human serum transferrin. *Inorg. Chem.* 29:119-124.
- Harris, W.; Breton, G.; Day, J.P.; Exley, C.; Flaten, T.; Forbes, W.; Kiss, T.; Orvig, C. y Zatta, P. (1997). *Research issues in aluminum toxicity*. Speciation of aluminum in biological systems. (Yokel, R. A. and Golub, M.S. Eds). Taylor & Francis. Bristol, USA. Chapter 5. pp. 91-116.
- Higgins, G.M. y Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12: 186-202.
- Hirota, M.; Sakamoto, K.; Yamaguchi, Y.; Katafuchi, S.; Ikei, S.; Mori, K. y Akagi, M. (1987). Postoperative changes in serum levels of iron, transferrin and ferritin in surgical patients. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 88: 1536-1541.
- Holeček, M. (1999). Nutritional Modulation of Liver Regeneration by Carbohydrates, Lipids, and Amino Acids: a Review. *Nutrition.* 15 (10): 784-788.
- Hudson, J.Q. y Schonder, K.S. (2002). Advances in Anemia Management in Chronic Kidney Disease *Journal of Pharmacy Practice.* 15: 437-455.
- Huguet, C. (1993). Les exérèses hépatiques majeures. *La Presse Medicale.* 2:22.
- International Committee for Standardization in Hematology. Expert panel on blood rheology. (1986). Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin. Hemorheol.* 6:439-453.
- Iwai, K.; Klausner, R.D. y Roulault, T.A. (1995). Requirements for iron – regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* 14:5350-5357.
- Jasper, H.G. y Brasel, J.A. (1974). Rat liver DNA synthesis during the “catch-up” growth of nutritional rehabilitation. *J. Nutr.* 104:47.

- Jeffery, E.H.; Abreo, K.; Burgess, E.; Cannata, J. y Greger, J.L. (1997). *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue and kidney. (Yokel, R.A. and Golub, M.S. Eds.) Taylor & Francias. Bristol. USA. Chapter 7. pp. 134-146.
- Jeffrey Field, J.; Mathur, S.N. y Labrecque, D.R. (1985). Cholesterol metabolism in regenerating liver of the rat. *Am. J. Physiol.* 249: 679-684.
- Jensen, R.E y Berndt W.O. (1988). Ephinephrine and norephinephrine enhance p- aminohipurate transport into basolateral membranas vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 543-549.
- Jung, F.; Pindur, G. y Kiesewetter, H. (1992). Plasma viscosity dependence on proteins and lipoproteins: Results of the Aachen study. *Clin Hemorheol.* 12: 557-571.
- Kadly, P.; Menotti, E.; Moret, R. y Kühn, L.C. (1999). Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1. *EMBO J.* 18: 6073-6083.
- Kam, I.; Lynch, S.; Svanas, G.; Todd, S.; Polimero, L. y Francavilla, A. (1987). Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology.* 7: 362-6.
- Kaplan, J. (2002). Mechanisms of cellular iron acquisition; another iron in the fire. *Cell.* 111:603-606.
- Kikuchi, Y.; Arat, T. y Koyarna, T. (1983). Improved filltration method for cell deformability measurement. *Medical Biological Enginnering & Computing.* 42:127-135.
- Kim, A.; Dadgostar, H.; Holland, G. N.; Wenby, R.; Yu, F.; Terry, B. G y Meiselman, H. J. (2006). Hemorheologic Abnormalities Associated with HIV Infection: Altered Erythrocyte Aggregation and Deformability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 3927 - 3932.
- Klein, G.L. (1993). Aluminum and hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology.* 104: 1583-1584.
- Kong, S.; Liochev, S. y Fridovich, I. (1992). Aluminum (III) facilitates the oxidation of NADH by superoxide anion. *Free Radic. Biol. Med.* 13:79-81.

- Krishnamoorthy, T; Crawford, M.; Chaturvedi, M.; Jain, S.; Agarwal, B.; Al-Ubaidi, M. y Agarwal, N. (1999). Photo-oxidative stress down- modulates the activity of nuclear factor  $\kappa$ B via involvement of caspase 1, leading to apoptosis photoreceptor cells. *J Biol Chem.* 274(6):3734-3743.
- Kurose, I.; Higuchi, H., Miura, S.; Saito, H.; Watanabe, N.; Hokari, R.; Hirokawa, M.; Takaishi, M.; Zeki, S.; Nakamura, T.; Ebinuma, H.; Kato, S. y Ishii, H. (1997). Oxidative stress- mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology.* 25(2):368-378.
- Lambotte, L.; D'Udekem, Y.; Lambert, F.; Gresses, P.; Amrani, M. y Dubois, J. (1989). Possible role of free radicals in liver regeneration. *Adv Biosci.* 76:177-185.
- Laster, S.M. y Mackenzie, J.M.(1996). Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Microsc Res Tech.* 34(3): 272-80.
- Lawrence, C.M.; Ray, S.; Babyonyshev, M.; Galluser, R.; Borhani, D.W. y Harrison, S.C. (1999). Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor .*Science.* 286:779-782.
- Le Dèvehat, C.; Khodabandehlou, T.y Vimeux, M. (2000). Diabetes mellitus and fibrinogen. Hemorrhological and microcirculatory consequences. *J Mal Vasc.* 25(1): 53-7.
- Leong, W.I. y Lönerdal, B. (2004). Hepsidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr.* 134:1-4.
- Levin, I.; Gamzu, R.; Hasson, Y.; Lessing, J.B.; Amit, A.; Shapira, I.; Berliner, S. y Almog, B. (2004). Increased erythrocyte aggregation in ovarian hyperstimulation syndrome: a possible contributing factor in the pathophysiology of this disease. *Hum. Reprod.* 19: 1076 - 1080.
- Lominadze, D. y Dean, W.L. (2002). Involvement of fibrinogen specific bindingin erythrocyte aggregation. *FEBS Letter.* 517:41-44.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- Lukiw, W.J. y Bazan, N.G. (2000). Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 25(9-10): 1173-1184.
- Luquita, A.; Dominighini, A.; Rasia, R. y Rasia, M. (1994). Erythrocyte rheology in standardized experimental chronic renal failure. *Clin Hemorheol.* 14 (2): 213-221.
- Luquita, A.; Gennaro, A.M. y Rasia, M. (1996). Effects of subnormal hemoglobin concentration on the deformability of normocytic erythrocytes. *Clin Hemorheol.* 16: 117-127.
- Mahieu, S.; Contini, M. del C.; González, M.; Millen, N. y Elías, M.M. (2000). Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol. Lett.* 111: 235-242.
- Mangipudy, R.S.; Chanda, S. y Mehendale, H.M. (1995). Tissue regeneration as function of dose in thioacetamide auto protection. *Pharmacol. Toxicol.* 77: 182-188.
- Martin, B.R. (1986). The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin. Chem.* 32:1797-1806.
- Martin, R.B. (1997). Aluminum Toxicity in infants Health and disease. The importance of aluminum chemistry in biological systems. (Edited by Zatta PF & Alfrey AC. World Scientific Publishing Co. Pte. Singapore). 1: 3-15.
- Martin, R.B.; Savory, J.; Brown, S.; Bertholf, R.L. y Wils, M.R. (1987). Transferrin binding of  $Al^{+3}$  and  $Fe^{+3}$ . *Clin. Chem.* 33: 405-407.
- Matrai, A.; Warburton, B. y Dormandy, J.A. (1984). Surface rheological observations on human plasma. *Biorheology Suppl.* 1: 103-105.
- Matrai, A.; Whittington, R.B.; Ernest, A. (1986). A simple method of estimating whole blood viscosity at standardized hematocrito. *Clin Hemorheol.* 6: 439-453.
- McGillivray, R.T.; Moore, S.A.; Chen, J.; Anderson, B.F.; Baker, H.; Luo, Y.; Bewley, M.; Smith, C.A.; Murphy, M.E.; Wang, Y.; Mason, A.B.; Woodworth, R.C.; Brayer, G.D. y Baker, E.N. (1998). Two high-resolution

- crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release. *Biochemistry*. 37:7919-7928.
- McIntosh, E.; Gauthier, T. y Pettigren, N. (1992). Liver regeneration and the effect of exogenous putrescine on regenerative activity after partial hepatectomy in cirrotic rats. *Hepatology* 16: 1428-1433.
  - McKie AT; Marciani P; Rolfs A; Beerman K; Wehr K; Barrow D; Miret S; Bornford A; Peters T J; Frazaneh F; Hediger M A; Hentze M W; Simpson R.J. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 5:299-309.
  - McKie, A.T.; Barrow, D.; Latunde-Dads, G.O.; Rolfs, A.; Sagar, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T.J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M.A.; Farzaneh, F. y Simson, R.J. (2001). An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science*. 291:1755-1759.
  - Mengarelli, G.; Dominighini, A.; Ferrero, M.; Alvarez, M.L.; Wagner, M.; Gurni, A.; Carnovale, C.E.; Luquita, A. (2001). Evaluation of hemorheologic parameters and biliary secretion in *Ligaria cuneifolia* (Argentine mistletoe) extract-treated rats. *Pharmaceutical Biology*. 39(6): 435-439.
  - Michalopoulos, G. y DeFrances, M. (1997). Liver Regeneration. *Science*. 276:60-66.
  - Milin, C.; Tota, M.; Domitrovic, R.; Giacometti, J.; Pantovic, R; Cuk, M.; Mrakovcic-Sutic, I.; Jakovac, H. y Radosevic-Stasic, B. (2005). Metal tissue kinetics in regenerating liver, thymus, spleen, and submandibular gland after partial hepatectomy in mice, *Biol. Trace Elem. Res*. 108: 225-243.
  - Miller, J.L.; Hubbard, C.M.; Litman, B.J. y Mac Donald, T.L. (1989). Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *J. Biol. Chem*. 264: 243-250.
  - Mitra, K.; Ubarretxena-Belandia, I.; Taguchi, T.; Warren, G.y Engelman, D.M. (2004). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *PNAS*. 101: 4083 - 4088.

- Mohammed, R.; McColl, K.E.; Veitch, D.; Young, R.; Cumming, L. y Parikh, R.K. (1983). Changes in iron metabolism following surgery. *Br. J. Surg.* 70: 161-162.
- Mohandas, N.; Chasis, J. y Shohet, S. (1983). The influence of membrana skeleton on red cell deformability, membrana viscosity. *Seminars in Hemat.* 20: 225-242.
- Morgan, E.H. y Redgrave T.G. (1998). Effects of dietary supplementation with aluminum and citrate on iron metabolism in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 65: 117-131.
- Moshtaghie, A.A.; Ani, M. y Bazarafshan, M.R. (1992). Comparative binding study of aluminum and chromium to human transferrin. Effect of iron. *Biol. Trace Element Res.* 32: 39-46.
- Muñoz Gómez, M.; Campos Garriguez, A.; García Erce, J.A. y Ramírez Ramírez, G. (2005). Fisiopatología del metabolismo del hierro: implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Nefrología.* 95(1):9-19.
- Nash, G.B. y Meiselman, H.J. (1983). Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. *Biophys J.* 43:63-73.
- Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; McV, E y Ward, D. (2004). Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306:2090-2093.
- Nesse, A. y Garbossa, G. (2001). *Aluminum and Alzheimer's Disease. The science that describes the link.* Aluminum toxicity in Erythropoiesis. Mechanisms related to cellular dysfunction in Alzheimer's Disease. (Exley, C. Ed.). Elsevier Science. Amsterdam. Holanda. pp. 261-277.
- Nicolas, G; Chauvet, C; Viatte, L; Danan J.L; Bigard, X; Devaux, I. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110:1037-1044.
- Nieboer, E.; Gibson, B.L.; Oxman, A.D. y Kramer, J.R. (1995). Health effects of aluminum: a critical review with emphasis on aluminum in drinking water. *Environ. Rev.* 3: 29-81.

- Ohkawa, H.; Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95:351-358.
- Öhman, L.O. y Sjöberg, S. (1988). *Metal speciation: theory. Analysis and Application*. Thermodynamic calculations with special reference to the aqueous system. (Kramer, J.R. & Allen, H. E. Eds.). Lewis Publishers. Chelsea. Chapter: 1. pp. 1-40.
- Oteiza, P I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron –induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 374-379.
- Paglia, D. E. y Valentine W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Park, C.H.; Valore, E.V.; Waring, A.J.; Ganz, T. (2001). Hecpidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *J. Biol. Chem.* 276: 7806 - 7810.
- Parpart, A.K.; Lorenz, P.B.; Parpart, E.R.; Gregg, J.R.; Chase, A.M. (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *J. Clin. Invest.* 26(4): 636-40.
- Pennigton, J.A. y Schoen, S.A. (1995). Estimates of dietary exposure to aluminum. *Food Add. Contam.* 12:119-128.
- Perez, G.; Vittori, D.; Garbossa, G. y Nesse, A. (2002). Toxicidad del aluminio sobre el sistema eritropoyético. Mecanismos involucrados. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* XXXVI. 1:41-50.
- Pérez, G.; Vittori, D.; Pregi, N.; Garbossa, G. y Nesse, A. (2005). Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 39(3):301-314.
- Peters, W.H.M. (1988). Purification and partial characterization of human intestinal glutathione S-transferases. *Biochem Pharmacol.* 37(11): 2288-2291.
- Pfafferott, C.; Moessmer, G.; Ehrly, A.M. y Bauersachs, R.M. (1999). Involvement of erythrocyte aggregation and erythrocyte resistance to flow in acute coronary syndromes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 21(1): 35-43.



- Pigeon, C.; Ilyin, G.; Courselaud, B.; Leroyer, P.; Turlin, B.; Brissot, P. y Loréal, O. (2001). A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *J. Biol. Chem.* 276: 7811 – 7819.
- Pita Martín de Portela, María Luz. (2003). *Vitaminas y minerales en nutrición*. Hierro. La Prensa Médica Argentina. Capítulo XVIII. pp.102-111.
- Pountney, D.J.; Konijn, A.M.y McKie, A.T. (1999). Iron proteins of duodenal enterocytes isolated from mice with genetically and experimentally altered iron metabolism, *Br. J. Haematol.* 105:1066-1073.
- Rainer, C.; Kawanishi, D.T.; Chandraratna, P.A.; Bauersachs, R.M.; Reid, C.L.; Rahimtoola, S.H. y Meiselman, H.J. (1987). Changes in blood rheology in patients with stable angina pectoris as a result of coronary artery disease. *Circulation.* 76: 15 - 20.
- Rao, V.C. y Mehendale, H.M. (1991). Colchicine antimitosis abolishes CCl<sub>4</sub> autoprotection. *Toxicol. Pathol.* 19: 597-606.
- Ravi, S.; Chari, R. y Beauchamp, D. (1995). Liver regeneration and carcinogenesis. Surgical treatment of hepatic tumors and its molecular basis. Academic Press, (Randy L. Jirtle, ed., Academic Press, San Diego, California). 323-350.
- Ravia, J.; Stephen, R.M.; Ghishan, F.K. y Collins, J. (2005). Menkes Copper ATPase (Atp7a) Is a Novel Metal- responsive Gene in Rat Duodenum, and Immunoreactive Protein Is Present on Brush-border and Basolateral Membrane Domains. *Journal of Biological Chemistry.* 280 (43): 36221-36227.
- Razavian, M.; Del Pino, M.; Simon, A. y Levenson, J. (1992). Increase in erythrocyte disaggregation shear stress in hypertension. *Hypertension.* 20: 247-252.
- Razavian, S.M.; Atger, V.; Giral, P.H.; Cambillau, M.; Del Pino, M.S.; Moatti, N.; Levenson, J. (1994). The PCV METRA Group. Influence of HDL subfractions on erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic men. *Arterioscler Thromb.* 14:361-366.

- Reid, H.L.; Barnes, A.J.; Lock, P.J.; Dormandy, J.A. y Dormandy, T.L. (1976). A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J. Clin. Pathol.* 29: 855 - 858.
- Reinhart, W.H. (2003). Fibrinogen-marker or mediator of vascular disease? *Vascular Medicine.* 8: 211-216.
- Reyes, J.; Todo S.y Starzl, T. (1996). Liver and intestine transplantation. Organ and bone marrow transplantation, immunology and allergy. *Clinics of North America.* 16 (2):293-312.
- Robert, I. y Weed, M.D. (1970). The importance of erythrocyte deformability. *Am. J. Med.* 49(2): 147-150.
- Rolfs, A. y Hediger, M.A. (1999). Metal iron transports in mammal: structure, function and pathological implications, *J. Physiol.* 518: 1-12.
- Röllin, H.B.; Theodorou, P. y Kilroe – Smith, T.A. (1993). Changes in the concentration of cooper and zinc of rabbits following the inhalation of low concentrations of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dust. *S. African J. Sci.* 89:246-249.
- Rondeau, V. y Commengenes, D. (2001). *Aluminum and Alzheimer's Disease. The science that describes the link.* The epidemiology of aluminum and Alzheimer's Disease. (Exley, C. Eds.). Elsevier Science Ámsterdam. Holanda. pp. 59-71.
- Rose, H.G. y Oklander, M. (1965). Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res.* 6: 428.
- Saiyed, S.M. y Yokel, R.A. (2005). Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Addit Contam.* 22(3): 234-44.
- Schreck, R.; Rieber, P. y Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of de NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10(8):2247-2258.
- Schulte-Hermann, R.; Grasl-Kraupp, M. y Bursch, W. (1995). *Liver Regeneration and carcinogenesis. Molecular and Celular Mechanisms.*

Apoptosis and hepatocarcinogenesis (Jirtle, R.L, Ed.). Academia Press. San Diego. pp. 141-178.

- Schümann, K.; Elsenhans, B. y Forth, W. (1999). Kinetic analysis of <sup>59</sup>Fe movement across the intestinal wall in duodenal rat segments ex vivo. *Am J. Physiol.* 276: 431-440.
- Sciorra, V.A.; Rudge, S.A.; Prestwich, G.D.; Frohman, M.A.; Engebrecht, J. y Morris, A.J. (1999). Identification of phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes, *EMBO J.* 18: 5911-5921.
- Scornik, O. A. y Botbol, V. (1976). Role of changes in protein degradation in the growth of regenerating livers. *J. Biol. Chem.* 251: 2891 – 2897.
- Sheetz, M.P. y Singer, S.J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 (11): 4457–4461.
- Skullman, S.; Wiren, M.; Garlick, P.J.; McNurlan, M.A. y Larsson, J. (1994). Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *J Hepatol.* 21: 174-181.
- Solomon, B.; Koppel, R. y Jossiphov, J. (2001). Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease-affected brains, *Brain Res. Bull.* 55: 253-256.
- Soutani, M.; Suzuki, Y.; Tateishi, N. y Maeda, N. (1995). Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 268: 1959-1965.
- Stuart, J. y Nash, G.B. (1990). Red cell deformability and haematological disorders. *Blood. Rev.* 4: 141-147.
- Suckfull, M.; Wimmer, C.; Reichel, O.; Mees, K. y Schorn, K. (2002). Hyperfibrinogenemia as a risk factor for sudden hearing loss. *Otol Neurotol.* 23(3): 309-11.
- Sutura, S.P. y Krogstad D.J. (1991). Reduction in surface-volume ratio: A physical mechanism contributing to the loss of red cell deformability. *Biorheology.* 28: 221-229.

- Suwalsky, M.; Norris, B.; Villena, F.; Cuevas, F.; Sotomayor, P. y Zatta, P. (2004). Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes. *Food Chem. Toxicol.* 42(6): 925 - 933.
- Swain, C. y Chainy G.B. (1998). Effects of aluminum sulphate and citric acid ingestion on lipid peroxidation and on activities of superoxide dismutase and catalase in cerebral hemisphere and liver of developing young chicks. *Mol. Cell. Biochem.* 187: 163–172.
- Telen, M.J. (1995). Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all. *Blood.* 85(2): 299-306.
- Telen, M.J. (2005). Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. *Transfus Med Rev.* 19(1): 32-44.
- Toledano Gasca, A. y Díaz López, Ma. G. (1984). La clave de la microcirculación. La flexibilidad del glóbulo rojo. Merck. Tomo II: 1-23.
- Tomita, M.; Gotoh, F.; Tanahashi, N. y Turcani, P. (1986). Whole-blood red blood cell aggregometer for human and feline blood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 251: 1205.
- Udden, M. M. (2002). In vitro sub-hemolytic effects of butoxyacetic acid on human and rat erythrocytes. *Toxicol Sci.* 69(1): 258-264.
- Van Rensburg, S.J.; Cartens, M.E.; Potpcnik, F.C.V. y Taljaard, J.J.F. (2000). The effect of iron and aluminum on transferrin and other serum proteins as revealed by isoelectric focusing gel electrophoresis. *Ann NY Acad Sci.* 903: 150-155.
- Vaya, A.; Simo, M.; Santaolaria, M.; Todoli, J. y Aznar, J. (2005). Red blood cell deformability in iron deficiency anaemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 33(1):75-80.
- Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Golub, M.S. y Oteiza, P. (1998). Membrane composition can influence the rate of Al<sup>3+</sup> – mediated lipid oxidation: effect of galactolipids. *Biochem. J.* 333:833-838.

- Verstraeten, S.V. y Oteiza, P.I. (2000). Effects of  $Al^{+3}$  and related metals on membrane phase state and hydration: correlation with lipid oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 375: 340-346.
- Verstraeten, S.V.; Nogueira, L.V.; Schreier, S. y Oteiza, P.I. (1997). Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 338: 121-127.
- Villar, S. R.; Brandoni, A.; Anzai, N.; Endou, H. y Torres, A. M. (2005). Altered expresión of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. Kidney Int. 68: 2704-2713.
- Vittori, D.; Garbossa, G.; Lafourcade, C.; Pérez, G. y Nesse, A. (2002). Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. Biochim. et Biophys. Acta. 1558: 142-150.
- Vittori, D.; Nesse, A.; Pérez, G. y Garbossa, G. (1999). Morphological and functional alterations of erythroid cells induced by long - term ingestion of aluminum, J. Inorg. Biochem. 76 (2): 113-120.
- Wannemacher, Jr. R.W.; Banks, Jr. W.L. y Wunner, W.H. (1965). Use of a single tissue extract to determine cellular protein and nucleic acid concentrations and rate of amino acid incorporation. Anal Biochem. 11(2): 320-326.
- Ward, M.K.; Feest, T.G.; Ellis, H.A.; Parkinson, I.S. y Kerr, D.N.S. (1978). Osteomalacic dialysis osteodystrophy: Evidence for a water-borne etiological agent, probably aluminum. Lancet. 1: 841-845.
- Ward, R.J.; Abiaka, C. y Peters, T.J. (1994). Inflammation and tissue injury the world of free radicals. J.Nephrol. 7:89-95.
- Ward, R.J.; Legssyer, R.; Henry, C. y Crichton, R.R. (2000). Does the haemosiderin iron core determine its potential for chelation and the development of iron-induced tissue damage? J.Inorg. Biochem. 79: 311-317.
- Ward, R.J.; Wilmet, S.; Legssyer, R. y Crichton, R.R. (2002). The influence of iron homoeostasis on macrophage function. Biochem. Soc. Trans. 30: 762-765.

- Wen, Z.Y.; Song, L.C.; Yan, Z.Y.; Lu, Z.H.; Sun, D.G.; Shi, Y. y Chien, S. (1998). An animal model to study erythrocyte senescence with a narrow time window of erythrocyte production: alteration in osmotic fragility and deformability of erythrocytes during their life span. *Clin Hemorheol Microcirc.* 18: 299–306.
- Wileman, T.; Harding, C. y Stahl, P. (1985). Receptor-mediated endocytosis. *Biochem J.* 232:1-14.
- Xie, C. X. y Yokel, R. A. (1996). Aluminum facilitation of iron –mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 327:222-226.
- Yokel, R. y McNamara, P. (2001). Aluminum toxicokinetics: an update minireview, *Pharmacol. Toxicol.* 88: 159-167.
- Zatta, P. (1997). *Aluminum toxicity in Infants Health and Disease*. Aluminum toxicity depends on the metal speciation. (Zatta, P.F & Alfrey, A.C. Eds.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. Chapter: 3. pp. 40-53.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cristina E. Carnovale, por su dedicada y responsable dirección, su generoso estímulo, y su confianza durante todo el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Claudio A. Bernal, por su aguda, precisa y esmerada codirección.

A la Dra. Ana María Gennaro y a los integrantes de la Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, por compartir el instrumental y los conocimientos indispensables para el desarrollo de las investigaciones.

A mis compañeros y amigos Stella Mahieu, Marcela González y Néstor Millen, por compartir las experiencias y brindarme su desinteresado apoyo y permanente colaboración.

A mi familia, dueña del tiempo que demandó este esfuerzo.